

Miljøprojekt Nr. 757 2003

Optimering og validering af metode til påvisning af Cryptosporidium og Giardia i drikkevand

Carolina Eldblom, Charlotte Maddox-Hyttel
og Heidi Larsen Enemark
Danmarks Veterinærinstitut

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	5
SAMMENDRAG	7
SUMMARY	11
1 BAGGRUND	15
2 METODEBESKRIVELSE	19
2.1 FILTRERING OG OPKONCENTRERING AF VANDPRØVER	19
2.2 OPRENSNING AF GIARDIA CYSTER OG CRYPTOSPORIDIUM OOCYSTER FRA VAND VHA. IMMUNOMAGNETISK SEPARATION	21
2.3 DETEKTION AF CRYPTOSPORIDIUM OG GIARDIA VHA. IMMUNOFLUORESCENS	23
3 METODE OPTIMERING	25
4 METODEVALIDERING	27
5 RESULTATER	31
5.1 INTERAKTIONSFORSØG	31
5.2 KONTROL AF DEN TILSATTE PODNINGSDOSIS	32
5.3 GENFINDELSE AF PROTOZOER EFTER FILTRERING AF RÅVANDS- OG RENTVANDSPRØVER	33
5.3.1 Ejby råvand	33
5.3.2 Regnemark rent vand	34
5.3.3 Kingosvej råvand	35
5.3.4 Kingosvej rent vand	36
5.3.5 Mørskov råvand	37
5.3.6 Mørskov rent vand	38
5.3.7. Samlede resultater	39
6 DISKUSSION	43
7 KONKLUSION	47
8 REFERENCER	49
BILAG A INSTRUKS OM BRUG OG VEDLIGEHOLDELSE AF FILTERHOLDER, SARTORIUS SM 16275	51

Forord

Projektet er udført i 2001-2002 for Miljøstyrelsen med henblik på optimering og validering af en metode til påvisning af protozoerne, ***Cryptosporidium*** og ***Giardia***, i rent vand samt råvand. Metoden er baseret på filtrering af vandet og efterfølgende oprensning vha. immunomagnetisk separation. Detektion af protozoerne sker vha. immunofluorescens.

Formålet med nærværende studie er at bestemme genfindelsen af hhv. ***Cryptosporidium*** oocyster og ***Giardia*** cyster under anvendelse af ovennævnte metode samt at foretage et kvalificeret skøn over metodens sensitivitet m.h.p. fremtidig brug ved vurdering af protozo koncentrationen i forskellige vandprøver.

Rapporten er udarbejdet af:
Cand.scient. Carolina Eldblom,
Cand.med.vet., Ph.D., dr.med.vet. Charlotte Maddox-Hyttel &
Cand.med.vet., Ph.D. Heidi Larsen Enemark
Sektion for Parasitologi
Danmarks Veterinærinstitut.

Der er i forbindelse med udarbejdelse af projektet nedsat en følgegruppe med følgende deltagere:

Miljøstyrelsen v/ Linda Bagge (Formand)
Miljøstyrelsen v/ Susanne Rasmussen
Københavns vand v/ Søren Lind
Aalborg Kommune Vandforsyningen v/ Klaus Kolind-Hansen
Danmarks Private Vandværker v/ Solveg Nilsson

Sammendrag

Formålet med dette projekt var at optimere og validere en metode til opkoncentrering, oprensning og efterfølgende identifikation af protozoerne **Cryptosporidium** og **Giardia** i henholdsvis råvand og rent vand.

Baggrund

Interessen for at kende status for vandets indhold af protozoerne er bl.a. baseret på beskrivelsen af omfattende vandbårne epidemier forårsaget af **Cryptosporidium** og **Giardia** i drikkevand. Herved er opstået en stigende interesse for udvikling og optimering af metoder til påvisning af disse zoonotiske parasitter i forskellige materialer, herunder råvand og drikkevand.

Cryptosporidium parvum og **Giardia lamblia** (syn. **G. intestinalis** og **G. duodenalis**) er encellede parasitter, der kan inficere mavetarm-kanalen hos såvel mennesker som dyr. Parasitterne er ubikvitært forekommende i naturen og blandt de almindeligste ikke-bakterielle årsager til diarré. Cryptosporidier udskilles via fæces som oocyster og i meget store mængder. Oocysterne er straks infektiøse og endvidere modstandsdygtige overfor alle almindeligt anvendte desinfektionsmidler herunder klor i koncentrationer, der kan anvendes til behandling af drikke- / badevand. I køligt, fugtigt miljø kan oocysterne overleve flere måneder. Smitte finder sted ved direkte kontakt (person-person, dyr-menneske) eller indirekte via optagelse af oocyster fra bl.a. drikkevand, badevand og levnedsmidler forurenet med fækalier. Giardiasis hos mennesker forårsages af arten **G. lamblia**, der i lighed med **C. parvum** har et meget bredt værtsspektrum. Livscyklus omfatter to stadier: Trophozoit stadiet, som er det infektiøse stadium og cyste stadiet, som er den resistente form, der udskilles med fæces. Cysten kan overleve op til 2 måneder udenfor værten. For begge protozoer er få (oo)cyster tilstrækkeligt til at give sygdom.

Metoden

I det nærværende studie er en metode til påvisning af **Cryptosporidium** oocyster og **Giardia** cyster blevet optimeret og valideret. Metoden er valideret via bestemmelse af genfindelsesprocenten ved tilsætning af kendte mængder oocyster og cyster i forskellige koncentrationer til vandprøverne. Til valideringen er anvendt 6 vandprøver af forskellig kvalitet: Tre rentvandsprøver fra hhv. Kingosvej, Mørkskov og Regnemark vandværk, samt 3 råvandsprøver fra Kingosvej og Mørkskov vandværk tillige med Ejby råvandsboring.

For hver vandprøve er der foretaget 10 filtreringer à 10 liter med hver af de følgende cyste/oocyste koncentrationer: 100, 1000 og 10.000. For hver 10. filtrering blev der medtaget en positiv kontrol (5 l milli-Q eller ionbyttet vand tilsat det samme antal cyster/oocyster som de forudgående vandprøver: 100, 1000 eller 10.000) og en negativ kontrol (5 l milli-Q eller ionbyttet vand).

Vandprøverne er blevet filtreret gennem et 2 µm membranfilter, opkoncentreret vha. centrifugering og immunomagnetisk separation (IMS), og sluttelig farvet og aflæst vha. immunofluorescens.

I forbindelse med projektet blev metoderne til opkoncentrering og detektion af **Cryptosporidium** og **Giardia** i vandprøver optimeret på forskellige punkter: Ved filtreringsprocessen sikredes udskiftning af gummislanger så disse var garanteret protozo-fri. Ved frigørelse af oocyster/cyster fra filtret i den anvendte 'pulsifier' justeredes vandmængde og procedure for at minimere tab af oocyster/cyster. Filtratopkoncentrering foregik ved ændret indstilling af centrifugeringen - og mikroskopieringsprocessen justeredes efter prøvens indhold af (oo)cyster.

Som led i valideringen blev det undersøgt, hvorvidt der var interaktion mellem **Giardia** og **Cryptosporidium**, idet eksempelvis høj koncentration af den ene art kunne tænkes at påvirke genfindelsen af den anden art. Disse forsøg blev udført i postevand, der blev tilsat hhv. 10.000 af den ene parasit og 100 af den anden og vice versa. For hver kombination blev der lavet 5 filtreringer. Desuden blev resultaterne af de positive kontroller, fra forsøg tilsat 10.000 af hver parasit, sammenlignet med interaktionsforsøgene, for at vurdere hvorvidt en samtidig høj koncentration af begge parasitter havde en negativ effekt på genfindelsesprocenten.

Forsøg med råvand viste, at der ikke var den forventede genfindelse af **Cryptosporidium** oocyster. For at verificere at oocysterne blev fanget i filtret, blev der efter nogle enkelte filtreringer og inden IMS udtaget 50 µl af prøven på et objektglas. Prøven blev farvet efter fabrikantens forskrifter og aflæst i fluorescens mikroskop. I alle tilfælde kunne der påvises oocyster i prøven efter filtrering.

Resultater

Genfindelsesprocenten af cyster/oocyster blev ikke påvirket negativt ved høje koncentrationer af den ene eller begge parasitter, og var således ikke signifikant forskellig ved de forskellige koncentrationer af hhv. **Giardia** og **Cryptosporidium**. Denne observation muliggjorde en vurdering af genfindelsesprocenten for hver parasit i de undersøgte vandtyper uden korrektion for en evt. interaktion.

For bedst muligt at kunne beregne genfindelsesprocenten for de to protozoarter i de respektive vandtyper blev den tilsatte mængde protozocyster hhv. -oocyster kontrolleret ved undersøgelse af 3 stikprøver for hver podningsdosis. Resultaterne af disse kontroltællinger varierede meget, men var ikke signifikant forskellig mellem de to protozoer.

Genfindelsen af **Giardia** i råvand varierede mellem 39,3-77,3 % med et gennemsnit fra 54,6-62,3 %, og med størst variation i prøver med lav koncentration. Farvningen af **Giardia** cysterne var utilfredsstillende i alle råvandsprøverne.

Genfindelsesprocenten for **Giardia** cyster i rent vand varierede mellem 26,8-63,4 % med et gennemsnit fra 41,5-52,8 % (figur 6). Variationen i genfindelsesprocenten var størst i prøverne med den laveste koncentration. Kun for Kingosvej prøver tilsat hhv. 1000 og 10.000 cyster var der en signifikant forskel ($P < 0,05$) sammenlignet med de øvrige rentvandsprøver, som i øvrigt ikke var forskellige fra hinanden. Udelades resultaterne for Kingosvej rent vand, som tydeligt lå lavere end resultaterne for de øvrige to rentvandstyper var genfindelsen mellem 48,9-59,4 %.

Genfindelsen af **Cryptosporidium** i råvand varierede mellem 0,1-6,0 % med et gennemsnit fra 0,2-3,2 %. Variationen i genfindelsesprocenten var størst i prøver tilsat 100 oocyster.

Genfindelsen af **Cryptosporidium** oocyster var for de tre rentvandstyper inden for et interval af 25-51,1 % med et gennemsnit fra 37,0-38,7 %. Den største variation i genfindelsesprocenten sås i prøver tilsat 100 oocyster, hvorimod standardafvigelsen i prøver tilsat 10.000 oocyster var mindre.

Som det fremgår af ovenstående gjaldt det for både råvand og rent vand, at genfindelsen af **Giardia** var større end genfindelsen for **Cryptosporidium**. Dette kan skyldes, at **Giardia** cysterne er større og derfor lettere bliver opfanget af filtret. Desuden er det i henhold til producenten af IMS-kittet, Dynal Biotech, vist, at bindingen mellem **Giardia** og Dynabeads anti-**Giardia** er stærkere end bindingen mellem **Cryptosporidium** og Dynabeads anti-**Cryptosporidium**. Dette kan være årsagen til, at der i råvand genfindes mange **Giardia** cyster men ingen eller kun få **Cryptosporidium** oocyster.

Det er et kendt problem, at **Cryptosporidium** oocyster og **Giardia** cyster har en tendens til at klumpe sammen og bundfælde, hvilket besværliggør en nøjagtig podning af prøverne. Generelt må det antages, at den store standardafvigelse i protozo-genfindelsen ikke mindst i prøver tilsat få oocyster/cyster er forårsaget af såvel en variation i mængden af tilsatte protozoer som en metode relateret (filtrering, IMS, fluorescens) variation.

Råvandets kemiske og biologiske sammensætning udskiller sig på de fleste punkter ikke meget fra det rene vand. Der er dog en del jern især i Ejby råvand (3,7 mg/l), og selv i Kingosvej råvand (0,05-0,09 mg/l), som indeholder mindst af jern af de tre råvandstyperne, er der mere end i nogen af rentvandstyperne. For alle råvandstyper er der også betydeligt mere ammonium end i det rene vand. Derudover ser det ud til, at der i råvandet er mere bikarbonat og svovlilte end i det rene vand, men for disse parametre foreligger ikke værdier for alle vandtyperne. I modsætning til **Giardia** var der stort set ingen genfindelse af **Cryptosporidium** i råvand. Cryptosporidierne var påvist i prøven efter filtrering, hvorfor det må konkluderes at være IMS-opkoncentreringen, der ikke fungerede i råvand. Dette kunne evt. skyldes mængden af jern i råvandet eller den forholdsvis store mængde bundfald, selvom denne dog ikke overskrider Dynals forskrifter. Bindingen mellem **Cryptosporidium** oocysterne og Dynabeads anti-**Cryptosporidium** er ikke kraftig, og det kan tænkes, at stoffer i bundfaldet svækker bindingen yderligere.

Der er ikke bestemt en nedre grænse for, hvad metoden kan detektere, men baseret på den fundne genfindelse for **Cryptosporidium** oocyster på minimum 25 % forventes det, at metoden kan detektere 2-3 oocyster i prøver med kun 10 oocyster. For **Giardia** kan metoden detektere 4-6 cyster ud af prøver med kun 10 cyster. Der er ved metodevalideringen ikke påvist en øvre begrænsning i antallet af oocyster/cyster, der kan detekteres, men denne er først og fremmest afhængig af IMS-processen.

Summary

The purpose of this project was to optimise and validate a method for concentration, purification, and subsequent identification of the protozoans ***Cryptosporidium*** and ***Giardia*** in raw water and clean water, respectively.

Background

Interest in knowing the status of the content in water of the protozoans is partly based on the description of extensive waterborne epidemics caused by *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking water. Hence, increasing interest has arisen in the development and optimisation of methods to demonstrate these zoonotic parasites in different materials, including raw water and drinking water.

Cryptosporidium parvum and *Giardia lamblia* (syn. *G. intestinalis* and *G. duodenalis*) are protozoans, which can infect the gastro-intestinal tract of both man and animals. The parasites are ubiquitous in nature and among the most common non-bacterial causes of diarrhoea.

Cryptosporidia are excreted with the faeces as oocysts in great numbers. The oocysts are immediately infective and furthermore resilient towards all commonly employed disinfectants, including chlorine in the concentrations used for treatment of bathing and drinking water. In a cool, damp environment the oocysts may survive for several months. Infection occurs by direct contact (person-person, animal-human) or indirectly via ingestion of oocysts from e.g. drinking water, bathing water and foods contaminated with faecal material.

Giardiasis in humans is caused by the species ***G. lamblia***, which, similar to ***C. parvum***, has a very wide host spectrum. The lifecycle encompasses two stages, the trophozoite, which is the infective form, and the cyst stage, which is the resistant form, or resting stage. The cyst stage is excreted with faeces and can survive for up to 2 months outside the host.

For both protozoans, only few (oo) cysts are enough to cause illness.

The method

In this study a method has been optimised and validated to demonstrate *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. The method has been validated through determination of the recovery rate by adding (spiking) a known number of oocysts and cysts to water samples. Six water samples of different quality were employed for the validation; three clean water samples from the waterworks at Kingosvej, Mørkskov, and Regnemark, plus three raw water samples from Kingosvej and Mørkskov waterworks as well as Ejby raw water drilling.

Ten filtrations, each of 10 litres, have been performed with each of the following cyst/oocyst numbers added: 100, 1,000, and 10,000. Following every tenth filtration, a positive control (5 l pure water with addition of the

same number of cysts/oocyst as the previous water sample, 100, 1,000 or 10,000) and a negative control (5 l pure water) were carried out. The water samples were filtered through a 2µm membrane filter, concentrated by centrifugation and immunomagnetic separation (IMS), and finally stained and read by immunofluorescence.

In the course of the project, the methods for concentration and detection of ***Cryptosporidium*** and ***Giardia*** in water have been optimised at various stages. The rubber tubes were changed in the filtration process to ensure a protozoan-free status. When liberating the (oo)cysts from the filter in the 'pulsifier' employed, the volume of water as well as the general procedure were adjusted to minimize loss of (oo)cysts. The concentration of the filtrate was performed at an adjusted centrifugation configuration, and the process of microscopy was adjusted according to the sample content of (oo)cysts.

As part of the validation it was examined whether there would be an interaction between ***Giardia*** and ***Cryptosporidium***, such that, e.g., a high concentration of one might influence the recovery of the other. These experiments were carried out using tap water with addition of 10,000 of one protozoan and 100 of the other, and vice versa. For each combination 5 filtrations were performed. Additionally, the results of the positive controls from experiments with 10,000 (oo)cysts of each protozoan added were compared with the interaction experiments.

Studies using raw water showed less than expected recovery of ***Cryptosporidium*** oocysts. To verify this, the oocysts were captured by the filter, and for some samples a 50µl sub-sample was extracted after filtration and before IMS. These sub-samples were stained for immunofluorescence microscopy according to the manufacturer's directions. In all cases, oocysts could be demonstrated in the sample.

Results

The recovery rate of (oo)cysts was not influenced negatively by a high concentration of one or both protozoans and was not significantly different at the different spiking levels of *Giardia* and *Cryptosporidium*, respectively. This observation enabled an evaluation of the recovery rate for each protozoan in the water types examined, without using a correcting factor for any interaction.

In order to calculate the recovery rate for the two protozoans in the various water types, the spiking dose was checked by counting three sub-samples. The results of the dose counts varied considerably, but were not significantly different between the two protozoans.

The recovery of *Giardia* in raw water varied between 39.3-77.3%, with an average of 54.6-62.3%, and with greatest variation in samples spiked with low numbers. The staining of the *Giardia* cysts was not satisfactory in any of the raw water samples.

The recovery rate for ***Giardia*** cysts in clean water varied between 26.8-63.4% with an average of 41.5-52.8%. The variation in recovery rate was greatest in samples with low spiking dose. Only for samples from Kingosvej with 1,000 and 10,000 cysts added, respectively, was recovery significantly lower ($P < 0.05$) than that of the other clean water types, which did not differ. If the

much lower Kingosvej clean water results were omitted, the recovery rate would be 48.9-59.4 %.

The recovery of ***Cryptosporidium*** in raw water varied between 0.1-6.0%, with an average of 0.2-3.2%. The variation of the recovery rate was greatest in samples with 100 oocysts added.

The recovery of ***Cryptosporidium*** oocysts from clean water samples was within an interval of 25-51.1%, with an average of 37.0-38.7%. The greatest variation was seen in samples with 00 oocysts added, whereas the standard deviation of samples spiked with 10,000 oocysts was less.

As is described above, we found that for both raw water and clean water the recovery of ***Giardia*** was greater than that of ***Cryptosporidium***. This may be due to the greater size of the ***Giardia*** cysts improving their capture on the membrane filter. Furthermore, the producer of the IMS kit, Dynal Biotech, states that the binding between ***Giardia*** and Dynabeads anti-***Giardia*** is stronger than the binding between ***Cryptosporidium*** and Dynabeads anti-***Cryptosporidium***. This could be the reason that many ***Giardia*** cysts are recovered from raw water but no, or only few, ***Cryptosporidium*** oocysts.

It is a well-known problem that ***Cryptosporidium*** oocysts as well as ***Giardia*** cysts have a tendency to clump together and sediment, which complicates a precise spiking of the samples. Generally it must be assumed that the large standard deviation of the recovery rates of the protozoans, not least in samples with 100 (oo)cysts added, is caused by both a variation in the actual spiking dose and a methodology-related (filtration, IMS, fluorescence labelling) variation.

The chemical and biological constitution of the raw water types is generally not very different from that of the clean water. However, there is a considerable amount of iron, especially in Ejby raw water (3.7mg/l), and even in Kingosvej raw water (0.05-0.09mg/l), which contains the least iron of the three raw water types, the iron content is higher than in any of the clean water types. In all the raw water types, the content of ammonium is markedly higher than in the clean water samples. Additionally it appears that the raw water contains more bicarbonate and sulphur oxide than the clean water, although this data is not available for all the water types. In contrast to ***Giardia***, the recovery of ***Cryptosporidium*** in raw water was practically non-existent. The ***cryptosporidia*** were demonstrated in sub-samples of filtration and hence we concluded that the IMS process did not function adequately in raw water. This could be related to the amount of iron in the raw water, or the significant amount of sediment which was characteristic of the raw water, even though the sediment amount did not exceed the IMS process directions. The binding between the ***Cryptosporidium*** oocysts and Dynabeads anti-***Cryptosporidium*** is not strong and it is conceivable that compounds in the sediment further weaken the binding.

No lower detection limit has been determined for the method, however, based on the recovery of ***Cryptosporidium*** oocysts of at least 25%, it is expected that the method may detect 2-3 oocysts in samples with only 10 oocysts. For ***Giardia*** the method can detect 4-6 cysts in samples containing only 10 cysts. This validation process has determined no upper detection limit, but it is likely to depend on the IMS process.

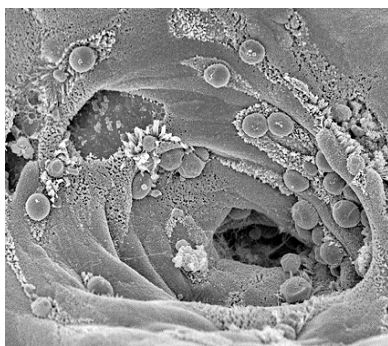
1 Baggrund

Beskrivelsen af omfattende vandbårne epidemier forårsaget af ***Cryptosporidium*** og ***Giardia*** i drikkevand, har i den senere tid været en medvirkende årsag til stigende interesse for udvikling og optimering af metoder til påvisning af disse zoonotiske parasitter i forskellige materialer, herunder råvand og drikkevand.

Cryptosporidium parvum og ***Giardia lamblia*** (syn. ***G. intestinalis*** og ***G. duodenalis***) er encellede parasitter, der kan inficere mavetarm-kanalen hos såvel mennesker som dyr. Parasitterne er ubikvitært forekommende i naturen og blandt de almindeligste ikke-bakterielle årsager til diarré (Craun, 1990; Current & Garcia, 1991).

C. parvum er den hyppigste årsag til cryptosporidiose hos pattedyr inklusive mennesker og opdeles i minimum 2 undergrupper: Genotype I, der kun er blevet påvist hos mennesker og andre primater; samt genotype II, der er vidt udbredt hos såvel dyr som mennesker. Cryptosporidiose er primært en infektion hos unge individer bl.a. kalve og lam, men også hunde og katte kan udgøre en smitekilde. Hos mennesker forekommer cryptosporidiose især hos børn under 5 år. Risikofaktorer er alder, underernæring, tilknytning til landbruget, rejseaktivitet, nedsat immunforsvar (kemoterapi, AIDS m.v.), men alle kan rammes.

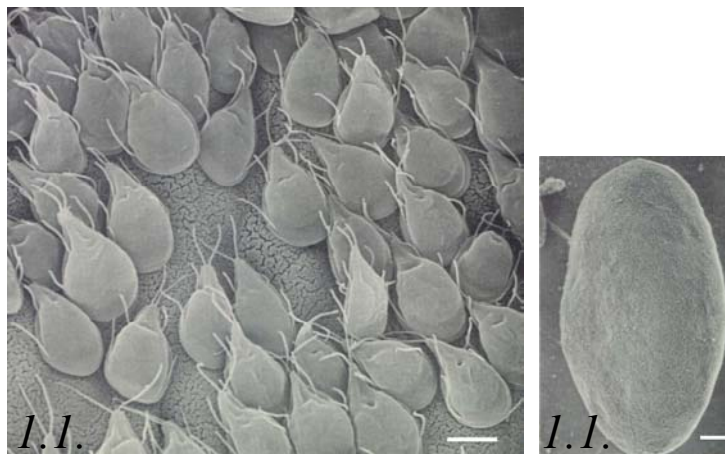
Cryptosporidier udskilles via fæces som oocyster indeholdende 4 sporozoit. Oocysterne udskilles i meget store mængder, er straks infektiøse og endvidere modstandsdygtige overfor alle almindeligt anvendte desinfektionsmidler herunder klor i koncentrationer, der kan anvendes til behandling af drikke- / badevand. I køligt, fugtigt miljø kan oocysterne overleve flere måneder (Robertson et al., 1992). Smitte finder sted ved direkte kontakt (person-person, dyr-menneske) eller indirekte via optagelse af oocyster fra bl.a. drikkevand, badevand og levnedsmidler forurenede med fækalier. I mavetarmkanalen brister oocystevæggen og sporozoitene trænger ind i tyndtarmens epithelceller, hvor opformeringen finder sted.



Figur 1. *Cryptosporidium* oocyster i tarmkanal.

Giardiasis hos mennesker forårsages af arten ***G. lamblia***, der i lighed med ***C. parvum*** har et meget bredt værtsspektrum. ***G. lamblia*** kan vha. molekylære teknikker inddeles i flere genotyper, hvoraf gruppe A og B har human

betydning (Thompson et al., 2000). Livscyklus omfatter to stadier: Trophozoit stadiet, som er det infektiøse stadium og cyste stadiet, som er den resistente form, der udskilles med fæces (Figur 2). Cysten kan overleve op til 2 måneder udenfor værten (Tessier et al., 1999).



Figur 2. Scanning elektronmikroskopi af *Giardia*. T.v.: Trophozoiter siddende på en tarmvillus (målestok 5 µm). T.h.: Cyste (målestok 1 µm) (Bemrick & Erlandsen, 1988).

Den infektiøse dosis er lav for såvel *C. parvum* som *G. lamblia*, hhv. 9-1042 og 10-100 (Rendtorff, 1954; Dupont et al., 1995; Okhuysen et al., 1999). Infektionerne kan være asymptomatiske, men omfatter som regel opkastning og diarré. Hos normale individer med et velfungerende immunforsvar vil forløbet være tidsbegrænset med en varighed på 2-12 dage. Hos svækkede patienter vil symptomerne ved cryptosporidiose dog ofte være langt alvorligere, i mange tilfælde med dødelig udgang, idet der ikke findes nogen effektiv terapi. Infektioner med *G. lamblia* kan som regel behandles effektivt med metronidazol (Tessier et al., 1999; Martins & Guerrant, 1995).

Det estimerede antal diagnosticerede humane tilfælde af cryptosporidiose og giardiasis i Danmark er hhv. 200 (anon., 2002) og 2000 årligt (Eskild Petersen, Statens Serum Institut, pers. komm.). Eftersom infektionerne ikke er anmeldningspligtige, kendes den reelle incidens dog ikke.

Større humane udbrud i udlandet af cryptosporidiose og giardiasis har primært været forårsaget af kontamineret drikkevand, såvel grundvand som overfladevand. I de fleste tilfælde er grundvandet blevet forurenet via nedsivende overfladevand, afløb fra marker, gylle og lign., mens årsagen til forurening af overfladevandet i mange tilfælde ikke har kunnet påvises (Smith & Ahmad, 1997; Fricker & Crabb, 1998). Fra udlandet kendes talrige vandbårne udbrud af cryptosporidiosis og giardiasis, herunder udbruddet i Milwaukee, der omfattede ca. 403.000 mennesker (MacKenzie et al., 1994; Fricker & Crabb, 1998). Som følge heraf er løbende kontrol med forekomsten af *Cryptosporidium* og *Giardia* i større vandværker og områder, hvorfra man tager overfladevand til drikkevand blevet påbudt i England og USA

Sektion for parasitologi ved Danmarks Veterinærinstitut har på baggrund af flere års arbejde med protozoer en vis ekspertise indenfor området og har på Miljøstyrelsens foranledning ved tidligere lejligheder bl.a. undersøgt drikke- og

spildevand for ***Cryptosporidium*** og ***Giardia*** med påvisning af protozoerne til følge. Miljøstyrelsen har derfor ønsket at få optimeret og valideret de anvendte opkoncentrerings- og detektionsteknikker.

2 Metodebeskrivelse

I det nærværende studie er en metode til påvisning af ***Cryptosporidium*** oocyster og ***Giardia*** cyster blevet optimeret og valideret. Metoden er valideret via bestemmelse af genfindelsesprocenten ved tilsætning af kendte mængder oocyster og cyster i forskellige koncentrationer til vandprøverne. Til valideringen er anvendt 6 vandprøver af forskellig kvalitet. For hver vandprøve er der foretaget 10 filtreringer à 10 liter med hver af de følgende cyste/oocyste koncentrationer: 100, 1000 og 10.000. Vandprøverne er blevet filtreret, opkoncentreret vha. centrifugering og immunomagnetisk separation (IMS), og sluttelig farvet og aflæst vha. immunofluorescens.

2.1 Filtrering og opkoncentrering af vandprøver

Formål

Formålet med dette trin er at filtrere vandprøver (10 l) til undersøgelse for ***Cryptosporidium*** og ***Giardia***. Opkoncentrering af filtratet sker vha. centrifugering, således at diagnostik via immunomagnetisk separation (IMS) og immunofluorescens (IF) efterfølgende kan foretages.

Materialer

Membranfilterholder, rustfrit stål, d: 142 mm (Millipore, DK)
Isopore filtre, 2 µm, 142 mm (Millipore, DK)
5 l konisk sugokolbe
Silikonegummislange, d: 6 mm, godstykkelse 2 mm (Bie & Berntsen, DK)
Sterile engangspincetter (Maersk Medical A/S, DK)
Krystallisationsskåle, d: 19 cm (Duran, Schott, Tyskland)
LDPE plastik poser (100 x 200 x 0,07 mm) (Microgen, UK)
Pulsifier (Microgen, UK)
Spidsbundede centrifugerør med skruelåg, 50 ml (Corning, USA)
Centrifuge (Hettich Rotanta, Tyskland)

Positiv kontrol: 5 l ionbyttet (eller Milli-Q) vand tilsat 500 ***Cryptosporidium parvum*** oocyster ('Copenhagen calf laboratory isolate', CPB-0) samt 500 ***Giardia*** cyster (***Giardia lamblia*** H3 isolat i 5% formalin/PBS, Waterborne Inc. New Orleans, USA)
Negativ kontrol: 5 l ionbyttet vand.

(Til validering af metoden er den positive kontrol blevet tilsat samme antal oocyster/cyster som de egentlige vandprøver.)

Filtrering

Generelt: Ved filtrering bruges handsker, og der arbejdes så sterilt som muligt. Filtre samt indvendig side af filterholderen berøres ikke.

1. Filterholderen vaskes ved 60°C og autoklaveres.
2. Et isopore membran filter (2,0 µm) monteres vha. en steril pincet, således at den glatte side vender opad. Undgå at røre ved indersiden af

- filterholderen. (se yderligere 'instruks om brug og vedligeholdelse af filterholder, Sartorius SM 16275') (Bilag 2).
3. Filterholderen monteres på en 5 l konisk sugokolbe tilsluttet vakuum.
 4. Vandprøven rystes. En steril silikonegummislange monteres på filterholderen og føres helt til bunds i vandprøven. Dette skal ske sterilt uden berøring af den del af slangen, som kommer i direkte kontakt med vandet.
 5. Åben for vakuumhanen (20-40 mbar).
 6. Når halvdelen af vandprøven er filtreret (ca. 5 l) tømmes sugokolben, idet filterholderen afmonteres og stilles på en 'trefod'. Det filtrerede vand hældes direkte i vasken. Filterholderen remonteres og resten af vandprøven filtreres.
 7. Silikoneslangen afmonteres og smides til vask. Skruerne på filterholderen løsnes forsigtigt, og den øverste del af filterholderen lægges til side på 'trefoden'. Bevar vakuomet indtil den øverste del af filterholderen er fjernet. Dette forhindrer, at der opsamles vand over filtret.
 8. Isopore membran filtret, hvorpå eventuelle ***Cryptosporidium/Giardia*** vil være opfanget, overføres forsigtigt med en steril pincet til en krystallisationsskål, hvor der forinden er ophædt 100 ml ionbyttet vand. Filtret skal være dækket med vand og må ikke ligge foldet.
 9. Filtret skylles ved at skvulpe vandet forsigtigt rundt i skålen i 2 minutter.
 10. Vandet hældes forsigtigt over i 2 50 ml centrifugerør.
 11. Filtret rives i 8-10 stykker vha. 2 sterile pincetter og overføres til en LDPE pose.
 12. Den øverste del af filterholderen skylles med 100 ml ionbyttet vand, som opsamles i krystallisationsskålen. Vandet overføres fra skålen til LDPE posen.
 13. Posen indeholdende 100 ml vand og filterstykker indsættes i 'pulsifieren' og rystes i 2 minutter, hvorefter filtret fjernes vha. en steril pincet.
 14. Vandet fordeles på yderligere 2 50 ml centrifugerør, så der i alt er 4 centrifugerør pr. prøve. Centrifugerørene mærkes med prøvens nummer og stilles på køl (5°C) indtil centrifugering.
 15. Over- og underdelen af filterholderen skylles manuelt med hver 500 ml ionbyttet vand.
 16. Filterholderen uden filter påsættes den tømte sugokolbe. En ny silikoneslange monteres og overføres sterilt til en glasflaske med ca. 5 l ionbyttet vand, som suges gennem filterholderen.
 17. Filtrering af en ny vandprøve gennemføres ved gentagelse af trin 2-16.

NB. Efter hver 10. prøve medtages en negativ og en positiv kontrol. Efter en positiv kontrol skal filterholderen sendes til vask og autoklivering.

Opkoncentrering ved centrifugering

1. Prøverne centrifugeres med låg på i 15 minutter ved 1900 x G, ingen bremse.
2. Supernatanten afsuges vha. en 5 ml steril målepipette tilsluttet vakuum. Der suges fra toppen ned til 10 ml. Indholdet af de 4 rør samles i ét rør. De 4 rør skylles efter med ca. 2,5 ml ionbyttet vand, så den samlede væskemængde i det ene rør bliver 50 ml.
3. Prøverne centrifugeres med låg på i 15 minutter ved 1900 x G, ingen bremse.
4. Supernatanten afsuges til 10 ml. Prøven stilles på køl ved 5°C indtil yderligere behandling. Prøven bør ikke henstå i mere end 2 uger.

2.2 Oprensning af *Giardia* cyster og *Cryptosporidium* oocyster fra vand vha. immunomagnetisk separation

Formål

Oprensning af ***Giardia*** cyster hhv. ***Cryptosporidium*** oocyster med henblik på efterfølgende detektion vha. immunofluorescens. De oprensede cyster/oocyster er relativt rene og derfor tillige velegnede til DNA ekstraktion og -analyse.

Materialer

Dynabeads GC-Combo kit (DynaL A/S, Norge)
DynaL sample mixer (DynaL A/S, Norge)
Magnetic particle concentrator (DynaL MPC-1) (DynaL A/S, Norge)
Magnetic particle concentrator for microcentrifuge tubes (DynaL MPC-S) (DynaL A/S, Norge)
DynaL L10 tubes (DynaL A/S, Norge)
DynaL spot-On, objektglas (DynaL A/S, Norge)
Vortex mixer
Eppendorff rør (1,5 ml)
Pasteur pipetter
Pipette spidser (10-1000 µl)
Ionbyttet vand
HCl opløsning 0,1 M (saltsyre)

Forberedelse af reagenser

Alle materialer inkl. vandprøven skal have stuetemperatur (15-25°C)

Til hver prøve anvendes:

- 1 ml 1x SLTM-Buffer A
- 1 ml 10x SLTM-Buffer A
- 1 ml 10x SLTM-Buffer B

- Forbered 1 ml 1x SLTM-Buffer A ud fra 10x SLTM-Buffer A. (10x SLTM-Buffer A opløsningen skal være fri for krystaller. Disse fjernes lettest ved at holde bufferen i bevægelse, indtil krystallerne er opløst). 100 µl 10x SLTM-Buffer A fortyndes til 1 ml ved tilsætning af ionbyttet vand. Der bruges 1 ml 1x SLTM-Buffer A for hver 10 ml prøve, der opkoncentreres med Dynal IMS.
- Fortyndingen af 1 ml 1x SLTM-Buffer A opbevares i et mærket Eppendorff rør til brug senere i processen.

NB! Hvis bundfaldet i den enkelte prøve overstiger 0,5 ml svarende til ca. 5%, bør man ifølge Dynal's forskrifter fordele prøven i flere rør med hver maksimalt 0,5 ml bundfald og udføre IMS for samtlige prøver.

Binding af *Cryptosporidium* og *Giardia* til Dynabeads

1. I et Dynal L10 rør mærket med prøvens navn afpipetteres 1 ml 10x SLTM-Buffer A og 1 ml 10x SLTM-Buffer B, hvorefter vandprøven straks tilsættes.

2. Vortex Dynabeads anti-***Cryptosporidium*** beholderen i 10 sekunder. Det sikres, at alle beads er resuspenderede ved at vende beholderen på hovedet, så det kan ses, om der er udfældninger på bunden. Tilsæt 100 µl Dynabeads anti-***Cryptosporidium*** til Dynal L10 røret indeholdende vandprøven og SLTM-Buffer.
3. Vortex Dynabeads anti-***Giardia*** beholderen i 10 sekunder. Det sikres, at alle beads er resuspenderede ved at vende beholderen på hovedet, så det kan ses, om der er udfældninger på bunden. Tilsæt 100 µl Dynabeads anti-***Giardia*** til Dynal L10 røret indeholdende den koncentrerede vandprøve, Dynabeads anti-***Cryptosporidium*** og SLTM-Buffer.
4. Sæt Dynal L10 rørene fast i sample mixeren (Dynal-MX1 eller Dynal Sample Mixer) og lad den rotere med 15-20 rotationer pr. minut (RPM) i en time ved stuetemperatur. På Dynal Sample Mixer skal SPEED knappen være drejet ned under 0, hvor der står 18 i et blåt felt; indikator knappen vil da lyse grønt og Sample Mixer køre med 15-20 RPM.
7. Efter blanding i mindst en time (max. 2 timer), fjernes prøven fra mixeren og placeres i den magnetiske partikel koncentrator, Dynal MPC-1, med rørets flade side mod magneten. Uden at fjerne røret fra Dynal MPC-1 vendes denne, så røret ligger vandret over magneten. Vip forsigtigt røret fra side til side ca. 90° så top og bund skiftevis er oppe og nede. Fortsæt i 2 minutter med ca. 1 vip i sekundet.
8. Det er nødvendigt, at røret er i konstant bevægelse i de 2 minutter for at hindre uspecifik binding af små molekyler. Hvis prøven i Dynal MPC-1 henstår i over 10 sekunder gentages trin 7.
9. Hæv røret til lodret stilling. Skru låget hurtigt af og hæld/dekanter supernatanten hurtigt fra i en passende affaldsbeholder. Under denne procedure skal røret forblive i magnetholderen liggende vandret under magneten, så man ikke ved dekanteringen forstyrrer de partikler, som sidder op imod magneten.
10. Fjern røret fra Dynal MPC-1 og resuspender prøven med 1 ml 1x SLTM-Buffer A (fremstillet tidligere). Mix meget forsigtigt for at resuspendere alt materiale i røret. Vortex ikke.
11. Overfør prøven kvantitativt fra Dynal L10 røret til et Eppendorff rør, mærket med prøvens navn.
12. Sæt Eppendorff røret i den anden magnetiske partikel koncentrator (Dynal MPC-S), med magnetstripen på plads. Partikel koncentratoren rulles nu forsigtigt frem og tilbage 90°. Fortsæt i 1 minut med ca. 1 rul pr. sekund. Ved slutningen af dette trin skulle en klump Dynabeads kunne ses på bagsiden af røret.
13. Straks efter afsuges supernatanten fra rør og låg. Pas på ikke at berøre materialet på bagsiden af røret. Hvis flere prøver analyseres samtidigt, rulles partikel koncentratoren tre gange før supernatanten suges af den næste prøve. Fjern ikke rørene fra Dynal MPC-S under denne proces.

Dissociation af Dynabeads – cyste/-oocyste kompleks

14. Når supernatanten er frasuget alle prøverne, fjernes magnetstripen fra Dynal MPC-S.
15. Tilsæt 50 µl HCl til prøven og vortex grundigt i 10 sekunder. Sæt røret i Dynal MPC-S (uden magnetstribe) eller et rack til Eppendorff rør og lad prøven stå lodret i 10 minutter ved stuetemperatur.
16. Vortex prøven grundigt i 10 sekunder og sæt den i Dynal MPC-S. Alt prøvematerialet skal være i bunden af røret.
17. Når alle prøver er placeret i Dynal MPC-S, isættes magnetstripen og holderen henstår uforstyrret i ca. 10 sekunder.

18. Marker et Dynal Spot-On objektglas med prøvens nummer.
19. Overfør prøven fra røret, uden at berøre materialet der sidder på bagsiden af røret, til en brønd på objektglasset og lad den lufttørre. Den positive og negative prøve fikseres og farves med Merifluor **Cryptosporidium / Giardia** kit (Meridian Diagnostics, Inc.; Italien) i henhold til forskriften. Såfremt disse farves tilfredsstillende, farves resten af prøverne.

Skulle den positive eller negative kontrol afvige fra det forventede, bør man kassere de pågældende prøver og starte forfra med filtreringen.

Efter lufttørring bør man kun farve de prøver, som man forventer at kunne aflæse samme dag. U-farvede prøver kan opbevares på køl i op til et par dage. Ved længere opbevaring vil prøverne kunne miste evnen til at farves ordentligt.

2.3 Detektion af *Cryptosporidium* og *Giardia* vha. immunofluorescens

Formål

Detektion af ***Cryptosporidium / Giardia*** i oocyste/cyste suspensioner

Materialer

Merifluor ***Cryptosporidium / Giardia*** kit (Meridian Diagnostics, Inc.; Italien)

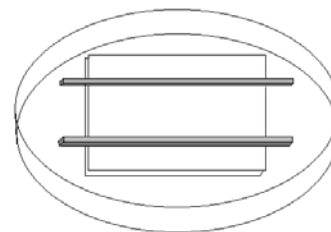
Metanol (100%)

Ionbyttet vand

Dækglas (22 x 50 mm)

Pipette spidser (5-200 µl)

Fugtkammer (En stor petriskål med låg, hvori lidt fugtigt papir lægges i bunden. Ovenpå papiret placeres 2 træpinde som støtte for objektglassene).



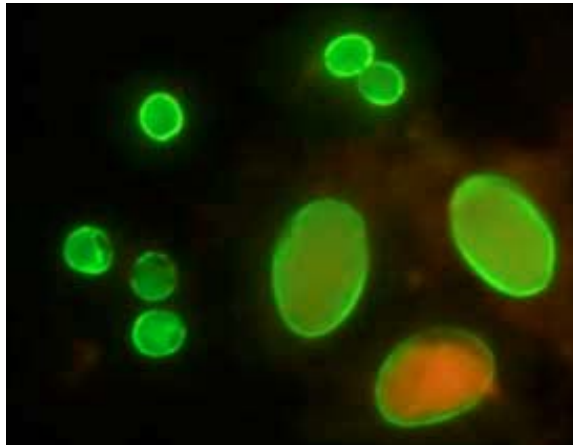
Fluorescens mikroskop (excitation 490 nm /

emission 520 nm) med 25x og 40x objektiv (250 og 400x forstørrelse).

Farvning og aflæsning

1. Prøven, som er overført til et Dynal Spot-On objektglas, indtørres fuldstændigt og fikseres ved tilsætning af 50 µl metanol. Objektglasset henstår ved stuetemperatur, indtil metanolen er fordampet.
2. En dråbe detektionsreagens samt en dråbe kontrastfarve tilsættes hver brønd. Det er vigtigt, at hele præparatet er dækket.
3. Prøven inkuberes i 30 minutter ved stuetemperatur (fugtkammer + mørke).
4. Herefter vaskes prøven med 1 x vaskebuffer eller PBS pH 7, idet reagenserne forsigtigt afsuges med pipette, hvorefter brøndene skylles med 50 µl vaskebuffer. Gentages 3-5 gange. Undgå at ridse præparatets overflade.
5. Overflødig vaskebuffer fjernes ved forsigtigt at banke siden af objektglasset mod en serviet. Undgå at præparatet udtørres fuldstændigt.
6. Hver brønd tilsættes 1-2 dråber Mounting Medium, og dækglas lægges over uden at trykke.
7. Der mikroskoperes ved 250 x forstørrelse. Positive fund eftervises ved 400 x forstørrelse. ***Cryptosporidium parvum*** fremtræder som 4,5 x 5 µm runde til let ovale, grønt fluorescerende organismer i nogle tilfælde med synlig

'sutur linie'. **Giardia** cyster er runde til ovale, 8-12 μm og grønt fluorescerende (Figur 3).



Figur 3. Fluorescensmikroskopisk billede af *Cryptosporidium* oocyster (øverst til venstre) og *Giardia* cyster (nederst til højre). (<http://www.dpd.cdc.gov>).

Tabel 1. Eksempler på forskellige arter af *Cryptosporidium* og *Giardia*, som kan findes i bl. a. vand. (Bemærk: Sikker artsdifferentiering bør kun foretages på baggrund af morfologiske undersøgelser (størrelse og form) kombineret med DNA analyse).

Parasit art	Vært	Størrelse (variation)
<i>C. parvum</i>	pattedyr – mennesker	4,8 x 5,0 μm (4,2-5,0 x 4,5-5,4 μm)
<i>C. muris</i>	pattedyr	7,4 x 5,6 μm (6,6-7,9 x 5,3-6,5 μm)
<i>C. felis</i>	pattedyr - mennesker	(3,8-4,8 x 4,6-4,9 μm)
<i>C. meleagridis</i>	fugle	5,2 x 4,6 μm (4,5-6,0 x 4,2-5,3 μm)
<i>C. baileyi</i>	fugle	6,2 x 4,6 μm (5,6-6,3 x 4,5-4,8 μm)
<i>G. lamblia (duodenalis)</i>	pattedyr - mennesker	(6-8 x 12-15 μm)
<i>G. muris</i>	gnavere	(5-7 x 9-12 μm)

3 Metode optimering

I nærværende projekt er metoderne til opkoncentrering og detektion af ***Cryptosporidium*** og ***Giardia*** i vandprøver blevet optimeret mht. nedenstående punkter.

- ***Filtrering***
Efter filtrering af en prøve udskiftes gummislangen, der anvendes til opsugning af prøven, så der ved gennemskylning af filterholderen bruges en ren slange. Dette gøres for at sikre, at skyllevandet er helt frit for oocyster/cyster, der ellers kan sidde tilbage i slangen efter filtreringen.
- ***Frigørelse af oocyster/cyster fra filtret***
Vandet, som filteret skylles i, skal ikke genbruges i pulsifieren. Vandmængden, der anvendes til skylning, er reduceret fra 150 til 100 ml. I pulsifieren bliver der tilsvarende brugt 100 ml. Dette betyder en forøgelse af den totale vandmængde fra 150 til 200 ml. Ved at bruge rent vand i pulsifieren undgås det, at de oocyster/cyster, som er skyllet af filtret i krystallisationsskålen, tabes ved overførsel til LDPE posen, hvor de evt. kunne tænkes at sidde fast i filteret eller posen. Inden filtret overføres til LDPE posen, skal det rives i stykker for at undgå, at det klapper sammen i posen. Den samlede tid i pulsifieren er nedsat fra 5 til 2 minutter, for at undgå at oocysterne/cysterne ødelægges, samt for at mindske risikoen for at posen går i stykker, hvilket ellers kan ske ved den lidt hårde behandling i pulsifieren.
- ***Opkoncentrering af filtrat***
Centrifugering af prøverne er foretaget ved 1900 x G (3000 rpm) i stedet for ved 2580 x G (3500 rpm) som oprindeligt beskrevet. Centrifugeringstiden er samtidig øget fra 10 til 15 minutter for at kompensere for den nedsatte G-værdi. Denne ændring er foretaget, idet centrifugerørerne initialt blev mast flade i bunden ved den høje omdrejningshastighed. I et enkelt tilfælde gik der hul i centrifugerøret, hvilket medførte tab af prøven.
- ***Aflæsning***
Ved aflæsning af prøver med høje koncentrationer kan det være nødvendigt at mikroskopere ved 400 x forstørrelse for at undgå for mange oocyster/cyster pr. synsfelt. Dette vurderes for hver enkelt prøve.

4 Metodevalidering

Til validering af metoden blev anvendt 6 vandtyper af forskellig kvalitet: Tre rentvandsprøver fra hhv. Kingosvej, Mørkskov og Regnemark vandværk, samt 3 råvandsprøver fra Kingosvej og Mørkskov vandværk tillige med Ejby råvandsboring. Parametre for vandkvaliteten er angivet i Tabel 2, og en sammenfatning af vandkvaliteten er angivet nedenfor.

Tabel 2. Kemiske og biologiske parametre for de anvendte vandtyper (Danmarks Miljøundersøgelser, 2001) *NVOC - ikke-flygtige organiske kulstofforbindelser; ** i.m.- ikke måleligt

Parameter	Måle- enhed	Grænse- værdi	Ejby råvand	Regnemark rent vand	Kingosvej råvand	Kingosvej rent vand	Mørkskov råvand	Mørkskov rent vand
Temperatur	°C	12		15,4	11	9	9	
pH	PH	8,5		7	7,4-7,5	8	7,0-7,1	8
Ledningsevne	mS/m	(>30)		65	107-115	75	67-227	
Permanganat- tal	mg/l	12	15	11	11-15	9	5-12	
NVOC*	mg/l	4	4,67	4			2,4	
Hårdhed total	°dH	(5-30)	35	21				21,4
Bikarbonat	mg HCO ₃ /l	(>100)		167	523-556		364-427	
Chlorid	Mg Cl/l	300		63	85-131	43	38-504	
Phosphor, total	Mg P/l	0,15		<0,005	<0,01- 0,01	0,06	0,012- 0,015	
Ilt	Mg O ₂ /l	(>5)		8,6	<0,1		0,6-2,47	
Nitrat	Mg NO ₃ /l	50		11	<1	6	<0,2-1	
Nitrit	Mg NO ₂ /l	0,1		0,005	<0,01	<0,01	0,002	
Ammonium	mg/l	0,5	0,87	0,3	0,70-0,98	<0,01	0,69-0,82	
Mangan	mg/l	0,05		0,005	<0,005	<0,005	0,002- 0,004	
Jern	mg/l	0,2	3,7	0,01	0,05-0,09	0,02	0,21-0,46	
Sulfat	Mg SO ₄ /l	250		230	<1	13	8-41	
Svovllilte	Mg H ₂ S/l	i.m. **	0,05	<0,005	12-36		0,26-1,4	
Metan	Mg CH ₄ /l	i.m.	0,02	<0,01	17-20		0,27-0,61	
Coliforme	Antal/100 ml	i.m.		<1				
Kimtal 21°C	Antal/ml	50		<1		100	11	
Kimtal 37°C	Antal/ml	5		<1		<1		
Anioniske detergenter	mg/l	0,1	0,011				0,005- 0,011	

Ejby råvand. Vand med højt indhold af jern, kalk og ammonium. Desuden et middel niveau af metan samt NVOC.

Regnemark rent vand. Vand med lave koncentrationer af jern, svovlbrinte og metan. Indholdet af NVOC ligger på grænseværdien på 4 mg/l. Ammonium indholdet er højt.

Kingsvej råvand. Vandet med et højt indhold af metan og svovlbrinte samt noget (middel) ammonium.

Kingsvej rent vand. Vand med et relativt højt indhold af organisk stof. Vandet opfylder kvalitetskravene til rent vand, dvs. metan og svovlbrinte fjernes. Ammonium er under grænseværdien.

Mørkskov råvand. Vandet med et højt indhold af jern, samt noget ammonium (middel), svovlbrinte (middel) og metan (middel). Desuden relativt hårdt vand med et højt bikarbonat-indhold.

Mørkskov rent vand. Jern, metan og svovlbrinte formodes at være fjernet, således at grænseværdierne er overholdt (meget lave niveauer).

Parasitmateriale

Cryptosporidium parvum oocyster ('Copenhagen calf laboratory isolate', CPB-0) samt **Giardia lamblia** cyster (H3 isolat i 5% formalin/PBS, Waterborne Inc. New Orleans, USA) blev anvendt til podning af prøverne.

For hver vandprøve blev der foretaget 10 filtreringer à 10 liter hver med følgende cyste/oocyste podningsdoser: 100, 1000 og 10.000. I alt blev der foretaget 30 filtreringer for hver vandtype (se tabel 3).

Tabel 3. Oversigt over de forskellige analyser udført i forbindelse med validering af metoden.

Vandtype	Antal prøver à 10 l	Oocyste/cyster pr. 10 l vand			Vandtyper
Råvand	10	100	1000	10.000	3
Rent vand	10	100	1000	10.000	3
Rent vand	5	100 / 10.000			1
Rent vand	5	10.000 / 100			1

For hver 10. filtrering blev der medtaget en positiv kontrol (5 l milli-Q eller ionbyttet vand tilsat det samme antal cyster/oocyster som de forudgående vandprøver: 100, 1000 eller 10.000) og en negativ kontrol (5 l milli-Q eller ionbyttet vand).

Filtrering, oprensning og detektion blev gennemført ifølge metodebeskrivelsen. Prøverne blev farvet og aflæst senest 2 dage efter IMS-oprensning.

Til podning af vandprøverne blev oocyste/cyste brugs-opløsninger forberedt ud fra en stamopløsning med en kendt oocyste/cyste koncentration bestemt vha. hæmocytometer. Hver brugs-opløsning indeholdt det pågældende antal oocyster/cyster pr. ml som skulle tilsættes vandprøven. For at kontrollere den tilsatte dosis af hhv. **Giardia** cyster og **Cryptosporidium** oocyster, blev for hver ny podning parallelt udtaget 3 x 100 µl af brugs-opløsningerne på nogle Dynal spot-On objektglas. Disse stod til tørring, hvorefter de blev farvet ifølge

forskriften. Podningsdosen blev udregnet fra gennemsnittet af de tre tællinger og resultaterne er anført i tabel 5.

Som led i valideringen blev det undersøgt, hvorvidt der var interaktion mellem ***Giardia*** og ***Cryptosporidium***, idet eksempelvis høj koncentration af den ene art kunne tænkes at påvirke genfindelsen af den anden art. Disse forsøg blev udført i postevand, der blev tilsat hhv. 10.000 af den ene parasit og 100 af den anden og vice versa. For hver kombination blev der lavet 5 filtreringer. Desuden blev resultaterne af de positive kontroller, fra forsøg tilsat 10.000 af hver parasit, sammenlignet med interaktionsforsøgene, for at vurdere hvorvidt en samtidig høj koncentration af begge parasitter havde en negativ effekt på genfindelsesprocenten.

Forsøg med råvand viste, at der ikke var den forventede genfindelse af ***Cryptosporidium*** oocyster. For at verificere at oocysterne blev fanget i filtret, blev der efter nogle enkelte filtreringer og inden IMS udtaget 50 µl af prøven på et objektglas. Prøven blev farvet efter Merifluors forskrifter og aflæst i fluorescens mikroskop. I alle tilfælde kunne der påvises oocyster i prøven efter filtrering.

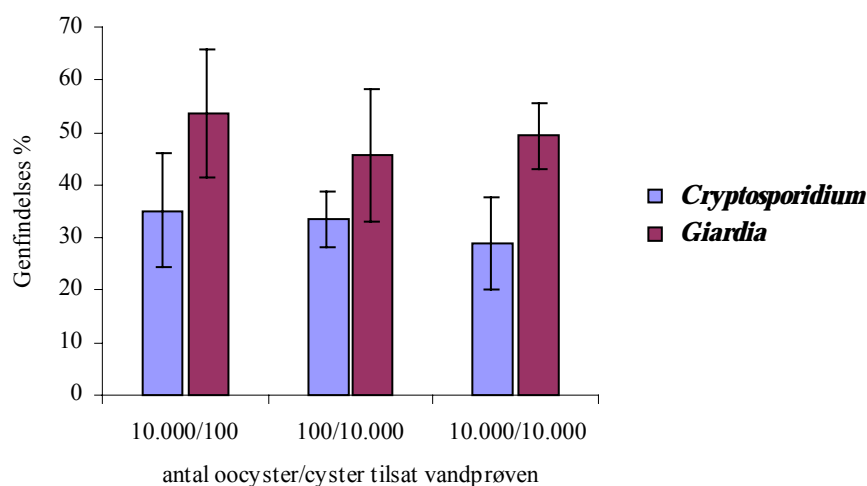
5 Resultater

5.1 Interaktionsforsøg

Genfindelsesprocenten af cyster/oocyster blev ikke påvirket negativt ved høje koncentrationer af den ene eller begge parasitter (tabel 4, figur 4), og var således ikke signifikant forskellig ved de forskellige koncentrationer af hhv. ***Giardia*** og ***Cryptosporidium***. Denne observation muliggør vurdering af genfindelsesprocenten for hver parasit i de undersøgte vandtyper uden korrektion for en evt. interaktion.

Tabel 4. Resultater fra interaktionsforsøget. Postevand blev tilsat hhv. 10.000 af den ene parasit og 100 af den anden og vice versa, samt resultater fra de positive kontroller, hvor milli-Q/ionbyttet vand blev tilsat 10.000 oocyster og 10.000 cyster.

Interaktion	Antal oocyster / cyster tilsat 10.000 / 100		Antal oocyster / cyster tilsat 100 / 10.000		Antal oocyster / cyster tilsat 10.000 / 10.000	
	Procent genfindelse					
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
	26,3	37,0	40,0	62,8	32,1	50,7
	40,1	58,0	32,0	35,7	32,8	45,4
	27,9	53,0	29,0	41,7	16,3	53,4
	34,3	60,0	31,0	45,1	39,4	55,7
	47,3	60,0	35,0	43,1	21,8	38,9
					31,6	51,5
<i>Gennemsnit</i>	35,2	53,6	33,4	45,7	29,0	49,3
Standardafvigelse	8,7	9,7	4,3	10,2	8,4	6,1



Figur 4. Diagram over genfindelsen i interaktionsforsøget. Prøverne blev tilsat hhv. 10.000 af den ene parasit og 100 af den anden og vice versa og i de positive kontroller tilsat 10.000 oocyster og 10.000 cyster (95% konfidens interval).

5.2 Kontrol af den tilsatte podningsdosis

For bedst muligt at kunne beregne genfindelsesprocenten for de to protozoarter i de respektive vandtyper blev den tilsatte mængde protozocyster hhv. -oocyster kontrolleret ved undersøgelse af 3 stikprøver for hver podningsdosis. Resultaterne af disse kontroltællinger varierede meget, hvilket fremgår af den store standardafvigelse anført i tabel 5. Variationen er ikke signifikant forskellig mellem de to protozoer, uanset tallene er højere for ***Cryptosporidium*** end for ***Giardia***.

Tabel 5. Resultater for kontrol af den tilsatte oocyste/cyste mængde. Resultaterne er angivet i % i forhold til det forventede antal. For nogle vandtyper er der flere tal pr. tilsætningsmængde, hvilket skyldes, at de 10 vandprøver blev filtreret à to omgange.

Vandprøve	Forventet dosis <i>Cryptosporidium</i>			Forventet dosis <i>Giardia</i>		
	100	1000	10.000	100	1000	10.000
	Tilsat kontrol (procent af forventet)			Tilsat kontrol (procent af forventet)		
Ejby råvand	110	125,8	121,79	78	86,2	78,97
		149,8			69,9	
Regnemark rent vand	87	178	119	80	72,7	58,7
	110	122,7		127	75,7	
Kingosvej råvand	97	115	117,4	163	72	50,4
Kingosvej rent vand	93	100	123,4	80	81,7	61,4
Mørkskov råvand	80	91	126,13	48	67	39,4
Mørkskov rent vand	102	137,2	128,64	63	58	70,2
<i>Gennemsnit</i>	94,8	121,9	132,7	93,5	79,7	61,6
Standard afvigelse	10,7	31,6	22,5	43,2	24,4	14,2

5.3 Genfindelse af protozoer efter filtrering af råvands- og rentvandsprøver

5.3.1 Ejby råvand

Efter filtrering og centrifugering oversteg mængden af bundfalden af Dynal anbefalede maksimum mængde (0,5 ml). Til undersøgelse af bundfaldets betydning for genfindelsesprocenten, blev der derfor for 3 prøver udført IMS på en delmængde, hvor bundfaldet således ikke overskred 0,5 ml. Den udtagne delprøve blev fortyndet med milli-Q vand, så det samlede volumen var 10 ml.

Genfindelsesprocent.

Der fandtes i ingen af delprøverne en højere genfindelse af **Cryptosporidium**, sammenlignet med prøver hvor IMS var anvendt på den samlede prøve. Tillige var farvningen af **Giardia** cysterne i delprøverne ikke bedre (se nedenfor). Alle øvrige prøver blev derfor analyseret uden deling. Den gennemsnitlige genfindelse for **Giardia** var 39,3-58,7 %, med størst standardafvigelse i prøver tilsat hhv. 100 og 1000 cyster. Den gennemsnitlige genfindelse for **Cryptosporidium** var under 1 % i vandprøverne tilsat hhv. 1000 og 10.000 oocyster. I prøverne med 100 oocyster tilsat var genfindelsen 6 %. For alle tre podningsniveauer var genfindelsen meget lav i forhold til rentvandsprøverne.

Fluorescens.

Giardia blev ikke farvet optimalt. Især i prøver tilsat 10.000 **Giardia**, blev disse overvejende farvet meget svagt rødt, mens kun omkring 10 % fluorescerede 'normalt'. En del fluorescerede kun i dele af kanten, mens op til 50 % i prøver med mange cyster slet ikke fluorescerede. I disse prøver blev alle **Giardia** cyster imidlertid talt med uanset om de fluorescerede normalt eller ej. Dette ville ikke være acceptabelt i prøver med ukendt status. Nogle af de færdigt farvede prøver indeholdt mange Dynal beads, som vanskeliggjorde aflæsningen, idet de ofte dækkede **Giardia** cysterne, og pga. af deres størrelse og form kunne forveksles med ufarvede **Cryptosporidium** oocyster. Dette var især et problem for denne vandtype, men forekom også i enkelte prøver fra de øvrige råvandstyper.

Tabel 6. Resultater af analyser af Ejby råvand tilsat hhv. 100, 1000 eller 10.000 protozo-cyster/oocyster.

Ejby råvand	Tilsat 100 oocyster/cyster		Tilsat 1000 oocyster/cyster		Tilsat 10.000 oocyster/cyster	
	Procent genfindelse					
Prøve-Nummer	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
1	9,0	34,0	1,8	34,8	0,3	67,3
2	4,0	39,0	1,5	41,7	0,3	62,0
3	3,0	26,0	1,3	67,9	0,0	70,1
4	8,0	20,0	0,6	52,2	0,3	64,8
5	5,0	65,0	0,4	22,6	0,1	46,3

6	9,0	36,0	0,5	58,0	0,1	65,3
7	5,0	47,0	0,1	64,2	0,0	62,9
8	11,0	33,0	0,1	68,5	0,0	54,0
9	3,0	40,0	0,1	61,1	0,2	48,3
10	3,0	53,0	0,0	45,9	0,1	44,5
<i>Gennemsnit</i>	6,0	39,3	0,6	51,7	0,1	58,5
Standard-afvigelse	3,0	13,1	0,7	15,3	0,1	9,4

5.3.2 Regnemark rent vand

Genfindelsesprocent

Den gennemsnitlige genfindelse for de tre cyste-koncentrationer af ***Giardia*** var hhv. 51,5, 63,4 og 50,5 %. For prøver tilsat 100 og 1000 cyster var standardafvigelsen forholdsvis stor. Genfindelsen i prøverne tilsat 1000 cyster var signifikant forskellig fra de 2 øvrige koncentrationer ($P < 0,05$).

For ***Cryptosporidium*** var der ikke signifikant forskel mellem genfindelserne for de tre koncentrationer (gennemsnitlig hhv. 36,8, 39,7 og 37,2 % genfindelse).

Fluorescens

Oocysterne/cysterne fluorescerede hovedsageligt normalt. Enkelte cyster fluorescerede kun i kanten, men kunne tydeligt identificeres som ***Giardia***.

Tabel 7. Resultater af analyser af Regnemark rent vand tilsat hhv. 100, 1000 eller 10.000 protozo-cyster/oocyster.

Regnemark Rent vand	Tilsat 100 oocyster/cyster		Tilsat 1000 oocyster/cyster		Tilsat 10.000 oocyster/cyster	
	Procent genfindelse					
Prøve- nummer	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
1	34,0	40,0	34,4	58,2	37,4	38,4
2	55,0	26,0	24,0	45,0	40,1	56,7
3	36,0	58,0	40,8	61,2	36,9	52,7
4	23,0	41,0	26,9	56,2	34,7	42,9
5	21,0	50,0	35,9	48,1	44,1	58,0
6	42,0	71,0	51,3	78,6	39,8	42,1
7	26,0	37,0	50,7	62,2	39,6	48,9
8	39,0	44,0	47,3	109,8	33,9	60,2
9	52,0	75,0	44,8	62,6	31,5	57,7
10	40,0	73,0	41,0	52,0	34,4	47,0
<i>Gennemsnit</i>	36,8	51,5	39,7	63,4	37,2	50,5
Standard-afvigelse	11,4	17,0	9,4	18,8	3,7	7,7

5.3.3 Kingosvej råvand

Mængden af bundfald var ca. 0,5 ml og faldt hermed indenfor IMS-produktvejledningens grænser.

Genfindelsesprocent

For prøver tilsat hhv. 1000 og 10.000 oocyster/cyster var den gennemsnitlige genfindelse af **Giardia** over 60 %. For prøver tilsat 100 cyster var genfindelsen blot 47,3 % med en relativt stor standardafvigelse.

Genfindelsen for **Cryptosporidium** i denne vandtype var næsten 0 %.

Fluorescens

Farvningen af disse prøver var ikke optimal. **Giardia** fluorescerede overvejende rødt men med grønt i kanten.

Tabel 8. Resultater af analyser af Kingosvej råvand tilsat hhv. 100, 1000 eller 10.000 protozo-cyster/oocyster.

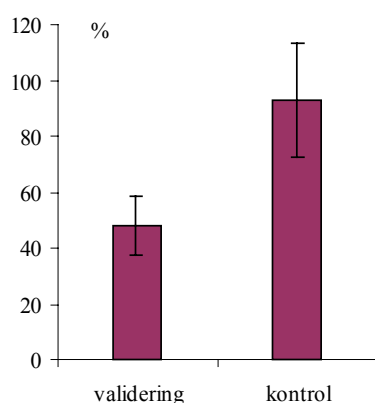
Kingosvej Råvand	Tilsat 100 oocyster/cyster		Tilsat 1000 oocyster/cyster		Tilsat 10.000 oocyster/cyster	
	Procent genfindelse					
Prøve- nummer	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
1	1,0	50,0	0,2	56,8	0,5	69,1
2	0,0	37,0	0,1	58,8	0,5	75,2
3	0,0	34,0	0,2	54,5	0,6	74,1
4	1,0	47,0	1,9	71,8	0,4	59,7
5	0,0	38,0	0,4	58,1	0,1	60,2
6	1,0	57,0	0,4	68,6	0,3	71,5
7	0,0	56,0	1,1	71,1	0,3	58,8
8	3,0	71,0	0,4	50,2	0,2	62,3
9	0,0	35,0	0,1	66,9	0,1	45,7
10	1,0	48,0	0,2	68,6	0,2	53,4
<i>Gennemsnit</i>	0,7	47,3	0,5	62,5	0,3	63,0
Standard- afvigelse	0,9	11,8	0,6	7,7	0,2	9,5

5.3.4 Kingosvej rent vand

Genfindelsesprocent

For denne vandtype var den gennemsnitlige genfindelse for **Giardia** i prøverne med tilsat hhv. 1000 og 10.000 cyster lavere end for de øvrige rentvandstyper. Genfindelsen i prøver tilsat 10.000 cyster var signifikant lavere end i prøverne tilsat 100 hhv. 1000 cyster ($P < 0,05$). I de positive kontroller for prøverne med 1000 og 10.000 oocyster/cyster var genfindelsen på ca. 50-60%.

For at undersøge hvorvidt de lave genfindelser for **Giardia** i prøver med hhv. 1000 og 10.000 cyster skyldtes podningen eller evt. vandtypen, blev opsat et kontrol forsøg, som omfattede 7 x 10 liter vand undersøgt på samme måde som vandet i valideringsforsøgene. Genfindelsen for **Giardia** i kontrolforsøget (angivet som procent i forhold til genfindelsen i den positive kontrol) havde et gennemsnit på 92,9 % i forhold til valideringsforsøget, hvor gennemsnittet i forhold til den positive kontrol var 48,1 % (Figur 5).



Figur 5. Resultaterne for genfindelsen af *Giardia* cyster i kontrol forsøget sammenlignet med valideringsforsøget. Genfindelsen er angivet i procent i forhold til genfindelsen i den positive kontrol (Standardafvigelsen angivet).

Resultaterne for de egentlige prøver tilsat hhv. 1000 og 10.000 oocyster/cyster kunne med kontrolforsøget ikke bekræftes og må derfor videre behandles med det forbehold, at de kan være misvisende, antagelig grundet variation i podningen.

Den gennemsnitlige genfindelse for **Cryptosporidium** oocysterne varierede fra 25 % i prøverne tilsat 100 oocyster til 35,6 % i prøverne tilsat 10.000 oocyster. Standardafvigelsen var relativt lille. Kun resultaterne for prøverne tilsat 100 oocyster var signifikant lavere end de øvrige ($P < 0,05$).

Fluorescens

Oocysterne/cysterne fluorescerede normalt.

Tabel 9. Resultater af analyser af Kingosvej rent vand tilsat hhv. 100, 1000 eller 10.000 protozo-cyster/oocyster.

Kingosvej rent vand	Tilsat 100 oocyster/cyster		Tilsat 1000 oocyster/cyster		Tilsat 10.000 oocyster/cyster	
	Procent genfindelse					
Prøve- nummer	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
1	28,0	38,0	31,1	40,3	37,9	31,0
2	30,0	33,0	24,8	48,4	35,1	28,5
3	29,0	47,0	35,0	57,8	38,7	29,9
4	22,0	45,0	35,9	38,4	36,7	26,9
5	12,0	74,0	37,1	48,3	39,0	30,0
6	31,0	37,0	38,4	40,1	36,6	26,0
7	21,0	50,0	33,9	32,7	37,3	23,5
8	22,0	57,0	30,5	37,9	25,3	13,1
9	34,0	61,0	26,7	20,9	31,0	34,2
10	21,0	48,0	29,8	32,1	38,8	24,9
<i>Gennemsnit</i>	25,0	49,0	32,3	39,7	35,6	26,8
Standard- afvigelse	6,5	12,4	4,5	10,2	4,3	5,8

5.3.5 Mørskov råvand

Mængden af bundfald var ca. 0,5 ml.

Genfindelsesprocent

I denne vandtype var genfindelsesprocenten for **Giardia** generelt høj (gennemsnitlig 65,3-77,3 %) og for prøver tilsat 100 cyster markant højere end i de øvrige vandtyper. Dette skyldtes dels, at der var to prøver med meget høj genfindelse, men også at de øvrige prøver havde en lidt højere genfindelse end observeret for de øvrige vandtyper.

Genfindelsesprocenten for **Cryptosporidium** var meget lav (gns. 0,1 – 3,0 %).

Fluorescens

Giardia cysterne blev farvet nogenlunde tilfredsstillende, idet de tydeligt fluorescerede grønt i kanten. Cirka 20% af cysterne fluorescerede helt grønt. De **Cryptosporidium** oocyster, der påvistes, fluorescerede normalt.

I prøver tilsat 1000 oocyster/cyster mangler et resultat pga. et ødelagt Dynal L10 rør.

Tabel 10. Resultater af analyser af Mørkskov råvand tilsat hhv. 100, 1000 eller 10.000 protozo-cyster/oocyster.

Mørkskov råvand	Tilsat 100 oocyster/cyster		Tilsat 1000 oocyster/cyster		Tilsat 10.000 oocyster/cyster	
	Procent genfindelse					
Prøve-nummer	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
1	2,0	77,0	manglende resultater		0,0	71,3
2	0,0	71,0	0,1	54,0	0,2	65,7
3	7,0	73,0	0,7	71,5	0,1	70,2
4	7,0	48,0	0,1	69,8	0,1	69,8
5	2,0	57,0	0,0	63,2	0,0	76,7
6	2,0	69,0	0,2	64,9	0,1	46,9
7	1,0	66,0	0,1	67,5	0,1	58,4
8	6,0	134,0	0,2	62,5	0,0	80,8
9	2,0	57,0	0,2	72,0	0,0	58,7
10	1,0	121,0	0,3	65,8	0,0	54,3
<i>Gennemsnit</i>	3,0	77,3	0,2	65,7	0,1	65,3
Standard-afvigelse	2,6	28,0	0,2	5,6	0,1	10,6

5.3.6 Mørkskov rent vand

Genfindelsesprocent

Den gennemsnitlige genfindelse for ***Giardia*** for de tre koncentrationer var 47,4-55,4 %, med en forholdsvis høj standardafvigelse for prøver tilsat 100 cyster. Kun mellem prøver tilsat hhv. 1000 og 10.000 cyster var der en signifikant forskel ($P < 0,05$).

Den gennemsnitlige genfindelse for ***Cryptosporidium*** var 38,1-51,1 %; signifikant lavere for prøver der var tilsat 10.000 oocyster i forhold til prøver tilsat 100 oocyster ($P < 0,05$).

Fluorescens

Oocysterne/cysterne fluorescerede normalt. Cirka halvdelen af prøverne blev ikke farvet og aflæst før 5-6 dage efter IMS, hvilket tydeligt reducerede graden af fluorescens. Alle prøverne kunne dog aflæses uden besvær.

Tabel 11. Resultater af analyser af Mørkskov rent vand tilsat hhv. 100, 1000 eller 10.000 protozo-cyster/oocyster

Mørkskov rent vand	Tilsat 100 oocyster/cyster		Tilsat 1000 oocyster/cyster		Tilsat 10.000 oocyster/cyster	
	Procent genfindelse					
Prøve- nummer	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
1	47,0	52,0	43,2	60,7	32,9	42,5
2	66,0	47,0	60,3	60,0	47,9	56,3
3	63,0	73,0	43,4	56,8	39,9	52,9
4	54,0	33,0	37,2	50,7	40,2	52,3
5	45,0	50,0	40,2	60,5	36,3	47,4
6	58,0	55,0	47,5	62,8	41,6	45,7
7	45,0	50,0	42,7	55,2	38,0	43,2
8	43,0	56,0	37,2	49,5	30,9	44,9
9	52,0	42,0	48,1	57,2	37,5	46,2
10	38,0	25,0	40,2	40,8	36,1	42,5
<i>Gennemsnit</i>	51,1	48,3	44,0	55,4	38,1	47,4
Standard- afvigelse	9,1	13,1	6,8	6,7	4,8	4,8

5.3.7. Samlede resultater

Giardia

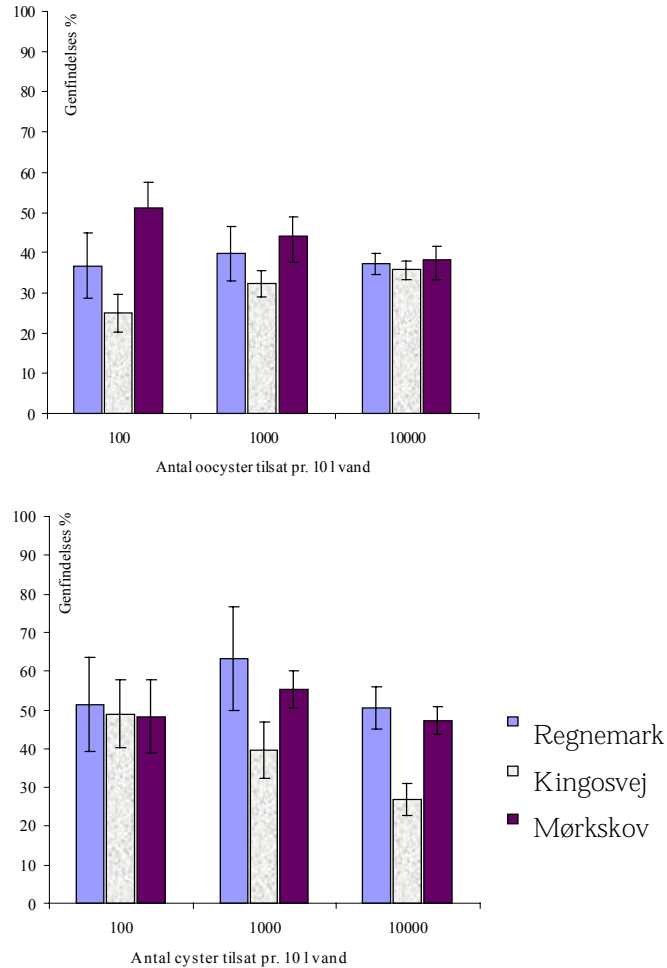
Genfindelsen af ***Giardia*** i råvand varierede mellem 39,3-77,3 % med et gennemsnit fra 54,6-62,3 %, og med størst variation i prøver med lav koncentration. Farvningen af ***Giardia*** cysterne var utilfredsstillende i alle råvandsprøverne.

Genfindelsesprocenten for ***Giardia*** cyster i rent vand varierede mellem 26,8-63,4 % med et gennemsnit fra 41,5-52,8 % (figur 6). Variationen i genfindelsesprocenten var størst i prøverne med den laveste koncentration. Kun for Kingosvej prøver tilsat hhv. 1000 og 10.000 cyster var der en signifikant forskel ($P < 0,05$) sammenlignet med de øvrige rentvandsprøver, som i øvrigt ikke var forskellige fra hinanden. Udelades resultaterne for Kingosvej rent vand, som tydeligt lå lavere end resultaterne for de øvrige to rentvandstyper var genfindelsen mellem 48,9-59,4 %.

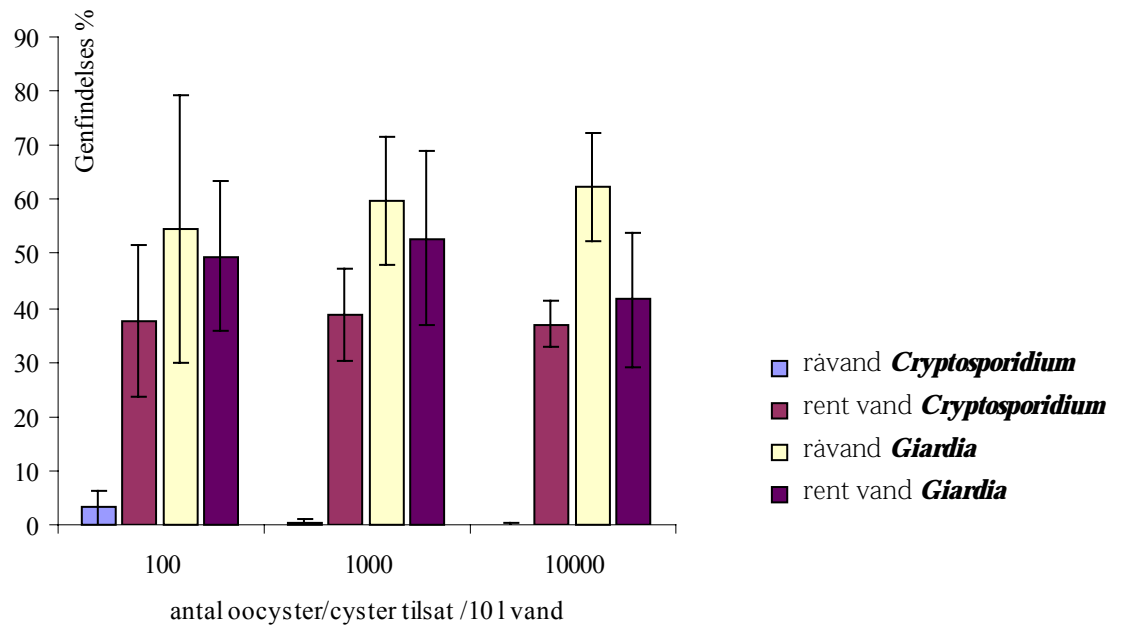
Cryptosporidium

Genfindelsen af ***Cryptosporidium*** i råvand varierede mellem 0,1-6,0 % med et gennemsnit fra 0,2-3,2 %. Variationen i genfindelsesprocenten var størst i prøver tilsat 100 oocyster.

Genfindelsen af *Cryptosporidium* oocyster var for de tre rentvandstyper inden for et interval af 25-51,1 % med et gennemsnit fra 37,0-38,7 % (Figur 6). Den største variation i genfindelsesprocenten sås i prøver tilsat 100 oocyster, hvorimod standardafvigelsen i prøver tilsat 10.000 oocyster var mindre (Figur 7).



Figur 6. Den gennemsnitlige genfindelse af cyster/oocyster for de tre rentvandstyper (95% Konfidens interval). Øverst: *Cryptosporidium*. Nederst: *Giardia*



Figur 7. Den gennemsnitlige genfindelse (95% Konfidens interval) for *Cryptosporidium* og *Giardia* i hhv. råvand og rent vand.

6 Diskussion

For både råvand og rent vand gælder det, at genfindelsen af **Giardia** er større end genfindelsen for **Cryptosporidium**. Dette kan skyldes, at **Giardia** cysterne er større og derfor lettere bliver opfanget af filtret. Desuden er det i henhold til Dynal Biotech vist, at bindingen mellem **Giardia** og Dynabeads anti-**Giardia** er stærkere end bindingen mellem **Cryptosporidium** og Dynabeads anti-**Cryptosporidium**. Dette kan være årsagen til, at der i råvand genfindes mange **Giardia** cyster men ingen eller kun få **Cryptosporidium** oocyster.

For hver gang prøverne blev podet blev koncentrationen af stamopløsningen kontrolleret. Tallene for **Giardia** koncentrationerne lå ofte under det forventede på hhv. 100, 1000 og 10.000 pr. ml stamopløsning. Til trods for dette var genfindelses resultaterne for de testede vandprøver omkring det forventede niveau. Der er muligvis sket en udvaskning af nogle **Giardia** cyster under farvning, omend dette ikke synes at være tilfældet ved farvning af de egentlige prøver.

Det er et kendt problem, at **Cryptosporidium** oocyster og **Giardia** cyster har en tendens til at klumpe sammen og bundfælde, hvilket besværliggør en nøjagtig podning af prøverne. Generelt må det antages, at den store standardafvigelse i protozo-genfindelsen ikke mindst i prøver tilsat få oocyster/cyster er forårsaget af såvel en variation i mængden af tilsatte protozoer som en metode relateret (filtrering, IMS, fluorescens) variation. Samtidig kan de påviste forskelle i genfindelsen i forhold til koncentrationen, formentlig i nogen grad tillægges usikkerhed forbindelse med podning af prøverne.

Råvandets kemiske og biologiske sammensætning udskiller sig på de fleste punkter ikke meget fra det rene vand. Der er mere jern i råvandstyperne end i nogen af rentvandstyperne, især i Ejby råvand (3,7 mg/l) men også i Kingosvej råvand (0,05-0,09 mg/l), som i øvrigt indeholder mindst jern af de tre råvandstyper. For alle råvandstyper er der også betydeligt mere ammonium end i det rene vand. Derudover ser det ud til, at der i råvandet er mere bikarbonat og svovlilte end i det rene vand, men for disse parametre foreligger ikke værdier for alle vandtyperne.

I modsætning til **Giardia** var der stort set ingen genfindelse af **Cryptosporidium** i råvand. Cryptosporidierne var påvist i prøven efter filtrering, så derfor må det konkluderes at være IMS-opkoncentreringen, der ikke fungerede i råvand. Dette kunne evt. skyldes mængden af jern i råvandet eller den forholdsvis store mængde bundfald, selvom denne dog ikke overskrider Dynals forskrifter. Bindningen mellem **Cryptosporidium** oocysterne og Dynabeads anti-**Cryptosporidium** er ikke kraftig, og det kan tænkes, at stoffer i bundfaldet svækker bindingen yderligere.

Immunofluorescens farvningen af **Giardia** var ikke optimal i råvand. Op til 50% af cysterne i Ejby råvand blev ikke farvet, mens en stor del af resten kun blev farvet delvist. I mange tilfælde var det kun muligt at identificere **Giardia**, fordi det på forhånd var kendt, at elementer af pågældende størrelse og form i disse prøver kun kunne være denne parasit. I vandprøver med ukendt forekomst er denne dårlige farvning ikke acceptabel, da kun grønt fluorescerende / specifikt mærkede organismer bør registreres. For de øvrige råvandstyper var farvningen bedre men stadig ikke på samme niveau som i

rent vand. På baggrund af nærværende resultater må det konkluderes, at metoden ikke er anvendelig til påvisning af **Cryptosporidium** og **Giardia** i råvand, da den vil kunne føre til falske negative resultater.

Cirka halvdelen af rentvandsprøverne fra Mørkskov vandværk blev ikke farvet og aflæst før 5-6 dage efter IMS, hvilket tilsyneladende havde mindsket deres evne til at fluorescere. Alle prøverne var dog mulige at aflæse.

I rent vand var der for 3 vandtyper (inkl. interaktionsforsøget, hvor der blev brugt postevand) en gennemsnitlig genfindelse på ca. 35 % for **Cryptosporidium** og ca. 50% for **Giardia**. For én rentvandstype (Kingosvej) var genfindelsen for **Giardia** dog noget lavere i prøver med hhv. 1000 og 10.000 oocyster/cyster. På baggrund af kontrolforsøget, hvor resultaterne viste en cirka dobbelt så stor genfindelse i forhold til den positive kontrol, må det antages, at den lave genfindelse af **Giardia** skyldes en fejl i tilsætning af **Giardia** cyster til prøverne. Det er, som nævnt, kendt at (oo)cyster tenderer til at være ujævnt fordelt i en væske og problemer med dette har ført til, at man f.eks. for oocyster anbefaler anvendelse af flowcytometer til tælling og dispensering af oocysterne ved spiking af vandprøver (f.eks. Sturbaum et al., 2002). Herved kan opnås et helt præcist kendskab til den tilsatte mængde oocyster og minimering af podningsdosering som fejlkilde.

Resultaterne af denne undersøgelse afviger ikke fra, hvad der tidligere er beskrevet. Således blev i engelske sammenlignende studier af oocyste- hhv. cyste-genfindelsen efter filtrering af spikede (ca. 100 (oo)cyster pr 10 l) vandprøver genfundet 10-41% oocyster hhv. 22-52% cyster ved brug af 1,2 µm pore membranfilter og ubetydeligt færre ved brug af 3,0 µm pore membranfilter (Shepherd & Wyn-Jones, 1996). Tilsvarende resultater er opnået ved Taiwanske analyser af såvel råvand som rensset vand for de 2 protozoer, nemlig med en genfindelse på 16-17% oocyster hhv. 38-40% cyster. Det blev tillige fundet, at detektionsgrænsen for organismerne i råvand med høj turbiditet var betydeligt højere end i rensset vand (altså en lavere sensitivitet) (Hsu et al., 2001).

I de omtalte undersøgelser blev ikke anvendt IMS-oprensning, men udelukkende filtrering og efterfølgende IFAT. Ved studier af genfindelsen af (oo)cyster fra vand af varierende turbiditet under anvendelse af IMS er beskrevet genfindelser af oocyster hhv. cyster på 56-83% hhv. 61-89% (McCuin et al., 2001). Disse genfindelser er højere end hvad vi har fundet - men undersøgelserne er foretaget på prøver efter justerende fortyndinger til frembringelse af analyserbart materiale. Sådanne justeringer synes ikke relevante til brug ved rutinemæssige undersøgelser.

Der er ikke bestemt en nedre grænse for, hvad metoden kan detektere, men baseret på den fundne genfindelse for **Cryptosporidium** oocyster på minimum 25 % forventes det, at metoden kan detektere 2-3 oocyster i prøver med kun 10 oocyster. For **Giardia** kan metoden detektere 4-6 cyster ud af prøver med kun 10 cyster. Der er ved metodevalideringen ikke påvist en øvre begrænsning i antallet af oocyster/cyster, der kan detekteres, men denne er først og fremmest afhængig af IMS-processen. Da formålet med analysen snarere er vurdering af parasiternes forekomst end kvantitering af store antal, er yderligere afgrænsning ikke relevant.

Fordelene ved den her beskrevne metode er, at det kun er nødvendigt at filtrere forholdsvis små mængder vand, i forhold til andre metoder hvor der skal filtreres op til 1000 l vand (Baker et al., 1998). Den lille vandmængde betyder, at selve filtreringen kan foregå på et laboratorium i stedet for ude på

selve vandværket. Metoden er nem at bruge og kræver ikke meget oplæring. Det meste af det nødvendige udstyr er standard laboratorium udstyr. Genfindelsen ved brug af denne metode er relativt stabil og samtidig relativt høj i forhold til ved brug af andre metoder, hvor genfindelsen kan være helt ned til 3% (Hansen & Stenström, 1998). Metodens største ulempe er, at den er forholdsvis tidskrævende.

7 Konklusion

Rapporten beskriver optimering og validering af en metode til detektion af protozoerne ***Cryptosporidium*** og ***Giardia*** i vand. Metoden er baseret på filtrering af 10 liter vand igennem et membranfilter, opkoncentrering af protozoerne vha. centrifugering og immunomagnetisk separation (IMS) og efterfølgende mærkning af protozoerne med immunofluorescens til aflæsning af prøverne vha. fluorescensmikroskopi.

Ved brug af denne metode til påvisning af ***Giardia*** og ***Cryptosporidium*** i rent vand vil man kunne forvente at finde ca. 35% af ***Cryptosporidium*** oocysterne og ca. 50% af ***Giardia*** cysterne. Herudfra må det konkluderes, at det med den beskrevne metode vil være muligt at påvise forekomst af protozoer ned til en koncentration på ***10 oocyster/cyster pr. 10 l rent vand***. Ved denne forekomst vil da kunne påvises 2-3 ***Cryptosporidium*** oocyster og 5 ***Giardia*** cyster. Den øvre grænse for, hvad metoden kan detektere, er først og fremmest afhængig af IMS-processen.

Metoden kan kun anbefales til test af rentvandsprøver, da den i råvand ikke kan påvise ***Cryptosporidium*** oocyster og der tillige er en dårlig farvning af ***Giardia*** cysterne, hvilket ikke er acceptabelt i prøver med ukendt status.

8 Referencer

- Anonym, 2002. Annual Report on Zoonoses in Denmark 2001, Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.
- Baker, J.R., Muller, R. & Rollinson, D. (eds.). 1998. Advances in parasitology. Opportunistic protozoa in humans. Academic Press, San Diego, USA.
- Bemrick, W.J. & Erlandsen, S.L. 1988. Giardiasis – is it really a zoonosis? *Parasitology Today*, 4: 69-71.
- Craun, G.F. 1990. Waterborne giardiasis, p 267-293. **In** E. A. Meyer (ed.), *Giardiasis*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Current, W.L. & Garcia, L.S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 325-358.
- DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B. & Jakubowski, J.B., 1995. The infectivity of ***Cryptosporidium parvum*** in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine*, 322: 855-859.
- Fricker, C.R. & Crabb, 1998. Water-borne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. *Advances in Parasitology* 40: 240-278.
- Hansen, A. & Stenström, T.A. 1998. Kartläggning av ***Giardia*** och ***Cryptosporidium*** i svenska ytvattentäkter. Smittskyddsinstitutet och Livsmedelsverket.
- Hsu, B., Huang, C., Hsu, Y., Jiang, G. & Hsu, C.L. 2001. Evaluation of 2 concentration methods for detecting ***Giardia*** and ***Cryptosporidium*** in water. *Water Research*, 35: 419-424.
- MacKenzie, W., Hoxie, N., Proctor, M., Gradus, M., Blair, K., Peterson, D., Kazmierczak, J., Addiss, D., Fox, K., Rose, J., Davis, J. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, 331: 161-167.
- Martins, C.A.P. & Guerrant, R.L. 1995. ***Cryptosporidium*** and cryptosporidiosis. *Parasitology Today*, 11: 434-436.
- McCuin, R.M., Bukhari, Z., Sobrinho, J. & Clancy, J.L. 2001. Recovery of ***Cryptosporidium*** oocysts and ***Giardia*** cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. *Journal of Microbiological Methods*, 45: 69-76.
- Okhuysen, P.C., Chapell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., Dupont, H.L. 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *The Journal of Infectious Diseases* 180: 1275-1281.
- O'Donoghue, P.J. 1995. ***Cryptosporidium*** and Cryptosporidiosis in Man and Animal. *International Journal for Parasitology*, 25: 139-195.
- Rendtorff, R.C. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites: II. ***Giardia lamblia*** cysts given in capsules. *American Journal of Hygiene*, 59: 209-220.
- Robertson, L.J. Campbell, A.T. & Smith, H.V. 1992. Survival of ***Cryptosporidium parvum*** oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3494-3500.
- Shepherd, K.M. & Wyn-Jones, A.P. 1996. An evaluation of methods for the simultaneous detection of ***Cryptosporidium*** oocysts and ***Giardia*** cysts from water. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1317-1322.
- Smith, H.V. & Ahmad, R. 1997. Protozoan parasites in the water. *Parasitology Today*, 13: 3-4.

- Smith, H.V. & Rose, J.B. 1998. Waterborne Cryptosporidiosis: Current Status. *Parasitology Today*, 14: 14-22.
- Sturbaum, G.D., Klonicki, P.T., Marshall, M.M., Jost, B.H., Clay, B.L. & Sterling, C.R. 2002. Immunomagnetic separation (IMS)-fluorescent antibody detection and IMS-PCR detection of seeded ***Cryptosporidium parvum*** oocysts in natural waters and their limitations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2991-2996.
- Tessier, J.L. & Davies, G.A.L. 1999. Giardiasis. Primary Care Update for OB/GYNS, 6: 8-11.
- Thompson, R.C.A., Hopkins, R.M., Homan, W.L. 2000. Nomenclature and genetic groupings of ***Giardia*** infection mammals. *Parasitology Today*, 16: 210-213.