



UNIwersytet Medyczny
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII
I PARAZYTOLOGII LEKARSKIEJ

Szymon Jędrzejewski

**WYSTĘPOWANIE
STADIÓW DYSPERSYJNYCH
PASOŻYTÓW JELITOWYCH
W ŻYWNOCICI
POCHODZENIA ROŚLINNEGO**

Praca doktorska
wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej

Promotor:
Prof. dr hab. Anna C. Majewska

Poznań 2012

Część pracy opublikowano:

Jedrzejewski Sz., Graczyk T. K., Słodkiewicz-Kowalska A., Tamang L., Majewska A. C.:
Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by
human-virulent microsporidian spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4071-4073, 2007.

IF: 4,004, KBN: 32

*Pani Prof. dr hab. Annie C. Majewskiej,
za pomoc i cierpliwość, wyrozumiałość i okazane wsparcie
oraz za przekazaną wiedzę i cenne wskazówki merytoryczne.*

*Mojej żonie Indze i rodzinie, za wiarę i okazaną pomoc.
Piotrowi Zduniakowi „Kudłatemu” za wsparcie statystyczne o każdej porze.
Pani Irenie Rybak za nieocenioną pomoc w badaniach laboratoryjnych i dobre słowo,
a także Koleżankom i Kolegom za wsparcie i życzliwość i atmosferę pracy.*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	8
1.1. Wprowadzenie.....	8
1.2. Charakterystyka pasożytów stwierdzanych na powierzchni żywności pochodzenia roślinnego.....	10
1.2.1. Giardia spp.	10
1.2.1.1. Rys historyczny.....	10
1.2.1.2. Taksonomia.....	11
1.2.1.3. Budowa i cykl rozwojowy.....	12
1.2.1.4. Diagnostyka.....	14
1.2.1.5. Obraz kliniczny.....	14
1.2.1.6. Epidemiologia.....	14
1.2.2. Cryptosporidium spp.	16
1.2.2.1. Rys historyczny.....	16
1.2.2.2. Taksonomia.....	17
1.2.2.3. Budowa i cykl rozwojowy.....	19
1.2.2.4. Diagnostyka.....	21
1.2.2.5. Obraz kliniczny.....	21
1.2.2.6. Epidemiologia.....	22
1.2.3. Mikrosporydia	24
1.2.3.1. Rys historyczny.....	24
1.2.3.2. Taksonomia.....	24
1.2.3.3. Budowa i cykl rozwojowy.....	27
1.2.3.4. Diagnostyka.....	29
1.2.3.5. Obraz kliniczny.....	31
1.2.3.6. Epidemiologia.....	32
1.2.4. Ascaris spp.	33
1.2.4.1. Rys historyczny.....	34
1.2.4.2. Taksonomia.....	34
1.2.4.3. Budowa i cykl rozwojowy.....	34

1.2.4.4. Diagnostyka.....	35
1.2.4.5. Obraz kliniczny.....	36
1.2.4.6. Epidemiologia.....	36
1.3. Źródła i drogi biologicznego zanieczyszczenia żywności.....	37
1.4. Metody wykrywania stadiów dyspersyjnych pasożytów w i na żywności pochodzenia roślinnego.....	39
2. CEL PRACY.....	42
3. MATERIAŁ I METODY.....	43
3.1. Próby żywności.....	43
3.2. Kategorie prób żywności.....	43
3.2.1. Sałaty.....	43
3.2.2. Warzywa.....	43
3.2.3. Kiełki.....	44
3.2.4. Zioła.....	44
3.2.5. Sałatki warzywne.....	44
3.2.6. Owoce.....	45
3.2.7. Nasiona wykorzystywane do hydroponicznej uprawy kiełków.....	45
3.3. Miejsce zakupu żywności.....	45
3.3.1. Żywność zakupiona w dużych marketach.....	45
3.3.2. Żywność zakupiona w sklepach warzywniczych.....	47
3.3.3. Żywność zakupiona na miejskich targowiskach.....	48
3.4. Pochodzenie żywności.....	58
3.5. Metody.....	49
3.5.1. Przygotowanie prób do badań.....	49
3.5.2. Uzyskiwanie osadu.....	49
3.5.3. Metody mikroskopowe.....	49
3.5.3.1. Preparaty świeże.....	49
3.5.3.2. Preparaty trwałe.....	50
3.5.3.2.1. Barwienie trichromem.....	50
3.5.3.2.2. Barwienie zmodyfikowaną metodą Ziehl-Neelsena.....	51

3.5.3.2.3. Barwienie chromotropem	52
3.5.4. Test immunofluorescencji bezpośredniej	53
3.5.5. Metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> (FISH i multiplex FISH)	54
3.5.5.1. Oligonukleotydy wykorzystane w reakcji FISH i multiplex FISH	55
3.5.5.2. Przygotowanie próby osadu do techniki FISH i multiplex FISH	55
3.5.5.3. Wykonanie fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i>	56
3.5.5.4. Identyfikacja gatunku mikrosporydium	57
3.5.6. Analiza statystyczna	58
4. WYNIKI	59
4.1. Zanieczyszczenie stadiami dyspersyjnymi pasożytów poszczególnych kategorii żywności pochodzenia roślinnego	59
4.2. Zanieczyszczenie stadiami dyspersyjnymi pasożytów nasion używanych do hydroponicznej uprawy kiełków	63
4.3. Korelacja między częstością występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów na żywności pochodzenia roślinnego a miejscem zakupu	63
4.4. Identyfikacja pasożytów w próbach żywności pochodzenia roślinnego i nasion	65
4.4.1. Identyfikacja pasożytów w próbach żywności pochodzenia roślinnego i nasion	66
4.4.2. Występowanie spor mikrosporydii w próbach żywności	70
4.4.2.1. Występowanie <i>E. bieneusi</i>	70
4.4.2.2. Występowanie <i>E. intestinalis</i>	70
4.4.2.3. Występowanie <i>E. cuniculi</i>	70
4.4.2.4. Występowanie <i>E. hellem</i>	70
4.4.3. Występowanie cyst <i>Giardia</i>	70
4.4.4. Występowanie jaj <i>Ascaris</i>	72
4.5. Różnice w występowaniu stadiów dyspersyjnych pasożytów w próbach żywności wyprodukowanej przez polskich producentów i pochodzącej z importu	72
5. DYSKUSJA	74
6. WNIOSKI	90

7. PIŚMIENNICTWO **92**

8. STRESZCZENIE **103**

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Znaczne skażenie środowiska odchodami ludzi i zwierząt, zawierającymi stadia dyspersyjne pasożytów, stwarza realne zagrożenie zanieczyszczenia żywności. Tym bardziej, że stadia te są wydalane w olbrzymiej liczbie i są odporne na działanie wielu czynników środowiska zewnętrznego. Droga fekalno-oralna jest jednym z najczęstszych sposobów transmisji stadiów dyspersyjnych pasożytów jelitowych oraz tych, które po połknięciu migrują do różnych narządów. Nie dziwi zatem fakt, że co roku dokumentuje się na świecie nowe przypadki epidemii żywnościopochodnych, wywołanych przez pasożyty jelitowe (Herwaldt, 2000; <http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>). Do najbardziej znaczących pasożytów, których stadia inwazyjne mogą zanieczyszczać żywność należą: *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Fasciola* spp., *Fasciolopsis buski*, *Echinococcus granulosus* i *E. multilocularis* (Räisänen i wsp. 1985; Dorny i wsp., 2009).

Istnieje wiele czynników prowadzących do zanieczyszczenia produktów spożywczych. Mogą one występować praktycznie na każdym etapie – od produkcji żywności aż do naszego stołu. Dotyczy to głównie produktów spożywanych na surowo i słabo przetworzonych. Kał zarażonych żywicieli (ludzi i zwierząt) przyczynia się do powierzchniowego zanieczyszczenia żywności, poprzez stosowanie nawozów naturalnych lub wykorzystywanie zanieczyszczonej wody do nawadniania upraw roślinnych (Smith i wsp., 1993; Monge i wsp., 1996). Postępująca globalizacja handlu, szybki transport żywności z odległych regionów świata oraz warunki przechowywania produktów spożywczych (chłód, wilgoć) sprzyjają przeżywalności stadiów inwazyjnych pasożytów (Orlandi i wsp., 2002). Do zanieczyszczenia żywności może dojść także podczas jej przetwarzania oraz sprzedaży. (Porter i wsp., 1990; Tangermann i wsp., 1991; Mintz i wsp., 1993; Millard i wsp., 1994; Ortega i wsp., 1997; Kniel i wsp., 2003).

Istotną rolę w zwiększaniu ryzyka wystąpienia żywnościopochodnych epidemii odgrywają również zmiany stylu życia, takie jak coraz powszechniejsza moda na wegetarianizm i tzw. zdrową żywność oraz wzrastająca liczba osób spożywających posiłki w restauracjach, kantynach i od ulicznych sprzedawców (WHO, 2002). Jednak mimo pojawiających się doniesień o występowaniu epidemii żywnościopochodnych, niewiele jest prac o wykrywaniu stadiów dyspersyjnych pasożytów jelitowych w żywności (Kasprzak i wsp., 1981; Ortega i wsp., 1997; Amahmid i wsp., 1999; Robertson i wsp., 2001, 2002, 2004; Gharavi i wsp., 2002; Erdoğan i Sener 2005; Kozan i wsp., 2005; Amoah i wsp., 2006; Jędrzejewski i wsp., 2007; Daryani i wsp., 2008; Rai i wsp. 2008; Abougrain i wsp., 2009; Andoh i wsp. 2009; Gupta i wsp., 2009; Al-Megrin, 2010; Avcioglu i wsp 2010; Rzeżutka i wsp., 2010; Al-Megrin i wsp., 2010; Fallah I wsp., 2012; Sia Su i wsp., 2012). Wynika to z trudności związanych z wykrywaniem pasożytów w produktach spożywczych oraz z braku standaryzacji metod umożliwiających wykrywanie pasożytów w materiale pochodzenia roślinnego. Świeże produkty żywnościowe pochodzenia roślinnego stanowią trudny materiał do badań laboratoryjnych ze względu na nieregularną powierzchnię i liczne porowatości, które sprzyjają zanieczyszczeniu żywności przez patogeny, a także ich przeżywaniu.

Dotychczas, w Polsce opublikowano kilka prac dotyczących wykrywania pasożytów jelitowych w żywności pochodzenia roślinnego (Szelągiewicz i Tarczyński 1969,

Kasprzak i wsp., 1981; Rzeżutko i wsp., 2010) oraz fragment niniejszych badań (Jędrzejewski i wsp., 2007). Stąd też niewiele wiadomo o występowaniu stadiów dyspersyjnych pasożytów jelitowych na powierzchni produktów żywnościowych pochodzenia roślinnego. Podjęte badania pozwolą wyjaśnić w jakim stopniu żywność pochodzenia roślinnego jest zanieczyszczona stadiami dyspersyjnymi pasożytów jelitowych oraz czy mogą one stanowić potencjalne źródło zarażenia osób spożywających zanieczyszczone produkty.

1.2. Charakterystyka pasożytów stwierdzanych na powierzchni żywności pochodzenia roślinnego

Poniżej przedstawiono jedynie charakterystykę wybranych pasożytów, które z reguły wykrywano w tych badaniach.

1.2.1. *Giardia* spp.

Wiciowce z rodzaju *Giardia* pasożytują w jelicie cienkim człowieka i wielu gatunków kręgowców. Taksonomia i filogeneza *Giardia* jest nadal słabo określona, co wiąże się z licznymi kontrowersjami dotyczącymi transmisji tego pasożyta.

1.2.1.1. Rys historyczny

Organizm, znany obecnie jako *Giardia*, został po raz pierwszy opisany przez van Leeuwenhoeką w 1681 roku. Niemal po dwustu latach, został ponownie odkryty i dokładniej opisany przez czeskiego lekarza Lambla w 1859 roku, który nadał mu nazwę *Cercomonas intestinalis* tworząc jednocześnie homonimię (Kulda i Nohýnková, 1978; Meyer, 1994). W 1882 roku Künstler utworzył rodzaj *Giardia*, a sześć lat później Blanchard nazwał ten rodzaj *Lamblia*, aby uhonorować Lambla (Meyer, 1994). Na początku XX wieku stwierdzono, że rodzaj *Giardia* i *Lamblia* to synonimy i według Kodeksu Nomenklatury Zoologicznej prawidłową nazwą rodzaju jest *Giardia* (Filice, 1952). Przez następne dziesięciolecia w rodzaju *Giardia* opisano ponad 40 gatunków na podstawie występowania u określonych gatunków żywicieli (Kulda i Nohýnková, 1978). Jednak brak różnic morfologicznych oraz gromadzące się dowody o braku specyficzności żywicielskiej niektórych gatunków *Giardia* stały się przyczyną wielu wątpliwości. Ważne zmiany w taksonomii wprowadził w 1952 roku Filice, który na podstawie różnic w budowie trofozoitów podzielił wszystkie gatunki *Giardia* na trzy odrębne grupy morfologiczne: *G. duodenalis*, *G. agilis* i *G. muris*. Później, na podstawie różnic w budowie trofozoitów lub cyst widocznych w mikroskopie elektronowym wyodrębniono kolejne gatunki *G. psittaci*, *G. ardeae* i *G. microti* (Erlandsen i Bemrick, 1987; Feely, 1988;

Erlandsen i wsp., 1990). Jednak nadal najczęściej kontrowersji dotyczy *G. duodenalis* (syn. *G. intestinalis*, *G. lamblia*), pasożyta człowieka i wielu gatunków zwierząt (Sprong et al., 2009; Feng i Xiao, 2011).

1.2.1.2. Taksonomia *Giardia*

Według klasyfikacji opartej na morfologicznych, genetycznych i biochemicznych danych, *Giardia* należy do królestwa Protozoa, typu Metamonada, gromady Trepomonada, podgromady Diplozoa, rzędu Giardiida i rodziny Giardiidae (Cavalier-Smith, 2003). Obecnie, w obrębie tego rodzaju akceptowanych jest sześć gatunków (Tabela 1), które charakteryzują się różnym kręgiem żywicieli (Plutzer i wsp., 2010).

Tabela 1. Gatunki *Giardia* i ich żywicieli.

Gatunek	Żywiciel
<i>G. intestinalis</i> (syn. <i>G. lamblia</i> , <i>G. duodenalis</i>)	Człowiek i ssaki, m.in., naczelne, jeleniowate, bydło, psy, koty
<i>G. muris</i>	Gryzonie, głównie myszy i szczury
<i>G. microti</i>	Norniki, pizniki
<i>G. psittaci</i>	Ptaki, m.in. papugi
<i>G. ardeae</i>	Ptaki, m.in. czaple, ibisy, bociany
<i>G. agilis</i>	Płazy

Identyfikacja gatunku *Giardia* jest bardzo trudnym zadaniem. Z reguły podstawą rozpoznania zarażenia są cysty wydalane wraz z kałem żywiciela. Jednak cysty większości gatunków *Giardia* mają taką samą budowę. Tylko cysty *G. microti* różnią się od pozostałych tym, że wewnątrz cysty znajdują się już dwa uformowane trofozoity. Obecność morfologicznie identycznych cyst *Giardia* w próbach środowiskowych utrudnia dociekania epidemiologiczne, a tym samym oszacowanie ryzyka zarażenia ludzi. Dalszym utrudnieniem jest fakt, że *G. intestinalis* jest zróżnicowany gene-

tycznie i zawiera kilka grup genotypów (A-H), które cechują się odmienną specyficznością żywicielską (Feng i Xiao, 2011). W tabeli poniżej przedstawiono grupy genotypów *G. intestinalis* i ich krąg żywicieli.

Tabela 2. Grupy genotypów *G. intestinalis* i ich żywicieli.

Grupa genotypów	Żywiciel
A	Człowiek, i zwierzęta, m.in. kot, pies, zwierzęta hodowlane i dzikie, świnka morska
B	Człowiek, naczelne, pies, szynszyla, piżmak, koń, szczur, bóbr
C i D	Psowate
E	Hodowlane przeżuwacze, świnia
F	Kot
G	Szczur
H	foki

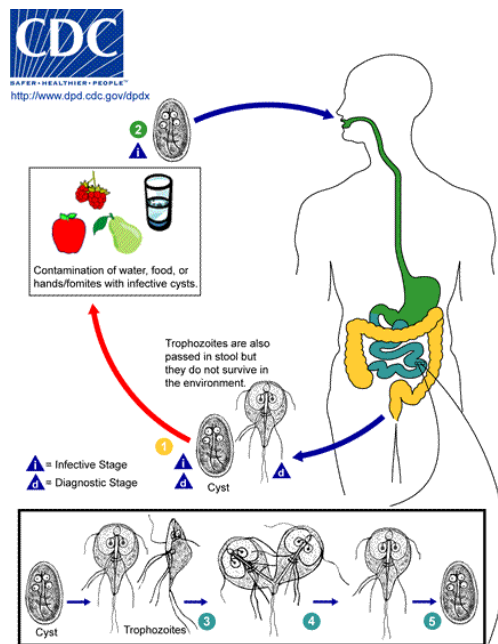
Zoonotyczny potencjał wykazują tylko genotypy z grupy A i B, przy czym u ludzi najczęściej wykrywane są genotypy z grupy B (56%), a nieco rzadziej z grupy A (43%); jakkolwiek u ludzi stwierdzono także pojedyncze przypadki zarażenia genotypami *G. intestinalis* z grupy C (0.1%), D (0.2%), E (0.2%) i F (0.2%) (Sprong i wsp., 2009).

1.2.1.3. Budowa i cykl rozwojowy

Giardia występuje w postaci trofozoitu i cysty. Cysty, o długości od 7 do 14 μm , mają przeważnie kształt owalny, rzadziej okrągły. Cechą charakterystyczną i jednocześnie diagnostyczną jest cytoplazma odstająca od ściany cysty. Wewnątrz cysty znajdują się dwa lub cztery jądra, aksonemy i ciała sierpowate. Natomiast trofozoity, o długości 12 do 20 μm , mają

kształt gruszkowaty o spłaszczonej powierzchni brzusznej, wyposażonej w tarczę przyssawkową. Trofozoity zawierają dwa jądra, cztery pary wici i ciała pośrodkowe.

Cykl rozwojowy *Giardia* jest prosty i odbywa się w jednym osobniku żywicielskim (Ryc. 1). Postacią inwazyjną jest cysta. Do zarażenia dochodzi na drodze fekalno-oralnej. Po połknięciu cyst, w dwunastnicy następuje ekscystacja. Uwolnione z cyst trofozoity kolonizują przedni odcinek jelita cienkiego, przyczepiając się za pomocą tarczy przyssawkowej do powierzchni komórek nabłonkowych - najczęściej w okolicy krypt.



Rycina 1. Schemat cyklu rozwojowego *G. intestinalis*

(ze strony internetowej CDC: www.dpd.cdc.gov/dpdx).

Trofozoity rozmnażają się bezpłciowo przez podział podłużny. Wskutek odnowy nabłonka jelita oraz ruchów perystaltycznych, nie przyczepione trofozoity wraz z treścią jelita są przesuwane do tylnego odcinka przewodu pokarmowego, gdzie ulegają encystacji. Cysty są wydalane z kałem żywiciela nieregularnie i w zmiennej liczbie i są odporne na działanie czynników środowiska zewnętrznego, za wyjątkiem wysuszenia i wysokiej temperatury. Także trofozoity mogą być wydalane do środowiska zewnętrznego wraz z biegunkowym

kałem, ponieważ zbyt szybki pasaż treści jelita uniemożliwia ich encystację. Jednak wydalone z kałem trofozoity szybko giną w środowisku zewnętrznym.

1.2.1.4. Diagnostyka

Rozpoznanie giardiozy opiera się głównie na mikroskopowej identyfikacji cyst i/lub trofozoitów pasożyta w rozmazie kału lub w osadzie uzyskanym dzięki wykorzystaniu technik zagęszczających. W diagnostyce stosuje się również komercyjne testy immunologiczne, które pozwalają wykryć cysty *Giardia* (test immunofluorescencji) lub koproantygen pasożyta (test immunoenzymatyczny). Natomiast rzadziej stosuje się dokuczliwe dla pacjenta metody badania treści dwunastniczej lub bioptatów dwunastnicy.

Chociaż metody molekularne są coraz częściej stosowane w diagnostyce giardiozy, to jednak ich wykorzystanie ogranicza się do laboratoriów badawczych.

1.2.1.5. Obraz kliniczny

Giardioza może mieć charakter inwazji krótkotrwałej, wygasającej spontanicznie, lub przewlekłej i niepodatnej na leczenie. Często przebiega bezobjawowo (u 20-84% zarażonych osób), a jeśli objawy występują, to głównie ze strony układu pokarmowego. W najcięższych przypadkach zarażenie *Giardia* jest przyczyną wodnistych biegunek i zespołu złego wchłaniania.

1.2.1.6. Epidemiologia

Giardioza jest jedną z najczęstszych pasożytów jelitowych człowieka wywoływanych przez pierwotniaki (Cook 1995). Częste występowanie *Giardia* u ludzi oraz u zwierząt świadczy o łatwości zarażenia, jak i o różnych drogach transmisji tego pasożyta. Najkrótszą drogą transmisji *Giardia* jest bezpośredni kontakt z zarażoną osobą lub zwierzęciem, podczas którego dochodzi do połknięcia cyst wydalonych z kałem zarażonego żywiciela. Istotną drogą jest

pośrednia transmisja cyst poprzez spożywanie zanieczyszczonej kałem ludzi i/lub zwierząt wody i żywności (m.in. Karanis i wsp., 2007; Porter i wsp. 1990). Dotychczas opisano ponad 130 wodnopochoдных epidemii giardiozy, których źródłem była woda pitna, ze zbiorników rekreacyjnych lub fontann (m.in. Karanis i wsp., 2007; Einstein i wsp., 2008). Natomiast niewiele jest udokumentowanych żywnościopochodnych epidemii giardiozy (Tabela 3). Wynika to głównie z mniejszego zainteresowania, jak i z licznych trudności w ustaleniu źródła epidemii. Z reguły, zanim wystąpią objawy zarażenia, nie ma już możliwości zbadania produktów żywnościowych. Brak jest standaryzowanych i czułych metod wykrywania cyst *Giardia* w produktach żywnościowych i istnieją duże trudności w ich wykrywaniu.

Tabela 3. Żywnościopochodne epidemie giardiozy.

Liczba zarażonych osób	Prawdopodobny rodzaj żywności	Prawdopodobne źródło zanieczyszczenia żywności	Autorzy
3	Świąteczny pudding	Odchody gryzoni	Conroy, 1960
29	Sałatka z łososia	Osoba przygotowująca posiłek	Osterholm i wsp., 1981
13	Sałatka z makaronem	Osoba przygotowująca posiłek	Petersen i wsp., 1988
88	Kanapki	brak danych	White i wsp., 1989
10	Sałatka owocowa	Osoba przygotowująca posiłek	Porter i wsp., 1990
Brak danych	Flaczki	Zarażona owca	Karabiber i wsp., 1991
27	Lód	Osoba przygotowująca posiłek	Quick i wsp., 1992
26	Surowe warzywa	Osoba przygotowująca posiłek	Mintz i wsp., 1993

Najczęstszym źródłem tego rodzaju epidemii było zanieczyszczenie żywności inwazyjnymi cystami przez osoby przygotowujące i serwujące żywność (Tabela 3). Osoby te miały kontakt z odchodami zarażonej osoby, bądź same były zarażone. Zazwyczaj zarażone osoby nie zdają sobie sprawy z tego, że mogą być źródłem inwazji, ponieważ giardioza może prze-

biegać bezobjawowo lub skąpoobjawowo. Z drugiej strony, wskazuje to na niską higienę osobistą osób przygotowujących, serwujących lub sprzedających żywność.

1.2.2. *Cryptosporidium* spp.

Kokcydia z rodzaju *Cryptosporidium* pasożytują u wielu gatunków kręgowców, w tym u człowieka, i podobnie jak w przypadku *Giardia* istnieje wiele kontrowersji odnośnie ich taksonomii.

1.2.2.1. Rys historyczny

W 1907 roku amerykański parazytolog Ernest Edward Tyzzer po raz pierwszy opisał organizm, którego wykrył w gruczołach żołądkowych myszy. Jednak dopiero trzy lata później nadał mu nazwę rodzajową i gatunkową – *C. muris* (Tyzzer, 1910). W 1912 roku ten sam badacz opisał nowy gatunek – *C. parvum*, który pasożytuje w komórkach nabłonkowych jelita cienkiego i ma mniejsze oocysty niż *C. muris* (Tyzzer, 1912). W latach 50-tych XX wieku opisano przypadki śmiertelnych zachorowań wśród młodych indyków, których przyczyną był kolejny gatunek – *C. meleagridis* (Slavin, 1955). Mimo to, przez kilka dekad uważano, że *Cryptosporidium* jest mało znaczącym i rzadkim pasożytem wewnątrzkomórkowym. Zainteresowanie tym pasożytniczym pierwotniakiem wzrosło na początku lat 70-tych XX wieku, kiedy zaczęto wykrywać obecność *Cryptosporidium* u cieląt z biegunką (Panciera i wsp. 1971). Od tego czasu zaczęły się pojawiać liczne prace opisujące ostrą i przewlekłą kryptosporydiozę u różnych gatunków zwierząt.

Pierwsze przypadki kryptosporydiozy u ludzi z biegunką opisano dopiero w końcu lat 70-tych XX wieku (Nime i wsp., 1976, Meisel i wsp., 1976). Przez następne lata wykryto kolejne przypadki kryptosporydiozy u ludzi, głównie z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami immunologicznymi lub poddanych terapii immunosupresyjnej. Stwierdzono także, że kryptosporydioza

jest przyczyną przewlekłej biegunki, która prowadzić może do zgonu osób chorych na AIDS. Jednak ogólnościatowe zainteresowanie *Cryptosporidium* nastąpiło dopiero po wybuch największej wodnopochoďnej epidemii, która objęła ok. 400 tysięcy mieszkańców miasta Milwaukee, USA (MacKenzie i wsp.1994). Od tego czasu rozpoczęto intensywne badania nad biologią *Cryptosporidium*, profilaktyką, terapią i doskonaleniem metod diagnostycznych.

1.2.2.2 Taksonomia *Cryptosporidium*

Pasożytnicze pierwotniaki należą do typu Apicomplexa, gromady Cophocidiasida, podgromady Coccidiasina, rzędu Eucoccidiorida i rodziny Cryptosporidiidae (Cavalier-Smith, 2003). Aktualnie, na podstawie danych morfologicznych, biologicznych i molekularnych opisano 18 gatunków *Cryptosporidium*, które pasożytują u płazów, gadów, ptaków i ssaków (Fayer, 2010) (Tabela 4).

Ponadto, u ryb opisano cztery gatunki - *C. cichlidis*, *C. molnari*, *C. reichenbachklinkei* i *C. scophthalmi* – jakkolwiek, ze względu na niewystarczające dane biologiczne i molekularne, nie są uznawane za odrębne gatunki (Fayer, 2010). Oprócz tego, znanych jest ponad 40 izolatów uzyskanych od różnych gatunków kręgowców, które nie mają statusu taksonomicznego i w piśmiennictwie są określane jako genotypy na podstawie analizy molekularnej i gatunku żywiciela.

Większość tych gatunków pasożytuje w komórkach nabłonka jelita cienkiego, a nieliczne w komórkach nabłonkowych żołądka (*C. muris*, *C. andersoni*, *C. serpentis* i *C. fragile*) lub - tak jak *C. baileyi* - w tchawicy i kloace (Fayer, 2010).

Mikroskopowa identyfikacja gatunku *Cryptosporidium* oparta na morfometrii oocyst jest praktycznie niemożliwa, ponieważ rozmiary oocyst wielu gatunków są takie same lub bardzo zbliżone.

Tabela 4. Gatunki *Cryptosporidium* i ich żywicieli.

Gatunek	Żywiciel
<i>C. fragile</i>	Płazy
<i>C. varanii</i>	Gady
<i>C. serpentis</i>	Gady
<i>C. meleagridis</i>	Ptaki, ssaki, człowiek
<i>C. baileyi</i>	Ptaki
<i>C. galli</i>	Ptaki
<i>C. muris</i>	Gryzonie, człowiek
<i>C. parvum</i>	Ssaki, człowiek
<i>C. wrairi</i>	Świnka morska
<i>C. felis</i>	Kot, człowiek
<i>C. andersoni</i>	Bydło, człowiek
<i>C. canis</i>	Psowate, człowiek
<i>C. hominis</i>	Człowiek, bydło, kozy, owce
<i>C. suis</i>	Świnia, człowiek
<i>C. bovis</i>	Bydło
<i>C. fayeri</i>	Torbacze
<i>C. ryanae</i>	Bydło
<i>C. macropodum</i>	Torbacze

Dotychczas, u osób z niedoborami immunologicznymi i z prawidłowo działającym układem odpornościowym stwierdzono kryptosporydiozę wywołaną przez osiem gatunków *Cryptosporidium* (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* i *C. andersoni*) i pięć genotypów - genotyp charakterystyczny dla jelenia, małpy, skunksa,

królika i pręgowca amerykańskiego (Xiao i wsp., 2004; Cacciò i wsp., 2005, Nichols i wsp., 2006a; Feltus i wsp., 2006). Jednak najczęściej zarażenie ludzi jest wywołane przez *C. hominis* i *C. parvum* (Cacciò i wsp., 2005)

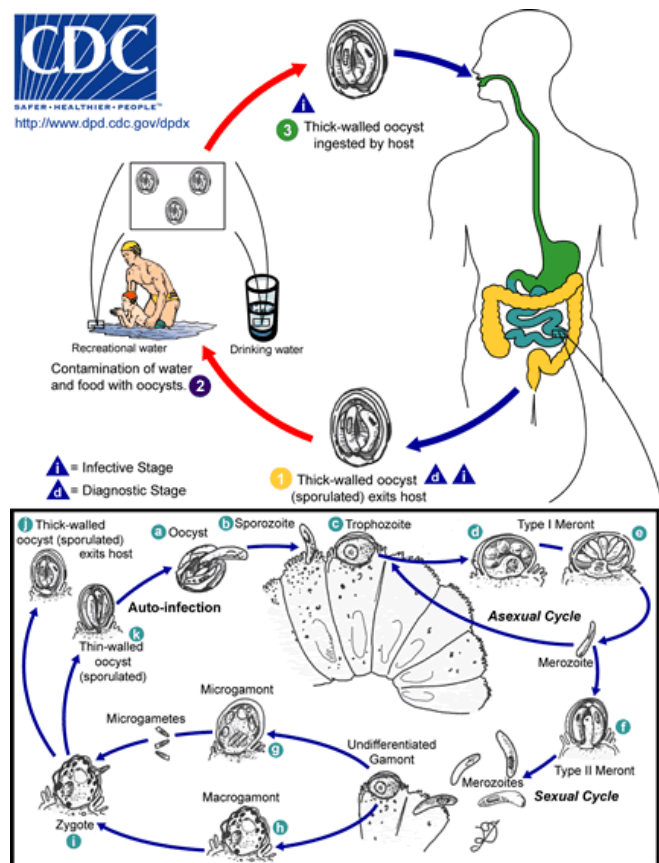
1.2.2.3. Budowa i cykl rozwojowy

Postacie rozwojowe *Cryptosporidium* są bardzo małe, a oocysty, które są zarówno postacią inwazyjną, jak i diagnostyczną, są okrągłe lub owalne i zawierają cztery sierpowate, jednojądrzaste sporozoity. Wielkość oocyst dwóch najczęściej wykrywanych u ludzi gatunków – *C. hominis* i *C. parvum* jest taka sama i wynosi 4.5 x 5.5 μm . Oocysty pozostałych gatunków *Cryptosporidium* wykrywanych u ludzi mają zbliżone rozmiary (od 4.4 do 5.2 μm) lub są nieco większe (5.5 x 7.4 μm), jak to mam miejsce w przypadku *C. muris* i *C. andersoni*.

Kryptosporydia są pasożytami homoksenicznymi, ponieważ cały cykl rozwojowy odbywa się w jednym osobniku żywiciela (Ryc. 2). Spośród wszystkich zbadanych gatunków *Cryptosporidium* najdokładniej został opisany cykl rozwojowy *C. parvum*. Do zarażenia dochodzi po połknięciu oocyst (rzadko wskutek inhalacji). W świetle jelita cienkiego z oocysty uwalniają się cztery ruchliwe sporozoity, które przyczepiają się do komórek nabłonka. Wewnątrzkomórkowe stadia *Cryptosporidium* lokalizują się poza cytoplazmą komórek żywiciela, wewnątrz wakuoli (*parasitophorous vacuole*). Każdy sporozoit przekształca się w kulistego trofozoit.

Trofozoity rozmnażają się bezpłciowo tworząc sześć lub osiem merozoitów otoczonych pojedynczą błoną (meront typu I). Następnie, uwolnione z merontu typu I merozoity albo wnikają do dalszych komórek nabłonka i rozmnażają się bezpłciowo, albo rozwijają się w meronty typu II zawierające 4 merozoity, które inicjują rozmnażanie płciowe. Powstają mikrogamonty i makrogamonty, które przekształcają się odpowiednio w mikrogamety i makrogamety. Po zapłodnieniu powstaje zygota, która ulegając bezpłciowemu podziałowi (sporogonii) tworzy oocystę, zawierającą cztery sporozoity. W cyklu rozwojowym występują dwa

rodzaje oocyst – cienkościenne i grubościenne. Cienkościenne oocysty ponownie inicjują cykl rozwojowy (autoinwazja) i są jedną z przyczyn przewlekłego zarażenia żywiciela, podczas gdy grubościenne są odporne na warunki środowiska zewnętrznego i są wydalane z kałem zarażonego żywiciela (stadia egzogenne). Oocysty te są od razu inwazyjne, co umożliwia szybką transmisję do kolejnego żywiciela. Okres inkubacji zależy od gatunku żywiciela i pasożyta. Doświadczalnie wykazano, że okres inkubacji *C. parvum* wynosi 4 do 22 dni u ludzi, 2 do 7 dni u cieląt, 2 do 14 dni u psów, 3 do 6 dni u świń i 2 do 5 dni u jagniąt (DuPont i wsp. 1995, Fayer i wsp. 1990).



Rycina 2. Schemat cyklu rozwojowego *Cryptosporidium*

(ze strony internetowej CDC: www.dpd.cdc.gov/dpdx).

C. parvum u człowieka zazwyczaj pasożytuje w komórkach nabłonka układu pokarmowego (najczęściej jelita cienkiego), rzadziej w komórkach nabłonka układu oddechowego.

1.2.2.4. Diagnostyka

Rozpoznanie kryptosporydiozy opiera się na mikroskopowej identyfikacji oocyst w kale lub osadzie uzyskanym przy wykorzystaniu technik zagęszczających. Oocysty *Cryptosporidium* można również wykryć w płwocinie i żółci. Do wykrywania oocyst konieczne jest stosowanie specyficznych barwień rozmazów kału, ponieważ metody stosowane w rutynowej diagnostyce parazytologicznej są zawodne. Najczęściej stosowane są techniki barwienia acid-fast, np. Ziehl-Neelsena (Garcia, 2001).

W laboratoriach diagnostycznych stosuje się metody immunologiczne do wykrywania oocyst lub koproantygenów *Cryptosporidium* w kale. Dostępne są komercyjne testy immunofluorescencyjne i immunoenzymatyczne. Natomiast wykorzystanie technik biologii molekularnej, które jest konieczne do identyfikacji gatunku *Cryptosporidium*, ograniczone jest do laboratoriów naukowych.

1.2.2.5. Obraz kliniczny

Najczęstszym objawem zarażenia są obfite i częste biegunkowe wypróżnienia, co prowadzi do odwodnienia i do nagłej utraty wagi ciała. Towarzyszą im także bóle brzucha, głowy i mięśni, podwyższona temperatura, nudności i wymioty oraz złe samopoczucie, osłabienie, zmęczenie i brak apetytu. Czas trwania i nasilenie objawów klinicznych kryptosporydiozy zależy od stanu układu immunologicznego żywiciela. U większości osób z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym występuje łagodne zapalenie jelita, które trwa 1–2 tygodni, podczas gdy u osób z obniżoną odpornością (leczonych immunosupresyjnie lub zakażonych wirusem HIV) występuje intensywna biegunka, która może przejść w stan zagrażający życiu często prowadzący do zgonu (Okhuysen i wsp., 1999, Spano i wsp., 2000, Delis i wsp., 2002). W takich przypadkach *Cryptosporidium* wykrywano także poza jelitem cienkim – w przełyku, żołądku, pęcherzyku żółciowym, wątrobie i trzustce oraz układzie

oddechowym. W nielicznych przypadkach kryptosporydioza prowadzi do niewydolności układu oddechowego lub żółtaczkę (Brandoniso i wsp., 1993). Inwazji układu oddechowego towarzyszy kaszel, zapalenie krtani i tchawicy, chrypka i duszność.

1.2.2.6. Epidemiologia

Kryptosporydioza jest częstą pasożytniczą u ludzi i zwierząt na całym świecie, za wyjątkiem Antarktydy (O'Connor et al., 2004). Podobnie jak w przypadku *Giardia*, do zarażenia dochodzi na drodze fekalno-oralnej wskutek bezpośredniego kontaktu z zarażonym żywicielem lub pośrednio przez konsumpcję wody i żywności zanieczyszczonej kałem ludzi i/lub zwierząt (m.in., O'Donoghue i wsp., 1995; Okhuysen i wsp., 1999; Karanis i wsp., 2007). Bezpośrednia transmisja oocyst odgrywa istotną rolę w żłobkach, przedszkolach, domach opieki dla osób starszych oraz w szpitalach (Tangermann 1991; Neil i wsp., 1996; Xiao i wsp., 2004).

Kryptosporydioza jest częsta u zwierząt, głównie u młodych przeżuwaczy i jest przyczyną dużych strat ekonomicznych, a jednocześnie odchody zwierząt są istotnym czynnikiem przyczyniającym się do zanieczyszczenia środowiska oocystami (Smith 2008 i Smith i wsp., 1995). Tym bardziej, że zarażony osobnik może wydalać dziennie nawet 10^{10} oocyst (Casey, 1991).

Dotychczas opisano ponad 165 wodnopochoodnych epidemii kryptosporydiozy (Karanis i wsp., 2007). Natomiast z tych samych powodów, co w przypadku żywnościopochodnych epidemii giardiozy (patrz rozdz.1.2.1.6), znanych jest niewiele epidemii żywnościopochodnych (Tabela 5). Powodem jest również to, że epidemie żywnościopochodne występują sporadycznie i w większym rozproszeniu niż ma to miejsce w przypadku epidemii wodnopochoodnych, które łatwiej przypisać do konkretnego źródła wody (Smith i wsp., 2007). Tylko w kilku epidemiach określono gatunek *Cryptosporidium* (Tabela 5).

Tabela 5. Wybrane epidemie żywnościopochodne kryptosporydiozy.

Liczba zarażonych osób	Prawdopodobny rodzaj żywności	Prawdopodobne źródło zanieczyszczenia żywności	Autorzy
160	Sok jabłkowy	Odchody bydła	Millard i wsp., 1994
15	Sałatka z kurczaka	Osoba przygotowująca posiłek	Anonim, 1996
25	Sok jabłkowy	Zanieczyszczona woda użyta do mycia jabłek	Anonim, 1997
28	Mleko krowie	Brak pasteryzacji	Gelletlie i wsp., 1997
152	Posiłki sprzedawane w kampusie uniwersyteckim	Osoba przygotowująca posiłek	Quiroz i wsp., 2000
8	Mleko krowie	Brak pasteryzacji	Harper i wsp., 2002
12	Sok jabłkowy	Odchody bydła	Blackburn i wsp., 2006
15	Natka pietruszki	Brak danych	Insulander i wsp., 2008

W zależności od źródła zanieczyszczenia żywności liczba stadiów dyspersyjnych może być bardzo różna. Jeżeli bezpośrednią przyczyną jest kał zarażonego żywiciela, to liczba oocyst może być znaczna, natomiast ich liczba będzie mniejsza w przypadku użycia wody zanieczyszczonej oocystami *Cryptosporidium* do podlewania upraw roślinnych, spryskiwania lub płukania żywności. Jakkolwiek, już mała dawka oocyst (9-1024) wywołuje inwazję u zdrowych osób (Okhuysen i wsp., 1999).

Stwierdzono wyraźną sezonowość występowania kryptosporydiozy; większą liczbę przypadków u ludzi stwierdza się wiosną i jesienią, co związane jest z dużymi opadami deszczu (Lal et al. 2012).

1.2.3. Mikrosporydia

Mikrosporydia są obligatoryjnymi jednokomórkowymi pasożytami o niejasnej pozycji filogenetycznej. Są wewnątrzkomórkowymi pasożytami licznych gatunków bezkręgowców i kręgowców, w tym i człowieka.

1.2.3.1. Rys historyczny

Pierwszy opis tych organizmów pochodzi z XVII wieku; wówczas stwierdzono, że są one przyczyną choroby jedwabników (pebryna) powodującej duże straty w hodowli tych owadów. Jednak dopiero dwa wieki później zidentyfikowano i nazwano pierwszy gatunek mikrosporydium - *Nosema bombycis*, który był przyczyną pebryny jedwabników (Nägeli, 1857). Od tego czasu opisano ponad 1200 gatunków mikrosporydiów. Większość z nich jest pasożytami zwierząt i ma duże znaczenie w medycynie weterynaryjnej, ze względu na znaczne straty w hodowli. Natomiast po raz pierwszy mikrosporydiozę u człowieka opisano w 1959 roku (Matsubayashi i wsp., 1959). Przez kolejne trzy dekady mikrosporydiozę u ludzi opisywano niezwykle rzadko. Aktualnie mikrosporydia są uznawane za patogeny zagrażające zdrowiu i życiu ludzi.

1.2.3.2. Taksonomia

Początkowo mikrosporydia zaliczano do prymitywnych pierwotniaków (Vossbrinck i wsp., 1987), lub uważano za siostrzaną grupę jednokomórkowych grzybów (Hirt i wsp., 1999), a obecnie zaliczane są do królestwa Fungi i typu Microsporidia (Hibett i wsp., 2007).

Do tej pory opisano 1200 gatunków mikrosporydiów należących do 143 rodzajów, co świadczy o olbrzymiej różnorodności i powoduje częste rewizje taksonomiczne (Didier, 2005). Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, u człowieka opisano występowanie 15 gatunków

mikrosporydiów (Tabela 6) i nadal są opisywane nowe gatunki (www.dpd.cdc.gov/dpdx; Didier i Weiss, 2006; Chaudhary i wsp., 2011; Suankratay i wsp., 2012).

Tabela 6. Gatunki mikrosporydiów wykryte u ludzi.

Gatunek	Żywiciele	Główny obraz kliniczny
<i>Enterocytozoon bienersi</i>	człowiek, ssaki i ptaki	biegunka, zapalenie pęcherzyka żółciowego
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	człowiek, ssaki i ptaki	biegunka, inwazja rozsiana (inwazja oka, układu oddechowego i moczowopłciowego)
<i>Encephalitozoon hellem</i>	ptaki, człowiek, ssaki	zapalenie spojówki i rogówki; inwazja układu oddechowego i moczowopłciowego, inwazja rozsiana
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	ssaki, człowiek i ptaki	zapalenie spojówki i rogówki; inwazja układu oddechowego i moczowopłciowego, inwazja rozsiana
<i>Pleistophora ronneafiei</i>	nieznany	zapalenie mięśni
<i>Trachipleistophora hominis</i>	komary	zapalenie rogówki, inwazja mięśni, inwazja rozsiana
<i>Trachipleistophora anthropoptera</i>	nieznany	inwazja rozsiana
<i>Anncaliia vesicularum</i>	nieznany	zapalenie mięśni
<i>Anncaliia connori</i>	nieznany	inwazja oka
<i>Anncaliia algerae</i>	Komary	zapalenie spojówki i rogówki, inwazja skóry i mięśni
<i>Nosema ocularum</i>	nieznany	inwazja oka
<i>Vittaforma corneae</i>	nieznany	inwazja oka i układu moczowego
<i>Microsporidium ceylonensis</i>	nieznany	inwazja rogówki
<i>Microsporidium africanum</i>	nieznany	inwazja rogówki
<i>Tubulinosema acridophagus</i>	muszka owocowa	zapalenie mięśni i inwazja rozsiana

Warto zauważyć, że znaczna część gatunków mikrosporydiów jest inwazyjnych, zarówno dla człowieka jak i dla zwierząt, a gatunki z rodzaju *Enterocytozoon* i *Encephalitozoon* są najczęściej odpowiedzialne za wywoływanie mikrosporydiozy u ludzi (www.dpd.cdc.gov/dpdx), stąd też warto je krótko scharakteryzować.

E. bienewsi jest najczęstszą przyczyną mikrosporydiozy u ludzi (Didier i wsp., 2004). Dotychczas opisano ponad 1000 przypadków zarażenia ludzi *E. bienewsi*; były to głównie osoby zakażone wirusem HIV, po transplantacji, a także powracający z krajów tropikalnych (Didier, 2005). Biotopem tego gatunku są najczęściej komórki nabłonka jelita cienkiego, przewodów żółciowych, pęcherzyka żółciowego i wątroby. *E. bienewsi* może być również przyczyną zapalenia płuc i oskrzeli, ale znane są także inwazje bezobjawowe (Pol i wsp., 1992; del Aguila i wsp., 1997; Mungthin i wsp., 2001; Abreu-Acosta i wsp., 2005; Sarfati i wsp., 2006). Człowiek nie jest jedynym rezerwuarem tego pasożyta. Wykryto go również u ssaków hodowlanych i dziko żyjących oraz u zwierząt hodowanych w ogrodach zoologicznych, a także u kilku gatunków ptaków (m.in.: Deplazes i wsp., 1996; Mansfield i wsp., 1997; del Aguila i wsp., 2004; Słodkiewicz-Kowalska i wsp., 2006; Lee, 2007; Müller i wsp., 2008).

E. intestinalis wykryto i opisano na początku lat 90-tych (Cali i wsp., 1993). Dotychczas opisano kilkaset przypadków mikrosporydiozy wywołanej przez *E. intestinalis* (Didier, 2005). Uważa się, że inwazja tym pasożytem przebiega często bezobjawowo, co sprawia, że niewiele przypadków zarażenia zostaje wykrytych (Franzen i wsp., 1996). *E. intestinalis* pasożytuje głównie w komórkach nabłonkowych układu pokarmowego, ale także w makrofagach błony podstawnej, fibroblastach i komórkach śródbłonka i często jest przyczyną inwazji rozsianej obejmującej niemal wszystkie narządy (Lippert i wsp., 2003). *E. intestinalis* rzadko jest wykrywany u zwierząt (Bornay-Llinares i wsp., 1998; Haro i wsp., 2005; Nimmo i wsp., 2007; Słodkiewicz-Kowalska i wsp., 2006, 2007). Przypuszcza się, że istnieje możliwość transmisji tego patogenu

między ludźmi i naczelnymi, jednak nie do końca wiadomo, czy ludzie, czy zwierzęta, są typowymi żywicielami (Graczyk i wsp., 2002).

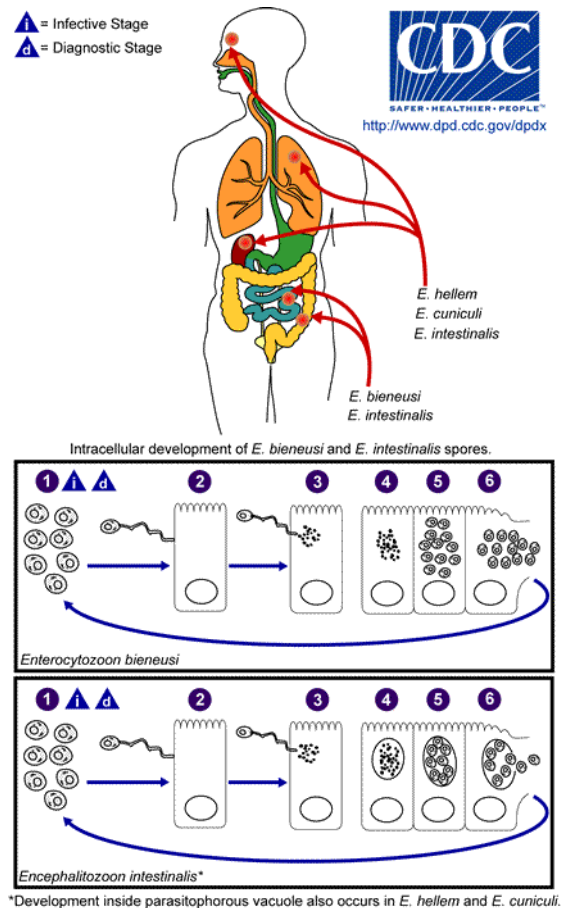
Występowanie *E. cuniculi* opisano u wielu gatunków zwierząt, między innymi u naczelnych, gryzoni, drapieżnych, a rzadziej u ptaków (Didier, 2005). Uważa się, że encephalitozoonoza u ludzi wywołana przez *E. cuniculi* ma charakter zoonotyczny (Didier i wsp., 1996; Mathis i wsp., 1997). Pierwszy przypadek zarażenia przez *E. cuniculi* człowieka opisano u pacjenta z AIDS, który zmarł w 1987 roku (Terada i wsp., 1987). Od tego czasu opisano ponad 20 przypadków klinicznych inwazji *E. cuniculi*. Dotyczyły one osób zakażonych HIV lub będących po transplantacji (m. in.: Deplazes i wsp., 1996; Mohindra i wsp., 2002; Gamboa-Dominguez i wsp., 2003; Mathis i wsp., 2005; Omura i wsp., 2007). Zarażenie *E. cuniculi* u ludzi może prowadzić do niewydolności nerek, a także dawać dolegliwości ze strony układu oddechowego i nerwowego.

E. hellem został opisany po raz pierwszy w 1991 roku (Didier i wsp., 1991). Występowanie tego gatunku u człowieka jest ściśle związane z niewydolnością i osłabieniem układu immunologicznego zarażonych osób (Latib i wsp., 2001). Może on wywoływać różne objawy chorobowe, takie jak zapalenie zatok, płucną i rozsianą mikrosporydiozę (Scaglia i wsp., 1998), a także zapalenie rogówki i spojówek (Didier i wsp., 1991). Obecnie wiadomo, że różne gatunki ptaków i rzadziej ssaków, mogą być żywicielami *E. hellem* (Black i wsp., 1997, Słodkowicz-Kowalska i wsp., 2006; Graczyk i wsp., 2008)

1.2.3.3. Budowa i cykl rozwojowy

Postacią inwazyjną i diagnostyczną są spory, które charakteryzują się niewielkimi rozmiarami (1-4 μm) i skomplikowaną strukturę wewnętrzną. We wnętrzu spory - oprócz typowych elementów komórkowych – znajduje się charakterystyczny tylko dla tych organizmów aparat wystrzeliwiający sporoplazmę. Jest on zbudowany z długiej, zawiniętej kuliście wokół sporoplazmy nici biegunowej. Całość struktury zakończona jest specjalną płytką kotwiczną. Liczba

zwojów nici biegunowej waha się od 4 do 30 i jest cechą diagnostyczną, charakterystyczną dla poszczególnych gatunków (Weiss, 2001). Otoczka zapewnia sporom mikrosporydiów nadzwyczajną oporność na działanie czynników środowiska zewnętrznego i środków dezynfekcyjnych (Didier i wsp., 2004; Svedhem i wsp., 2002).



Rycina 3. Cykl rozwojowy mikrosporydiów z rodzaju *Encephalitozoon* i *Enterocytozoon* (ze strony internetowej CDC: www.dpd.cdc.gov/dpdx)

Wszystkie gatunki należące do mikrosporydiów są pasożytami homoksenicznymi i dopełniają swój cykl rozwojowy w jednym osobniku żywicielskim (Ryc.3). Po dostaniu się spory do organizmu żywiciela, sporoplazma trafia do wnętrza komórki żywiciela przez gwałtownie wystrzeliwaną ze spory nici biegunową. Proces ten, dzięki któremu komórka żywiciela zostaje zainfekowana, jest specyficzny tylko dla mikrosporydiów i zachodzi bardzo szybko. Pasożyt we wnętrzu komórki żywiciela rozmnaża się w dwojaki sposób: przez podział komórki (*Encephalitozoon*) lub wielokrotny podział jądra, przebiegający bez podziału cytoplazmy. Po-

woduje to powstanie wielojądrowych komórek (*Enterocytozoon*). Następnym etapem rozwoju pasożyta jest sporogonia, w wyniku której powstają spory. Błona komórkowa żywiciela ulega rozpadowi i rozerwaniu, co prowadzi do uwolnienia bardzo wielu stadiów dyspersyjnych – spor, które albo inwadują następne komórki żywiciela, albo też zostają wydalone do środowiska zewnętrznego (Weiss, 2001). Okres inkubacji jest nieznany (Decrane i wsp., 2012).

1.2.3.4. Diagnostyka

Spory mikrosporydiów można wykryć w różnym materiale diagnostycznym, np. w wydalinach, wydzielinach płynach ustrojowych oraz w materiale biopsyjnym żywiciela, a także w próbach środowiskowych (woda, żywność). W diagnostyce mikrosporydiozy stosuje się metody mikroskopowe (mikroskopia świetlna, epifluorescencyjna i elektronowa), immunologiczne, molekularne oraz rzadko hodowle *in vitro* (Garcia, 2002).

Ze względu na małe rozmiary spor, ich wykrycie i identyfikacja gatunku narażają na duże problemy. W mikroskopowym badaniu materiału diagnostycznego konieczne jest stosowanie specyficznych metod barwienia. W zależności od badanego materiału stosowane są różne techniki barwienia; jeżeli materiałem diagnostycznym są wydaliny lub wydzieliny żywiciela stosuje się barwienie chromotropem, metodą Giemsy lub chemofluorescencją, a w przypadku badania materiału cytologicznego barwienie Grama. Do barwienia bioptatów wykorzystywane jest także, m. in. barwienie hematoksyliną i eozyną, barwienie PAS lub barwienie Warthin-Starry'a (Schwartz i wsp., 1996). Jednak w diagnostyce laboratoryjnej mikrosporydiozy najczęściej wykorzystywane jest barwienie chromotropem według Webera i współpracowników (1992). Podstawą rozpoznania spor jest ich wielkość, zabarwienie (jasnoróżowe lub czerwone) i charakterystyczne struktury wewnętrzne oraz przejaśnienie w środku spor. W podobny sposób barwią się także inne jednokomórkowe grzyby oraz bakterie, dlatego diagnosta musi posiadać duże doświadczenie, aby prawidłowo zidentyfikować spory mikrosporydiów. W laboratoriach diagnostycznych stosowane są również barwniki fluorescencyjne, z których najczęściej wykorzystywany jest Calcofluor M2R (Vavra i Chalupsky, 1982). Rozpoznanie

proceeds at the use of a fluorescence microscope, equipped with a filter passing the wavelength of 395-415 nm. Spores of microsporidia fluoresce in blue-white color, and their walls in turquoise color. Unfortunately, the same fluorescence can also be observed in fungi, bacteria and artifacts (Didier et al., 1995). Therefore, a positive result of chemofluorescence must be confirmed by staining with chromotrope, which not only increases the cost of the study, but also prolongs the waiting time for the result (Didier et al., 1995). It should be emphasized that the most commonly used in the diagnosis of microsporidiosis staining methods based on chromotrope and fluorescent dyes, do not allow for the identification of the microsporidium species.

In scientific laboratories in the diagnosis of microsporidiosis, mainly caused by species of the genus *Encephalitozoon*, immunological methods are also used, which allow for the detection of antigens or antibodies (Didier et al., 1995; Croppo et al., 1998). However, a significant limitation of these methods is the lack of commercial kits used for this purpose.

In scientific laboratories, *in vitro* culture methods, electron microscopy and molecular biology techniques (Garcia, 2001). The first two methods are time-consuming and expensive, while molecular biology techniques (mainly PCR, sequencing and fluorescence in situ hybridization - FISH) are increasingly used for the identification of the microsporidium species or genotype, both in clinical and environmental studies (Garcia, 2002). It should be noted that a major drawback of PCR is the possibility of obtaining false negative results, due to the presence of PCR inhibitors in the sample, the inability to distinguish between live and dead organisms, and the determination of the number of parasites.

In recent years, in the diagnosis of microsporidiosis, the FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) and multiplex FISH techniques are increasingly used, which are based on the use of

fluorescencyjnie znakowanych oligonukleotydów hybrydujących z gatunkowo specyficznymi fragmentami 16S rRNA pasożyta. Rozróżnienie gatunków mikrosporydiów opiera się na podstawie charakterystycznego zabarwienia spor, w zależności od użytego fluorochromu (Hester i wsp., 2000; Graczyk i wsp., 2002). Technika FISH umożliwia określenie nie tylko gatunku mikrosporydium, ale również pozwala odróżnić spory żywe od martwych, co jest przydatne do określenia inwazyjności pasożyta. Metoda ta, mimo swojej czasochłonności, jest wysoce czuła i specyficzna.

Częstość występowania mikrosporydiów u ludzi i zwierząt jest prawdopodobnie zaniżona z wielu względów, m. in.: (1) są to bardzo małe organizmy, które można łatwo przeoczyć w trakcie przeglądania preparatów; (2) ich wykrycie wymaga wykorzystania specyficznych metod, które nie są stosowane w rutynowej diagnostyce; (3) inwazja może być bezobjawowa, lub objawy kliniczne są różnorodne; (4) identyfikacja gatunku jest możliwa tylko przy wykorzystaniu mikroskopii elektronowej, lub metod molekularnych. Warto dodać, że identyfikacja gatunku i genotypu jest również bardzo przydatna w dochodzeniu epidemiologicznym, ponieważ umożliwia precyzyjne określenie źródła zarażenia.

1.2.3.5. Obraz kliniczny

W zależności od gatunku mikrosporydium, biotopu, intensywności zarażenia i stanu immunologicznego żywiciela objawy mikrosporydiozy są różne (Tabela 6). Mikrosporydioza jest z reguły nieuleczalną i prowadzącą do zgonu chorobą oportunistyczną, występującą głównie u osób z obniżoną odpornością, np. zakażonych HIV, leczonych immunosupresyjnie lub po transplantacji narządów (Didier, 2005). Z doświadczeń wielu ośrodków wynika, że mikrosporydioza jelitowa jest częstą przyczyną biegunek i zespołu wyniszczenia u osób HIV-pozytywnych. Udokumentowane są także przypadki inwazji oka, nerek, płuc, mięśni, wątroby, pęcherzyka żółciowego, otrzewnej i centralnego układu nerwowego. Uważa się, że

wszystkie gatunki mikrosporidiów wykrywane u osób z obniżoną odpornością mogą być przyczyną uogólnionej inwazji (Didier, 2005).

1.2.3.6. Epidemiologia

Mikrosporydia są organizmami kosmopolitycznymi, jednak ciągle mamy niewystarczające dane na temat ich występowania w wielu krajach świata, w tym także w Polsce. Mikrosporydioza u ludzi występuje z różną częstością, która waha się od 0 do 81.5%. ((Didier i wsp., 2004). Inwazja u ludzi najczęściej związana jest z nieprawidłowym działaniem układu odpornościowego. Jednak rozwój metod diagnostycznych i zwiększone zainteresowanie mikrosporydiami sprawiły, że zaczęto je wykrywać również u pacjentów po przeszczepach, u dzieci i osób w podeszłym wieku (Didier, 2005).

Mikrosporydia są nowymi patogenami człowieka i dlatego źródła zarażenia oraz sposoby transmisji nie są w pełni poznane (Decreane i wsp., 2012). Źródłem inwazji mogą być zarażeni ludzie oraz zwierzęta. Morfologiczna i molekularna analiza mikrosporydiów wykrytych u ludzi i zwierząt wskazuje, że mikrosporydioza u ludzi ma charakter zoonotyczny (McInnesi Stewart, 1991; Graczyk i wsp., 2002; Mathis i wsp., 2005). Spory mikrosporydiów, które są postaciami inwazyjnymi, dostają się do środowiska najczęściej wraz z wydaliniami lub wydzielinami zarażonych żywicieli lub po ich rozkładzie (Didier, 2005). Są one wysoce odporne na działanie czynników środowiskowych. Zachowują żywotność przez 10 lat przechowywania w wodzie destylowanej; doświadczalnie wykazano, że spory *E. cuniculi* pozostały inwazyjne po 2 latach przechowywania w temperaturze 4⁰C lub po 24 godzinnym mrożeniu w temperaturze -24⁰C (Kudela i wsp. 1999). Również spory *E. intestinalis*, *E. hellem* i *E. cuniculi* są inwazyjne po kilkumiesięcznej inkubacji w wodzie o zmiennej temperaturze - od 10 do 30⁰C (Li i wsp. 2003). Ponadto, spory pozostają żywe po godzinnym podgrzewaniu w temperaturze 56⁰C i są odporne na wysychanie. Stąd też uważa się, że obecność spor w środowisku jest powszechna (Didier i wsp., 2004; Didier, 2005). Do zarażenia dochodzi głównie na drodze pokarmowej i inhalacyjnej (Gra-

czyk i wsp., 2007b). Kilka gatunków mikrosporydiów inwazyjnych dla człowieka (Tabela 6) jest przenoszonych przez owady (Visvesvara i wsp., 1999; Weidner i wsp. 1999; Dascomb i wsp., 2000).

Woda jest głównym źródłem pośredniej drogi zarażenia mikrosporydiami. Obecność spor stwierdzano zarówno w ściekach, wodach powierzchniowych i gruntowych, jak i w wodzie pitnej. W związku z tym przypuszcza się, że picie niefiltrowanej wody wodociągowej, pochodzącej ze studni oraz korzystanie z różnego rodzaju zbiorników rekreacyjnych może prowadzić do zarażenia i występowania jelitowej mikrosporydiozy u ludzi (Graczyk i wsp., 2007a; Izquierdo i wsp. 2011). Dotychczas opisano jedną wodnopochoďną epidemię mikrosporydiozy, której źródłem była woda wodociągowa (Cotte i wsp., 1999).

Źródłem zarażenia mikrosporydiami jest prawdopodobnie także żywność pochodzenia roślinnego, szczególnie, gdy uprawy nawozi się odchodami lub do jej mycia używa się zanieczyszczonej wody. Przykładem mogą być wykryte spory *E. bieneusi*, *E. intestinalis* i *E. cuniculi* w produktach pochodzenia roślinnego (Jedrzejewski i wsp., 2007). Znana jest jedna żywnościopochodna epidemia mikrosporydiozy wywołanej przez *E. bieneusi*; zarażeniu uległo 135 gości jednego z hotelu w Szwecji, a źródłem inwazji były ogórki (Decrane i wsp., 2012).

Podobnie jak *C. parvum*, dwa najczęściej wykrywane u człowieka gatunki mikrosporydiów - *E. bieneusi* i *E. intestinalis* - znajdują się na liście czynników (kategoria B), które można wykorzystać jako broń biologiczną oraz na liście mikrobiologicznych zanieczyszczeń wody pitnej (http://www2.niaid.nih.gov/Biodefense/bandc_priority.htm; <http://www.epa.gov/safewater/ccl/cclfs.html>).

1.2.4. *Ascaris* spp.

Ascaris lumbricoides i *A. suum* należą do najczęstszych pasożytów jelitowych – odpowiednio – człowieka i świń.

1.2.4.1. Rys historyczny

Ze względu na dużą wielkość i częste występowanie na całym świecie, oba gatunki tych nicieni były pierwszymi pasożytami poznanymi przez ludzi, ponieważ wzmianki o nich znaleziono w słynnym papirusie Ebersa, datowanym na 1550 lat p.n.e. (Roberts i Janovy, 1996). Ponadto, znalezienie jaj *A. lumbricoides* w sfosylizowanym kale ludzkim datowanym na ponad 30 tysięcy lat temu wskazuje, że glista ludzka była już pasożytem człowieka w okresie plejstocenu (Bouchet i wsp., 1996). Pierwszego opisu *A. lumbricoides* dokonał Linneusz w 1758 roku, a *A. suum* Goeze w 1782 roku (Dold i Holland, 2010).

1.2.4.2. Taksonomia

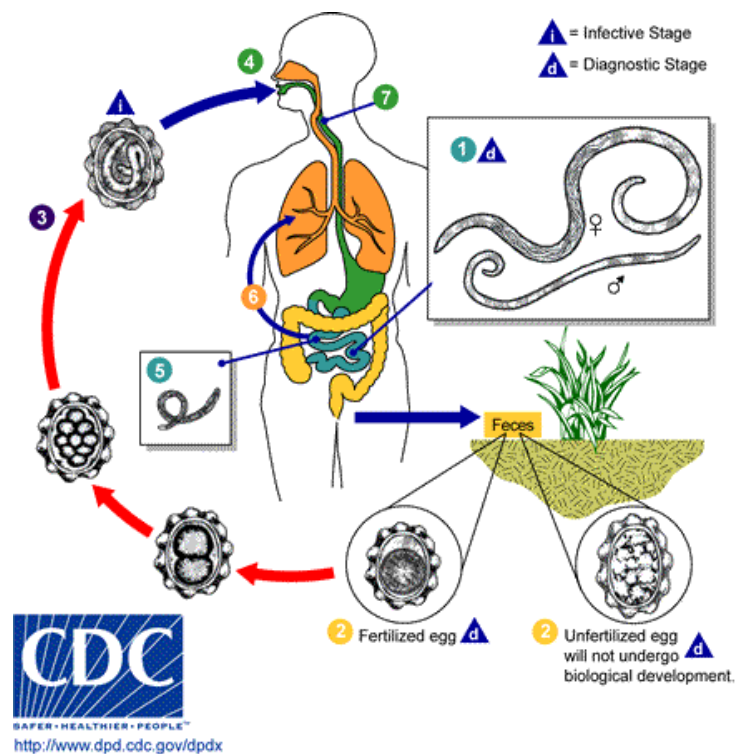
Ascaris lumbricoides i *A. suum* należą do typu Nematoda, gromady Secernentea, rzędu Ascaridida i rodziny Ascarididae.

1.2.4.3. Budowa i cykl rozwojowy

Oba gatunki *Ascaris* są morfologicznie identyczne. Długość dorosłych samic waha się od 20 do 40 cm, natomiast samce są nieco mniejsze (15 do 30 cm) i mają zagięty tylny odcinek ciała. Zapłodnione jaja o długości 45-70 μm , są owalne, mają grubą, pofałdowaną otoczkę zewnętrzną, podczas gdy jaja niezapłodnione są smuklejsze i większe (75 do 90 μm), a ich otoczka jest cieńsza i mniej pofałdowana. Chociaż oba gatunki nicieni mają taką samą budowę, to jednak są specyficzne dla swoich żywicieli. Jednak doświadczalnie wykazano, że istnieje możliwość krzyżowej transmisji; znane są też przypadki zarażenia ludzi *A. suum* (cyt. za Dold i Holland, 2010).

Gatunki *Ascaris* są pasożytami homoksenicznymi i dopełniają swój cykl rozwojowy w jednym osobniku żywicielskim (Ryc. 4). Postacie dojrzałe żyją w jelicie cienkim. Samica składa około 200 tysięcy jaj dziennie, które są wydalane do środowiska wraz z kałem żywiciela. Niezapłodnione jaja są nieinwazyjne, natomiast zapłodnione wymagają rozwoju zarodkowego, który w zależności od warunków środowiskowych trwa od trzech do kilkunastu tygodni. W tym okresie

wewnątrz jaj rozwija się larwa. Do zarażenia dochodzi na drodze fekalno-oralnej. Po połknięciu inwazyjnych jaj, w jelicie cienkim wylęgają się larwy, które penetrują błonę śluzową i wraz z krwią dostają się do wątroby, a następnie do płuc, po czym migrują do tchawicy i gardła. Po połknięciu larwy przekształcają się w postaci dojrzałe w jelicie cienkim. Migracja larw w organizmie żywiciela trwa około dwóch tygodni. Pierwsze jaja składane przez samice pojawiają się w kale po 2 do 3 miesiącach od połknięcia jaj. Dojrzałe glisty żyją od 1 roku do 2 lat.



Rycina 4. Cykl rozwojowy *Ascaris lumbricoides*
(ze strony internetowej CDC: www.dpd.cdc.gov/dpdx).

1.2.4.4. Diagnostyka

Rozpoznanie zarażenia oparte jest głównie na mikroskopowej identyfikacji jaj w kale. Zalecane są też metody zagęszczające (sedymentacyjne). Postacie dojrzałe, które są czasami wydalane z kałem, lub wydostają się przez usta, bądź nos można rozpoznać makroskopowo po cechach budowy. Natomiast larwy można wykryć w płwocinie w czasie ich wędrówki w organizmie żywiciela.

1.2.4.5. Obraz kliniczny

Obecność dojrzałych osobników *Ascaris* zazwyczaj nie wywołuje ostrych objawów u ludzi, chociaż, ze względu na tendencję migrowania dorosłych glist do innych biotopów, nawet pojedynczy pasożyt może spowodować poważne konsekwencje zdrowotne, np. zaciopowanie przewodu żółciowego. Natomiast obecność dużej liczby glist w jelicie cienkim wiąże się z utratą apetytu, złym trawieniem laktozy, spadkiem wagi, bólami brzucha oraz niedrożnością jelita cienkiego. U niektórych osób występują także objawy alergiczne. Podczas wędrówki larw w płucach mogą wystąpić takie objawy, jak: kaszel, duszność, eozynofilowe zapalenie płuc, zwane często zespołem Löfflera. U świń zarażonych *A. suum* występują podobne objawy, co wiąże się z dużymi stratami ekonomicznymi (Dold i Holland, 2010).

1.2.4.6. Epidemiologia

Askarioza jest jedną z najczęstszych inwazji stwierdzanych u ludzi i świń na całym świecie (Dold i Holland, 2010). Częściej występuje w krajach o klimacie tropikalnym i subtropikalnym, co wynika głównie z uwarunkowań ekologicznych (wysoka wilgotność i temperatura), socjo-ekonomicznych i sanitarnych (w krajach ubogich i przeludnionych, gdzie brak urządzeń sanitarnych prowadzi do zanieczyszczenia środowiska kałem). Askarioza jest częsta także w krajach, gdzie do nawożenia upraw stosuje się odchody ludzkie. Znana jest epidemia glistnicy, która wystąpiła w Finlandii - kraju gdzie nie stosuje się odchodów ludzkich do nawożenia upraw; źródłem epidemii było spożywanie porów importowanych z Izraela lub Hiszpanii (Räisänen i wsp., 1985).

Jaja *Ascaris* są niezwykle odporne na działanie czynników środowiska zewnętrznego (z wyjątkiem wysuszenia) i zachowują inwazyjność przez kilkanaście lat (WHO, 1967). Wykazano także, że jaja *A. suum* zachowują żywotność w gnojówce przez 29 tygodni (Johnson i wsp., 1998). Natomiast, doświadczalnie stwierdzono, że 0.1-4.5% jaj *A. suum* zachowuje żywotność

w glebie przez 17 miesięcy (Mizgajska, 1993). Jaja *Ascaris* są także wysoce odporne na działanie środków chemicznych, np. przeżywają w 50% roztworze kwasu solnego, azotowego i siarkowego (Roberts i Janovy, 1996).

1.3. Źródła i drogi biologicznego zanieczyszczenia żywności

Biologiczne zanieczyszczenie środowiska ma istotny wpływ na występowanie stadiów dyspersyjnych pasożytów na powierzchni produktów spożywczych. Ludzie i zwierzęta wydają olbrzymie ilości odchodów, które zanieczyszczają środowisko, w tym ekosystemy wodne. Według wyliczeń, do środowiska trafia rocznie około 232 milionów ton ludzkich odchodów (Fayer i wsp., 2004). Równie istotną rolę w zanieczyszczeniu biologicznym ma hodowla zwierząt. Szacuje się, że pogłowie zwierząt hodowlanych jest ponad trzykrotnie większe, niż liczba ludności zamieszkująca Ziemię i zwierzęta te wydalają ponad 4,5 mld ton odchodów rocznie (Fayer i wsp., 2004). Także zwierzęta dzikie, w tym ptaki, które mogą przenosić patogeny na duże odległości, mają istotny wpływ na zanieczyszczanie środowiska odchodami (Graczyk i wsp., 2008).

Giardioza i kryptosporidioza często występuje u zwierząt na całym świecie, w tym również w Polsce (m.in.: Majewska i wsp., 1998, Majewska i wsp., 1999, Majewska i wsp., 2000; Smith i wsp., 2007; Bajer, 2008). Zwierzęta są też rezerwuarem inwazyjnych dla człowieka mikrosporydiów (rozdział 1.4.1.2.). Natomiast *Ascaris lumbricoides* jest najczęściej występującym helmintem jelitowym u ludzi; szacuje się, że ponad 1.3 mld osób na świecie jest zarażonych (Bethony i wsp. 2006, Dold i Holland, 2011). Także *A. suum* jest szeroko rozprzestrzenionym i częstym pasożytem świń (Dold i Holland, 2011). Mając na uwadze fakt, że stadia dyspersyjne większości stwierdzanych na żywności pasożytów wydalane są przez zarażonych żywicieli w bardzo dużej liczbie, istnieje wiele możliwości w jaki mogą one zanieczyszczać żywność. Żywność pochodzenia roślinnego może zostać zanieczyszczona stadiami dyspersyjnymi pasożytów począwszy od

poła uprawnego, szklarni lub sadu aż do „naszego stołu”. Może do tego dojść na drodze bezpośredniej – od zarażonych osób lub zwierząt, mających kontakt z żywnością, bądź na drodze pośredniej – wtedy źródłem zanieczyszczenia może być woda używana do podlewania upraw lub mycia spożywanych roślin, zanieczyszczona gleba, a także źle kompostowane odchody używane do nawożenia (Ortega i wsp., 1997; Amahmid i wsp., 1999; Robertson i Gjerde, 2001a, b). Istnieje również możliwość zanieczyszczenia produktów roślinnych przez organizmy, które są wektorami przenoszącymi stadia dyspersyjne pasożytów (Smith i wsp., 1993; Graczyk i wsp., 1996). Istotnym czynnikiem wpływającym na zanieczyszczenie żywności jest niewystarczająca higiena osobista osób zajmujących się jej przetwarzaniem lub sprzedażą. Również bezobjawowe zarażenie w dużym stopniu sprzyja szerzeniu pasożytów i pojawianiu się epidemii żywnościopochodnych. (Slifko i wsp., 2000).

Istnieje także wiele innych potencjalnych dróg zanieczyszczenia żywności pochodzenia roślinnego stadiami dyspersyjnymi pasożytów, z których najistotniejsze to:

- używanie do nawożenia upraw zanieczyszczonego stadiami dyspersyjnymi pasożytów, źle skompostowanego obornika,
- wypasanie zwierząt w pobliżu upraw,
- bezpośrednie zanieczyszczanie żywności kałem zarażonych zwierząt,
- aeorozole powstałe z gnojowicy, błota i ścieków zanieczyszczonych stadiami dyspersyjnymi pasożytów,
- używanie zanieczyszczonej wody do rozpylania pestycydów i insektycydów,
- używanie zanieczyszczonej wody do mycia warzyw i innych produktów roślinnych spożywanych na surowo lub konsumowanych po niewielkim przetworzeniu.

Zmieniające się nawyki żywieniowe konsumentów – w tym zwiększone spożycie surowych warzyw i nie dogotowywanie żywności w celu zachowania naturalnych walorów smakowych oraz zachowania nietrwałych składników odżywczych – zwiększa ryzyko zarażenia pasożytami. Jednocześnie rosnąca świadomość zanieczyszczenia środowiska stadiami dyspersyjnymi pasożytów i ich wpływu na zdrowie powoduje, że niezbędnym wydaje się opracowanie lepszych metod ich wykrywania (Slifko i wsp., 2000).

1.4. Metody wykrywania stadiów dyspersyjnych pasożytów w i na żywności pochodzenia roślinnego

Istnieje stale wzrastające zapotrzebowanie ze strony producentów żywności i osób odpowiedzialnych za ochronę zdrowia publicznego na opracowanie szybkich metod wykrywania i identyfikacji patogenów w żywności, które zapewnią konsumentom bezpieczną żywność i nie zagrażającą zdrowiu i życiu (Foley i Grant, 2007). Jednakże o ile dokonano postępu w metodyce wykrywania mikrobiologicznych zanieczyszczeń żywności, to nadal metody wykorzystywane do wykrywania stadiów dyspersyjnych pasożytów w produktach pochodzenia roślinnego opierają się głównie na metodach stosowanych w ich wykrywaniu w wodzie i kale. Obecnie stosowane metody obejmują trzy etapy: pobieranie próbek, odseparowanie stadiów dyspersyjnych od badanych produktów roślinnych i ich zagęszczanie oraz wykrywanie i identyfikację.

Badanie odpowiedniej wielkości prób żywności pochodzenia roślinnego wiąże się z prawidłowym oszacowaniem ryzyka zarażenia (Smith i Nichols, 2009). Z opublikowanych prac wynika, że do badań wykorzystywano różne wielkości prób produktów roślinnych od 20 gramów do 2.5 kg (Szelażewicz i Tarczyński, 1996; Kasprzak i wsp., 1981; Amahmid i wsp., 1999; Gharavi i wsp., 2002; Kozan i wsp., 2005; Amoah i wsp., 2006; Daryani i wsp.,

2008; Rai i wsp., 2008; Avicioglu i wsp., 2010; Rzeżutka i wsp. 2010; Al-Megrin i wsp., 2010; Fallah i wsp., 2012).

Zazwyczaj stadia dyspersyjne pasożytów występują w niewielkiej liczbie w lub na żywności. To też techniki *in vitro*, stosowane w celu namnożenia bakterii dla ich łatwiejszej identyfikacji, nie są możliwe do wykorzystania w przypadku pasożytów. Zatem konieczne jest zastosowanie metod umożliwiających separację stadiów dyspersyjnych pasożytów od badanych produktów żywnościowych i ich zagęszczenie. Jednak separacja spor, oocyst, cyst, jaj i larw pasożytów z produktów roślinnych stanowi duże wyzwanie, jeśli weźmie się pod uwagę dużą różnorodność produktów roślinnych (sałaty, kiełki, warzywa, zioła, owoce i soki) oraz ich budowę lub porowatość. W wielu pracach badane produkty żywnościowe myto w bieżącej wodzie lub w naczyniu z wodą (Szelągiewicz i Tarczyński, 1969, Kasprzak i wsp., 1981; Ghavari i wsp., 2002; Andoh i wsp. 2009; Sia Su i wsp., 2012), lub w roztworze soli fizjologicznej (Amahmid i wsp., 1999; Erdoğan i Sener 2005; Amoah i wsp., 2006; Daryani i wsp., 2008; Abougrain i wsp., 2009; Gupta i wsp., 2009; Al-Megrin i wsp., 2010; Fallah i wsp., 2012). W celu zwiększenia skuteczności wmywania stadiów dyspersyjnych, niektórzy badacze stosowali detergenty (m.in. Tween 80, glicyna), które obniżając napięcie powierzchniowe, zapobiegają przyczepianiu się stadiów dyspersyjnych pasożytów do powierzchni żywności lub innych cząstek (Kozan i wsp., 2005; Jedrzejewski i wsp., 2007; Rai i wsp., 2008; Rzeżutka i wsp., 2010). W tym samym celu stosowano także sonikację (Kozan i wsp., 2005). Uwagę zwraca również zróżnicowany czas płukania i/lub wytrząsania badanych prób produktów roślinnych – w wielu publikacjach albo brak takiej informacji, albo czas ten wahał się od kilku minut do 24 godzin. Tak różnorodne postępowanie ma znaczący wpływ na uzyskane wyniki.

W badaniach nad wykrywaniem stadiów dyspersyjnych pasożytów w żywności stosowano także różne techniki oczyszczające i zagęszczające, takie jak: filtrowanie przez gazę

(Rai i wsp., 2008), bibułę (Szelańgiewicz i Tarczyński, 1969) lub filtry o różnej średnicy por (Ghavari i wsp., 2002) oraz różne techniki sedymentacyjne - dekantacja, metoda Fausta lub Rivasa oraz wirowanie (m. in.: Szelańgiewicz i Tarczyński, 1969; Kasprzak i wsp., 1981; Amahmid i wsp., 1999; Erdoğan i Sener 2005; Kazan i wsp.; 2005; Abougrain i wsp., 2009; Sia Su i wsp., 2012) i flotacyjne (Avcioglu i wsp., 2010). Filtrowanie przez gazę lub bibułę umożliwia odseparowanie większych cząstek roślinnych, natomiast stosowanie filtrów przyczynia się do gromadzenia się dużych ilości cząstek, co powoduje ich zapychanie, a także trudności w wykrywaniu i identyfikacji pasożytów. W badaniach tych stosowano także różny czas sedymentacji oraz czas i prędkość wirowania, co również wpływa na uzyskane wyniki.

Ze względu na fakt, że z reguły stadia dyspersyjne pasożytów występują w niewielkiej liczbie na żywności pochodzenia roślinnego, stosowano także metodę immunomagnetycznej separacji (IMS), pozwalającej odzyskać z osadu stadia dyspersyjne tylko niektórych pasożytów, ponieważ magnetyczne kuleczki opłaszczone są przeciwciałami, które reagują z epitopami ściany stadiów dyspersyjnych określonych gatunków pasożytów. Metodę immunomagnetycznej separacji zastosowano do wykrywania oocyst *Cryptosporidium* tylko w jednej pracy (Rzeżutka i wsp., 2010).

Metody wykrywania i identyfikacji gatunków pasożytów w osadzie uzyskanym po płukaniu produktów roślinnych przedstawiono w poszczególnych podrozdziałach tej pracy (1.2.1.4.; 1.3.1.4.; 1.4.1.4.; 1.5.1.4).

Z powyżej przedstawionego przeglądu metod stosowanych do wykrywania i identyfikacji stadiów dyspersyjnych pasożytów w żywności pochodzenia roślinnego wynika, że brak jest standardowych metod służących do izolowania, zagęszczania i identyfikacji pasożytów znajdujących się na powierzchni żywności. Ich opracowanie stanowi potężne wyzwanie, ze względu na różnorodność produktów roślinnych, jak i samych pasożytów, które potencjalnie mogą występować na żywności.

2. CEL PRACY

Głównym celem pracy była identyfikacja pasożytów oraz określenie częstości ich występowania w próbach żywności pochodzenia roślinnego i nasionach przeznaczonych do hydroponicznej uprawy kiełków.

Ponadto, dodatkowymi celami było określenie:

- ◆ różnic w zanieczyszczeniu stadiami dyspersyjnymi pasożytów poszczególnych kategorii żywności pochodzenia roślinnego;
- ◆ różnic w częstości występowania stadiów dyspersyjnych poszczególnych pasożytów w badanych kategoriach żywności;
- ◆ korelacji między częstością występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów na żywności pochodzenia roślinnego a miejscem jej zakupu;
- ◆ różnic między częstością występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów na żywności wyprodukowanej przez polskich producentów i pochodzącej z importu.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Próby żywności

Materiał badań stanowiło 300 prób świeżej żywności pochodzenia roślinnego oraz 30 prób nasion przeznaczonych do uprawy hydroponicznej kiełków.

3.2. Kategorie prób żywności

Zakupione próby żywności świeżej podzielono na sześć odrębnych kategorii (Tabela 7).

Tabela 7. Kategorie prób żywności.

Kategoria	Liczba badanych prób
Sałaty	56
Warzywa	53
Kiełki	56
Zioła	83
Sałatki warzywne	12
Owoce	40
Ogółem	300

3.2.1. Sałaty

Ogółem do badań wykorzystano 56 prób sałat, w tym 14 sałat masłowych, po dziewięć sałat lodowych i dekoracyjnych oraz po osiem opakowań insalatiny, rukoli (*Eruca vesicaria*) i roszponki (*Varelianelle locusta*).

3.2.2. Warzywa

Ogółem badaniami objęto 53 próby warzyw – 12 pęczków natki pietruszki, po osiem pęczków rzodkiewek i cebuli dymki oraz porów, selerów, brokułów i jeden pęczek liści buraka.

3.2.3. Kiełki

Ogółem zakupiono 56 opakowań kiełków. W badaniach wykorzystano po osiem opakowań kiełków fasoli mung (*Vigna radiata*), pszenicy, lucerny, rzodkiewki, słonecznika, brokułów oraz mieszanki kiełków.

3.2.4. Ziola

Łącznie w badaniach wykorzystano 83 próby ziół. Większość ziół - mięta (10), bazylija (9), melisa (8), majeranek (8), rozmaryn (8), tymianek (8), kolendra (8), szalwia (8) i oregano (7) - pochodziła z uprawy doniczkowej. Ponadto, w badaniach wykorzystano dziewięć pęczków koperku.

3.2.5. Sałatki warzywne

Ogółem zakupiono 12 opakowań gotowych sałatek warzywnych. Cztery próby mieszanki „Kalifornia mix” w skład, której wchodziły: sałata lodowa, radicchio (cykoria sałatowa) i marchew. Cztery próby „Sałata mix” zawierającej: rukolę, szpinak, sałatę odmiany Batawia oraz roszkę, dwie próby „Fitness mix” zawierającej w swoim składzie: sałatę lodową, cykorię sałatową - radicchio, cykorię odmiany frisee oraz marchew. Dodatkowo zakupiono jedną sałatkę o nazwie „Bolero mix” wyprodukowaną z: cykorii odmiany endivia i frisee, buraka czerwonego oraz jedną mieszankę „mini Lololita” skomponowaną z następujących składników: cztery rodzaje sałat, kielki, pomidory i ser mozzarella.

3.2.6. Owoce

Ogółem w badaniach wykorzystano 40 prób owoców takich jak: truskawka (20), malina (12), borówka czarna (6) i winogrono (2). Maliny i borówki kupowano w pojemnikach, a truskawki i winogrona na wagę.

3.2.7. Nasiona wykorzystywane do hydroponicznej uprawy kiełków

W badaniach wykorzystano 30 prób nasion używanych do produkcji kiełków w warunkach domowych. Zakupiono 16 opakowań nasion lucerny, osiem fasoli mung i sześć pszenicy.

3.3. Miejsce zakupu żywności

Żywność pochodzenia roślinnego zakupiono na terenie miasta Poznania; większość kupiono w dużych marketach (183), a pozostałe w małych sklepach warzywniczych (72) i na miejskich targowiskach (45). Wszystkie nasiona zakupiono w sklepie ze zdrową żywnością.

3.3.1. Żywność zakupiona w dużych marketach

W sześciu dużych marketach, znajdujących się na terenie Poznania, zakupiono ogółem 183 próby żywności (Tabela 8). W markecie I zakupiono 33, w markecie II - 4, w markecie III - 24, w IV markecie - 26, w markecie V - 79 i w markecie VI - 17 prób żywności.

Tabela 8. Próby żywności zakupione w dużych marketach.

Kategoria żywności	Liczba prób żywności zakupionych w marketach					
	Market I	Market II	Market III	Market IV	Market V	Market VI
Sałaty						
Sałata masłowa			1		1	
Sałata lodowa			2			
Sałata dekoracyjna					4 ¹⁽¹⁾	
Insalatina	8 ¹⁽⁸⁾					
Rukola	7 ¹⁽⁷⁾				1	
Roszponka	5 ^{3(4),6(1)}		3			
Warzywa						
Natka pietruszki	1 ²⁽¹⁾		1	1	1 ²⁽¹⁾	
Rzodkiewka					1	
Cebula dymka	2 ²⁽²⁾				1	
Seler	5 ¹⁽⁵⁾		1			
Brokuł			4 ⁴⁽²⁾			

Liście buraka					1 ¹⁽¹⁾	
Kiełki						
Kiełki lucerny		1			7	
Kiełki słonecznika					7	1
Kiełki fasoli mung					4	1
Kiełki brokuła						2
Kiełki rzodkiewki					5	
Kiełki pszenicy					8	
Mieszanka kiełków					8	
Zioła						
Bazylia		1			3 ²⁽¹⁾	3
Majeranek			1	4	3	
Szałwia			1	4	2	1
Melisa			2	4	2	
Koperek			1	1	2	
Tymianek			2	2	2	2
Oregano		2			2	3
Rozmaryn			2	5	1	
Kolendra	1 ²⁽¹⁾		1	1	3	2
Mięta	1		2	4	1	2
Salatki warzywne						
Bolero mix					1	
Lololita					1	
Fitness mix					2	
Kalifornia mix	1				3	
Salata mix	2 ¹⁽²⁾					
Owoce						
Maliny					1	
Truskawki					1 ⁶⁽¹⁾	
Ogółem	33	4	24	26	79	17

Objaśnienia: ¹ wyprodukowane we Włoszech, ² wyprodukowane w Holandii, ³ wyprodukowane w Niemczech, ⁴ wyprodukowane we Hiszpanii, ⁵ wyprodukowane we Francji, ⁶ wyprodukowane w Izraelu. W nawiasie podano liczbę prób.

3.3.2. Żywność zakupiona w sklepach warzywniczych

W pięciu poznańskich sklepach warzywniczych zakupiono ogółem 72 próby żywności pochodzenia roślinnego (Tabela 9); w pierwszym zakupiono 50, w II - 14, w III - 5, w IV- 2 i w sklepie V 1 próbę żywności.

Tabela 9. Próby żywności zakupione w sklepach warzywniczych.

Kategoria żywności	Liczba prób żywności zakupionych w sklepach				
	Sklep I	Sklep II	Sklep III	Sklep IV	Sklep V
Sałaty					
Sałata masłowa	10	2			
Sałata lodowa	2 ²⁽¹⁾				
Sałata dekoracyjna		3			
Warzywa					
Por	1		2		
Natka pietruszki	5				
Brokuły	2				
Cebula dymka	2				
Zioła					
Koperek	3				
Kiełki					
Kiełki fasoli	3				
Kiełki rzodkiewki	3				
Kiełki brokuł	6				
Sałatki warzywne					
Sałata mix		1 ¹⁽¹⁾			
Owoce					
Truskawki	7	6	3	1	1
Borówka czarna	1	2		1	
Maliny	3				
Winogrona	2				
Ogółem	50	14	5	2	1

Objaśnienia: ¹wyprodukowane we Włoszech, ²wyprodukowane w Holandii; w nawiasie podano liczbę prób.

3.3.3. Żywność zakupiona na miejskich targowiskach

Na dwóch miejskich targowiskach zakupiono ogółem 45 próby żywności pochodzenia roślinnego (Tabela 10); na jednym targowisku kupiono 30, a na drugim 15 prób żywności.

Tabela 10. Próby żywności zakupione na miejskich targowiskach

Kategoria żywności	Liczba prób żywności zakupionych na targowiskach	
	Targowisko I	Targowisko II
Sałaty		
Sałata lodowa	3	2
Sałata dekoracyjna	2	
Warzywa		
Por	5	
Rzodkiewka	3	4
Brokuły		2
Seler	2	
Natka pietruszki	3	
Cebula dymka		3
Zioła		
Bazylia	2	
Koperek	2	
Owoce		
Borówka czarna	2	
Maliny	4	4
Truskawki	1	
Sałatki warzywne		
Sałata mix	1 ¹⁽¹⁾	
Ogółem	30	15

Objaśnienia: ¹ wyprodukowane we Włoszech; w nawiasie podano liczbę prób.

3.4. Pochodzenie żywności

Zdecydowana większość prób świeżej żywności pochodzenia roślinnego (259) została wyprodukowana przez polskich producentów. Natomiast 41 prób pochodziło z importu, w tym 26 z Włoch, siedem z Holandii, cztery z Niemiec, dwie z Hiszpanii oraz po jednej próbie z Francji i Izraela (Tabele 8, 9, 10).

3.5. Metody

3.5.1. Przygotowanie prób do badań

Z każdej zakupionej żywności pochodzenia roślinnego odważano 100 g. Następnie próbę dokładnie rozdrabniano i przenoszono do dwulitrowych szklanych zlewek i wlewano 1 litr jałowego, 0.95 % roztworu soli fizjologicznej (pH 7.4) i 50 ml 0.01% roztworu TWEEN 80 (firmy Sigma). Całość intensywnie mieszano szklaną bagietką przez 30 minut w celu wypłukania zanieczyszczeń. Powstałą zawiesinę przesączano przez jedną warstwę gazy w celu oczyszczenia zawiesiny z fragmentów badanej żywności.

3.5.2. Uzyskiwanie osadu

Uzyskany przesącz umieszczano w szklanych okrągłodennych probówkach wirówkowych i wirowano w temperaturze 4°C przez 30 minut przy 2000 g. Następnie usuwano supernatant, a osad przenoszono do stożkowych probówek wirówkowych. Resztę osadu przepłukiwano jałowym roztworem soli fizjologicznej z TWEEN 80 i dolewano do probówek stożkowych. Następnie próby ponownie wirowano przez 30 minut przy 2000 g. Uzyskany osad badano stosując metody mikroskopowe, immunologiczne i molekularne.

3.5.3. Metody mikroskopowe

W celu wykrycia stadiów dyspersyjnych pasożytów, z każdej próby uzyskanego osadu wykonywano dwa preparaty świeże i cztery rozmazy na szkiełku podstawowym w celu wykonania preparatów trwałych.

3.5.3.1. Preparaty świeże

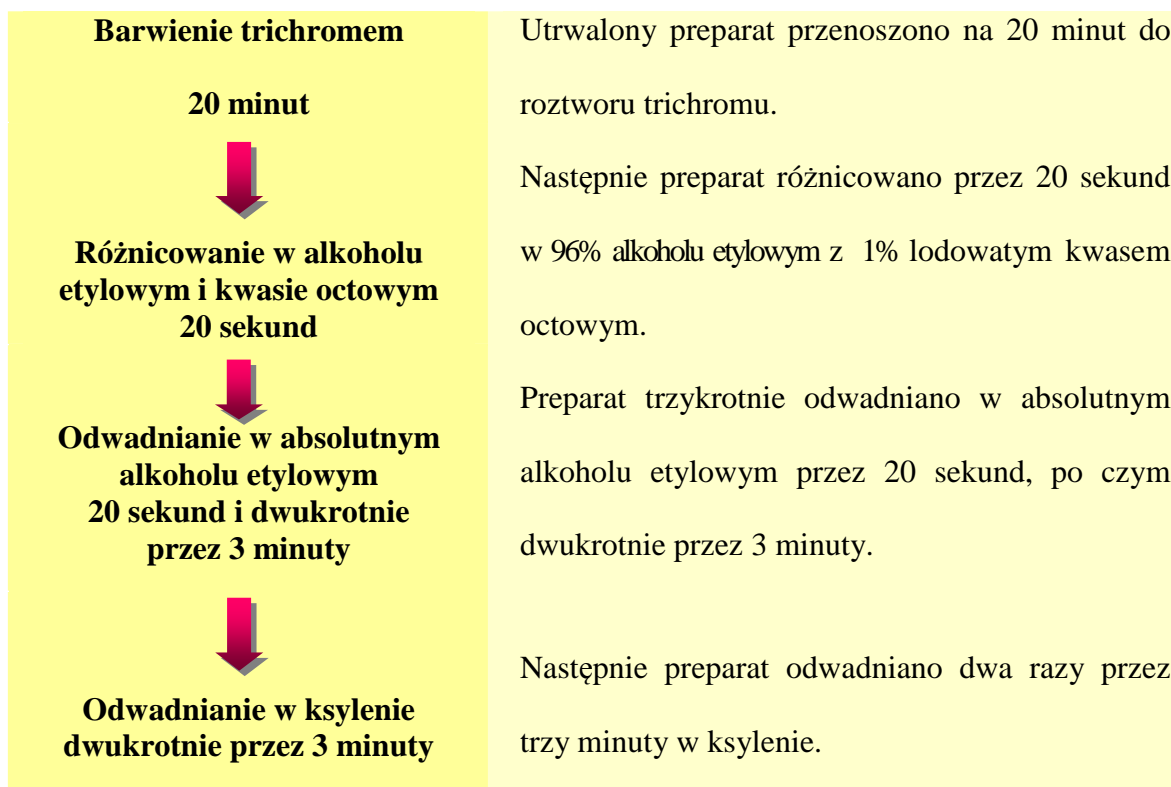
Jeden preparat świeży wykonywano zawieszając części uzyskanego osadu w kropli 0,6% roztworu soli fizjologicznej, natomiast drugi preparat wykonywano podobnie, ale w celu dodatkowego wybarwienia struktur komórkowych, podbarwiano płynem Lugola (roztwór jodu w jodku potasu). Preparaty przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i przeglądano w mikroskopie

światlnym (Axioskop, Zeiss) wpierv pod mniejszym powiększeniem (200x), a następnie stosując obiektyw immersyjny (1000x powiększenie).

3.5.3.2. Preparaty trwałe

3.5.3.2.1. Barwienie trichromem

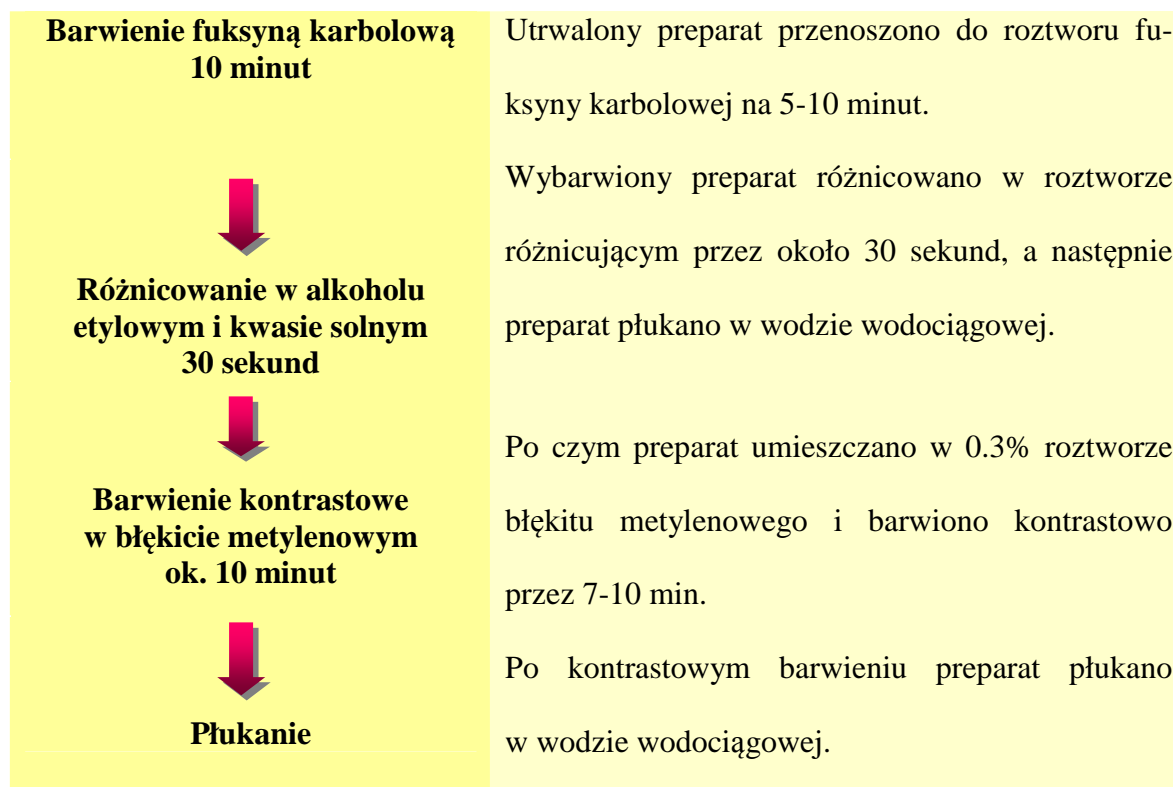
Przed barwieniem, lekko podsuszony, cienki rozmaz osadu utrwalano przez 30 minut w płynie Schaudinna (200 ml nasyconego roztworu chlorku rtęci, 100 ml 95% alkoholu etylowego i 3 ml lodowatego kwasu octowego). Następnie preparat odwadniano po 3 minuty w 50% i 70% alkoholu etylowym i przekładano do 70% alkoholu etylowego z dodatkiem jodu na 15 minut. Po tym czasie preparat dwukrotnie płukano po 15 minut w 70% alkoholu etylowym i barwiono trichromem według poniższego schematu (Garcia, 2001). W skład barwnika wchodziło: 0,6 g Chromotropu R (Sigma[®]), 0,3 g LightGreen SF (Sigma[®]), 0,7 g kwasu fosfo-wolframowego (Sigma[®]), 1ml lodowatego kwasu octowego oraz 100 ml wody destylowanej.



Wybarwiony preparat zatapiano w sztucznym balsamie kanadyjskim (Histofluid, Niemcy) i przeglądano w mikroskopie świetlnym (Axioskop, Zeiss) stosując obiektyw immersyjny (1000x powiększenie).

3.5.3.2.2. Barwienie zmodyfikowaną metodą Ziehl-Neelsena

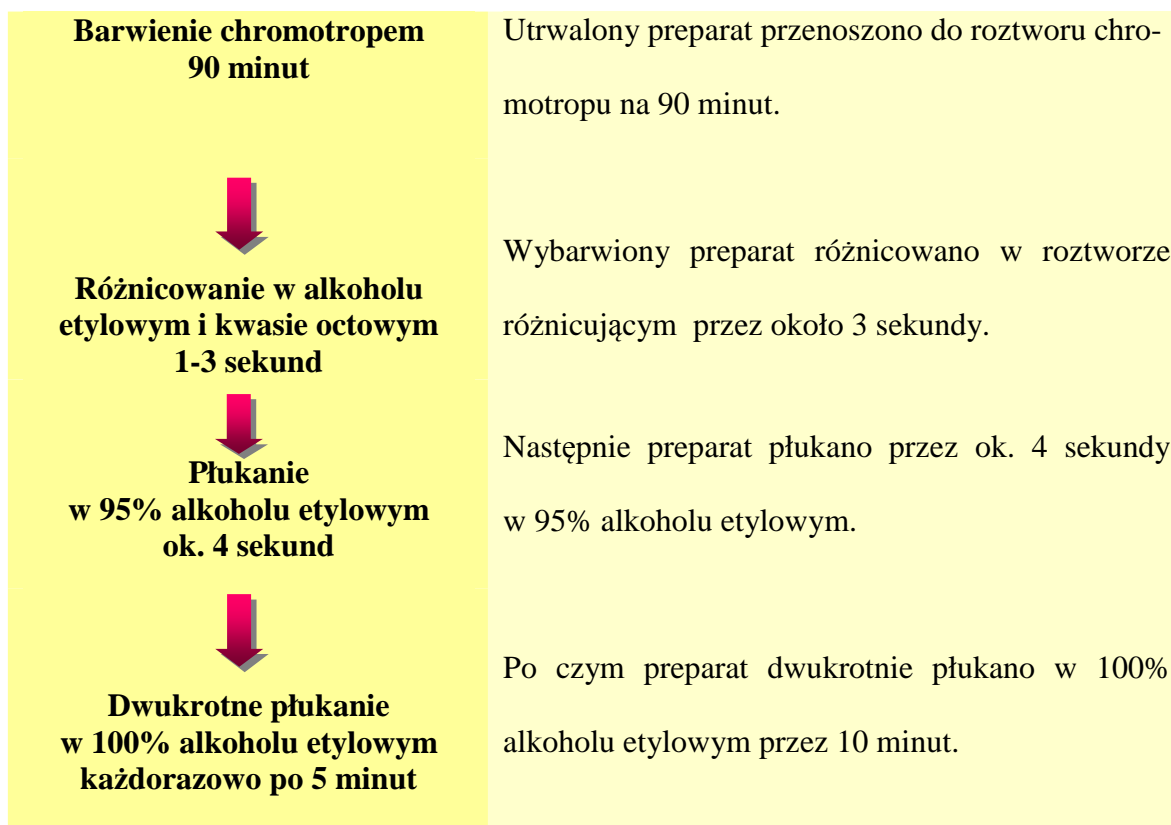
W celu stwierdzenia obecności oocyst *Cryptosporidium* i *Cyclospora* rozmazy osadu barwiono zmodyfikowaną metodą Ziehl-Neelsena według poniższego schematu (Anonim, 1991). Wysuszone preparaty osadu utrwalano w metanolu przez 2-3 minuty, a następnie barwiono wykorzystując roztwór fuksyny karbolowej (mieszanka roztworu A i B; roztwór A: 5 g fuksyny karbolowej w 50 ml absolutnego alkoholu etylowego; roztwór B: 25 g fenolu w 500 ml wody destylowanej), roztwór różnicujący (100 ml 95% alkoholu etylowego i 1 ml stężonego kwasu solnego) oraz roztwór błękitu metylenowego do barwienia kontrastowego (3 g błękitu metylenowego w 100 ml wody destylowanej).



Tak przygotowany preparat suszono i zatapiano w sztucznym balsamie kanadyjskim (Histofluid, Niemcy). Preparat przeglądano w mikroskopie świetlnym (Axioskop, Zeiss) stosując obiektyw immersyjny (1000x powiększenie). W preparatach barwionych metodą Ziehl-Neelsena oocysty *Cryptosporidium* zabarwiają się na kolor ciemnoczerwony, natomiast oocysty *Cyclospora* charakteryzują się niejednorodną barwliwością - od jasnoróżowego aż po kolor ciemnoczerwony lub też nie wybarwiają się.

3.5.3.2.3. Barwienie chromotropem

W celu stwierdzenia obecności spor mikrosporydiów w badanym materiale, wysuszone rozmazy osadu utrwalano w metanolu przez 5 minut, a następnie barwiono chromotropem według poniższego schematu (Weber i wsp.1992). Roztwór barwnika przygotowano mieszając: 0,15 g fast green (Sigma[®]), 0,7 g kwasu fosforo-wolframowego (Sigma[®]), 6 g chromotro-
pu 2R (Sigma[®]) i 3 ml lodowatego kwasu octowego, a po 30 minutach do mieszaniny dolewano 100 ml wody destylowanej. Natomiast roztwór różnicujący przygotowano dodając 0.5 ml lodowatego kwasu octowego do 99,5 ml 90% alkoholu etylowym.





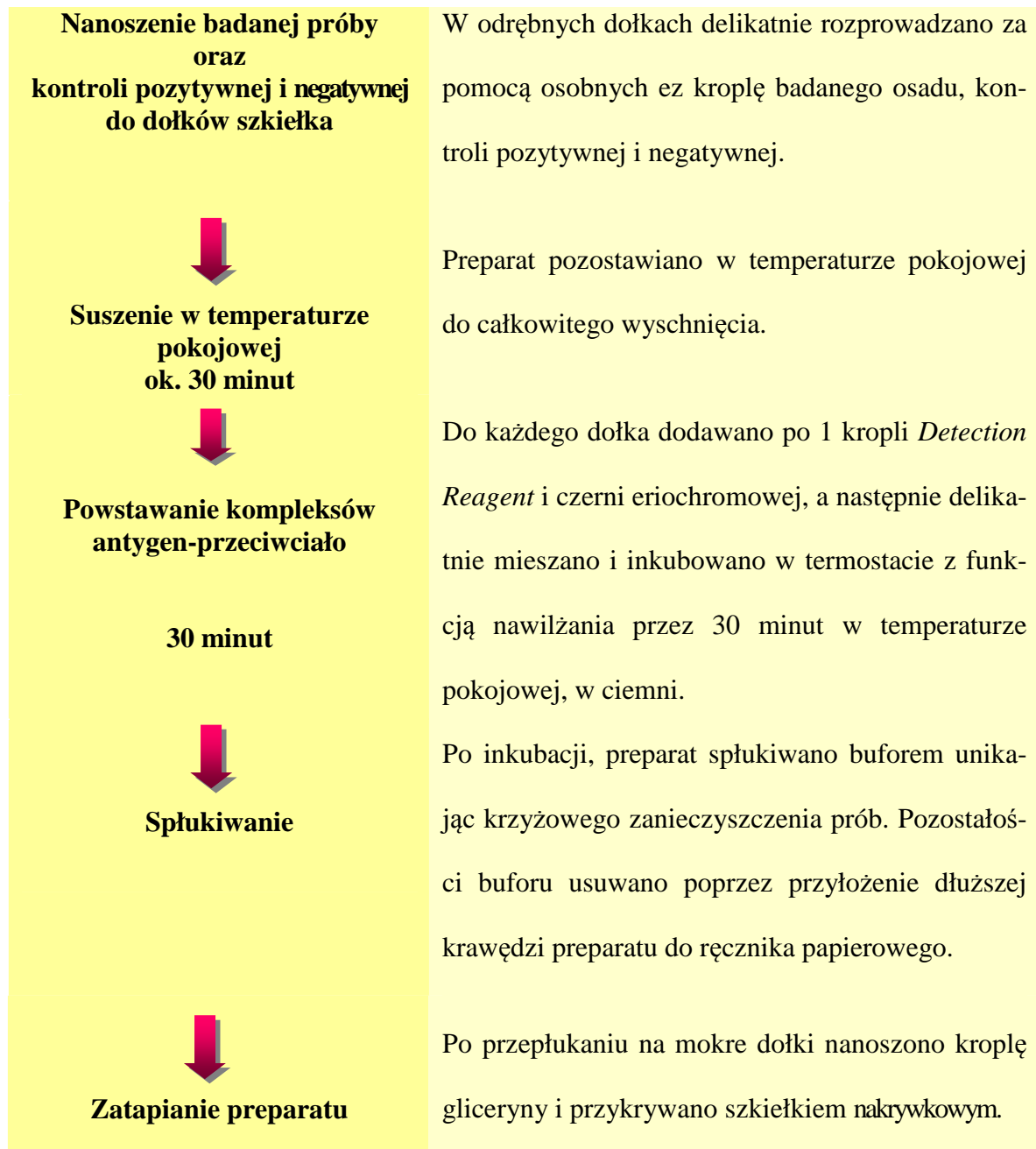
**Dwukrotne odwadnianie
w 100% ksylenie
każdorazowo po 10 minut**

Po przepłukaniu w alkoholu preparat odwadniano dwukrotnie w 100% ksylenie – łącznie przez 20 minut.

Następnie, jeszcze mokry rozmaz osadu zatapiało w sztucznym balsamie kanadyjskim (Histofluid) i pozostawiano w temperaturze pokojowej do wyschnięcia. Preparat przeglądano w mikroskopie świetlnym (Axioskop, Zeiss) stosując obiektyw immersyjny (1000x powiększenie), spory mierzone stosując okular z podziałką mikrometryczną. W preparatach barwionych chromotropem spory mikrosporydiów barwią się na kolor jasnoróżowy i mają pośrodku wyraźne przejaśnienie, co umożliwia ich odróżnienie od bakterii.

3.5.4. Test immunofluorescencji bezpośredniej

W celu potwierdzenia badań mikroskopowych w kierunku obecności oocyst *Cryptosporidium* i/lub cyst *Giardia* oraz określenia ich żywotności stosowano komercyjny test immunofluorescencji bezpośredniej (IFA) MERIFLUOR *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Bioscience Inc., USA). Test wykonywano zgodnie z instrukcją producenta, wykorzystując załączone do zestawu szkiełka do immunofluorescencji, jednorazowe ezy i odczynniki (**Detection Reagent** – znakowane fluoresceiną przeciwciała monoklonalne przeciw *Cryptosporidium* i przeciw *Giardia*, **Counterstain** – roztwór czerni eriochromowej, **20X Wash Buffer** – skoncentrowany bufor, **Mounting Medium** – gliceryna z formaliną i 0.05% azydkiem sodowym), kontrolę pozytywną (utrwalone w formalinie oocysty *Cryptosporidium* i cysty *Giardia* oraz 0.09% tiomersal) i kontrolę negatywną (formalina i 0.09% tiomersal). Przed wykonaniem testu zestaw trzymano w temperaturze pokojowej przez ok. 30 minut i przygotowywano odpowiednią objętość buforu płuczącego (2.5 ml *20X Wash Buffer* wlewano do 47.5 ml dejonizowanej wody).



Preparat przeglądano stosując 500x powiększenie w mikroskopie fluorescencyjnym, wyposażonym w filtr przepuszczający falę o długości 490-500 nm. W kontroli pozytywnej i próbach dodatnich ściana oocyst *Cryptosporidium* i cyst *Giardia* świeciła na jasnozielony kolor.

3.5.5. Metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH i multiplex FISH)

Próby, w których mikroskopowo wykryto spory mikrosporydiów badano wykorzystując technikę FISH w celu potwierdzenia obecności spor oraz identyfikacji gatunków. Większość prób była ponownie badana w USA (Department of Molecular Microbiology and Immunology,

Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD) przy zastosowaniu techniki multiplex FISH.

3.5.5.1. Oligonukleotydy wykorzystane w reakcji FISH i multiplex FISH

W technice FISH wykorzystano znakowane fluorochromem oligonukleotydy, które hybridują z gatunkowo swoistymi fragmentami 16S rRNA mikrosporydiów.

Oligonukleotydy, niezbędne do przeprowadzenia reakcji FISH, zsyntetyzowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, a do multiplex FISH w DNA Analysis Facility, Johns Hopkins University, Baltimore, USA. Zarówno w technice FISH, jak i multiplex FISH wykorzystano te same oligonukleotydy o stężeniu 1 mmol l^{-1} , jednak w technice FISH oligonukleotydy znakowano tylko jednym fluorochromem (6-FAM), podczas gdy te, wykorzystywane w technice multiplex FISH były znakowane różnymi fluorochromami (Tabela 11).

Tabela 11. Oligonukleotydy wykorzystane w technice multiplex FISH

(wg Słodkiewicz-Kowalska, 2008)

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja oligonukleotydu	Fluorochrom użyty do znakowania
BIEN-1	5'-AUCAACGAAUGACUUGA-3'	JOE
CUN-1	5'-ACTCACAGGCATCCTTCAG-3'	TET
HEL878F	5'-ACTCTCACACTCACTTCAG-3'	6-FAM
INT-1	5'-GTTCTCCTGCCCGTTTCAG-3'	HEX

3.5.5.2. Przygotowanie próby osadu do techniki FISH i multiplex FISH

Badany osad przenoszono do 1,5 ml probówki typu Eppendorf i wlewano 100 μl PBS, a następnie wirowano w wirówce MIKRO 22R (Hettich, Niemcy) przy 10 000 g przez 10 minut. Następnie usuwano z probówki supernatant i do osadu wlewano 100 μl acetonu w celu permabilizacji ścian spor (Graczyk i wsp., 2002). Próbę trzymano w temperaturze pokojowej, a po upływie około 15 minut ponownie ją wirowano stosując te same parametry. Następnie zlewano supernatant i otwartą probówkę pozostawiano do czasu całkowitego

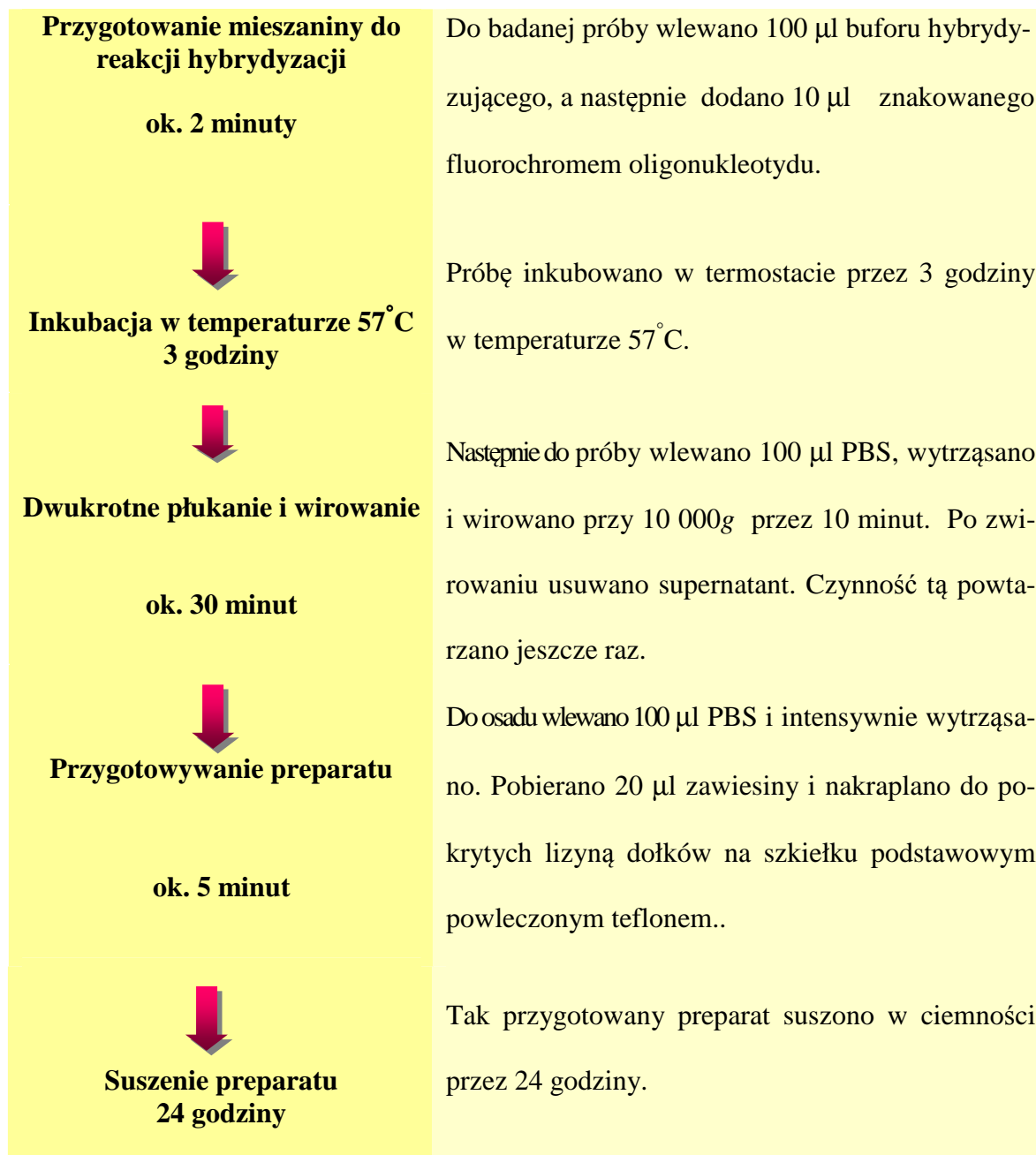
odparowania acetonu (ok. 10 minut). Po tym czasie do próbki wlewano 100 µl 95% alkoholu etylowego, zamkniętą próbkę wytrząsano i ponownie wirowano przy tych samych parametrach. Po zlaniu supernatantu do próbki wlewano 100 µl 75% alkoholu etylowego i po wytrząśnięciu próbkę ponownie wirowano stosując te same parametry. Tak samo postępowano po dodaniu 100 µl jałowego PBS. Uzyskany osad wykorzystywano do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*.

Kontrolę ujemną stanowiło 50 µl dejonizowanej wody destylowanej. Natomiast jako kontrolę dodatnią wykorzystano zawiesiny oczyszczonych spor czterech gatunków mikrosporydiów - *E. hellem*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* i *E. bienewsi* – (Waterborne Inc., USA). W celu przygotowania kontroli dodatniej do techniki FISH, wlewano do osobnych, 1.5 ml próbek po 10 µl zawiesiny spor każdego gatunku mikrosporydium i dalej postępowano w taki sam sposób jak opisano wyżej. W podobny sposób przygotowywano kontrolę pozytywną do multiplex FISH, z tym, że zawiesiny spor czterech gatunków mikrosporydiów mieszano w jednej próbce.

3.5.5.3. Wykonanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

Technikę FISH przeprowadzono według wcześniej opisanej procedury (Graczyk i wsp., 2002; Hester i wsp., 2000, Słodkiewicz-Kowalska i wsp., 2006). Ze względu na fakt, że w technice FISH stosowano oligonukleotydy znakowane tym samym fluorochromem, w celu identyfikacji gatunków mikrosporydiów konieczne było przeprowadzenie czterech reakcji hybrydyzacji - osobno dla każdego gatunku mikrosporydium. Każdą reakcję przeprowadzano w oddzielnej próbce z użyciem gatunkowo specyficznego oligonukleotydu znakowanego fluorochromem 6-FAM, podczas gdy w technice multiplex FISH wykonywano jedną reakcję hybrydyzacji z użyciem mieszaniny czterech gatunkowo swoistych oligonukleotydów znakowanych różnymi fluorochromami.

Reakcja hybrydyzacji wymagała użycia specjalnie przygotowanego buforu hybrydującego, o następującym składzie: 0,05% SDS (dodecylosiarczan sodu), 0,9 M NaCl i 0,05% HCl. Schemat wykonania techniki FISH przedstawiono na poniższym schemacie.



3.5.5.4. Identyfikacja gatunku mikrosporydium

Po upływie doby preparaty przeglądano stosując obiektyw immersyjny (1000 x powiększenie) w mikroskopie (Axioskop, Zeiss) wyposażonym w przystawkę epifluorescencyjną

i filtr przepuszczający światło o długości 390-420 nm. Do przeglądania preparatów wykonanych techniką multiplex FISH zastosowano mikroskop (Olympus BH2-RFL) z przystawką epifluorescencyjną, wyposażony w zestaw filtrów przepuszczających światło o długości fal 450-490 nm. Podstawą identyfikacji gatunku mikrosporydium była wielkość spor i charakterystyczny kolor świecenia ściany spor - zależny od fluorochromu wykorzystanego do znakowania oligonukleotydu. W przypadku preparatów wykonanych techniką FISH spory świeciły na kolor zielony, natomiast wskutek zastosowania różnych fluorochromów do znakowania gatunkowo specyficznych oligonukleotydów oraz zestawu filtrów uzyskuje się efekt różnokolorowego świecenia spor umożliwiającą jednoczesną identyfikację czterech gatunków mikrosporydium. Ściany spor *E. intestinalis* świecą na czerwono, *E. bieneusi* na pomarańczowo, *E. hellem* na zielono, natomiast *E. cuniculi* na niebiesko.

3.5.6. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników korzystano z programu StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com. W celu wykazania statystycznie istotnych różnic zastosowano test zgodności chi-kwadrat (χ^2) Pearsona.

4. WYNIKI

4.1. Zanieczyszczenie stadiami dyspersyjnymi pasożytów poszczególnych kategorii żywności pochodzenia roślinnego

Analizując występowanie stadiów dyspersyjnych pasożytów w różnych kategoriach żywności stwierdzono znaczne różnice w ich zanieczyszczeniu. Spory, cysty, oocysty i jaja pasożytów wykrywano najczęściej na kiełkach, sałatach i owocach, a najrzadziej w ziołach sałatkach warzywnych i warzywach (Tabela 12).

Tabela 12. Częstość występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów w badanych kategoriach żywności pochodzenia roślinnego.

Kategoria żywności	L-ba zbadanych/ l-ba pozytywnych prób (%)
Sałaty	56/12 (21.4)
Warzywa	53/4 (7.5)
Kiełki	56/13 (23.2)
Zioła	83/7 (8.4)
Sałatki warzywne	12/1 (8,3)
Owoce	40/8 (20.0)
Ogółem	300/45 (15.0)

Stadia rozwojowe pasożytów stwierdzono w 13 z 56 zbadanych prób kiełków (Tabela 12). Spośród siedmiu rodzajów kiełków, stadiów dyspersyjnych pasożytów nie wykryto jedynie w kiełkach słonecznika. Najczęściej pasożyty wykrywano w mieszankach kiełków – w czterech z ośmiu prób oraz w kiełkach brokuła i lucerny – w trzech

z ośmiu zbadanych prób. Natomiast tylko w jednej z ośmiu zbadanych prób kiełków pszenicy, fasoli mung i rzodkiewki stwierdzono obecność pasożytów. W kiełkach najczęściej identyfikowano oocysty *Cryptosporidium*, które stwierdzono w 12 z 13 pozytywnych prób. W jednej próbie kiełków stwierdzono obecność spor mikrosporydiów. Obecność stadiów dyspersyjnych więcej niż jednego rodzaju pasożyta stwierdzono w 2 próbach kiełków - oprócz oocyst *Cryptosporidium* wykryto także spory mikrosporydium z rodzaju *Enterocytozoon*.

W 12 spośród 56 zbadanych prób sałat stwierdzono obecność stadiów dyspersyjnych pasożytów (Tabela 12). Najczęściej zanieczyszczone były sałaty dekoracyjne (6 z 9) oraz sałaty masłowe (3 z 14). Ponadto, obecność pasożytów stwierdzono w pojedynczych próbach insalaty, roszponki i rukoli. Podobnie, jak w próbach kiełków, najczęściej identyfikowano oocysty *Cryptosporidium*, które stwierdzono w 6 z 12 pozytywnych prób. W czterech próbach stwierdzono obecność cyst *Giardia*. Natomiast spory mikrosporydiów z rodzaju *Enterocytozoon* wykryto w trzech z 12 pozytywnych prób, w tym w jednej próbie zidentyfikowano także oocysty *Cryptosporidium*.

Owoce były kolejną kategorią żywności pochodzenia roślinnego, która była najczęściej zanieczyszczona stadiami dyspersyjnymi pasożytów; obecność pasożytów wykryto w ośmiu z 40 zbadanych prób (Tabela 12). W co czwartej próbie malin oraz w co piątej próbie truskawek stwierdzono obecność pasożytów. Ponadto, obecność pasożytów stwierdzono w jednej z sześciu prób borówki czarnej. Obie próby winogron nie były zanieczyszczone pasożytami. Owoce najczęściej były zanieczyszczone sporami mikrosporydiów, które wykryto w pięciu z ośmiu pozytywnych prób. Natomiast trzy z ośmiu pozytywnych prób owoców były zanieczyszczone cystami *Giardia*, w tym w jednej próbie wykryto również oocysty *Cryptosporidium*.

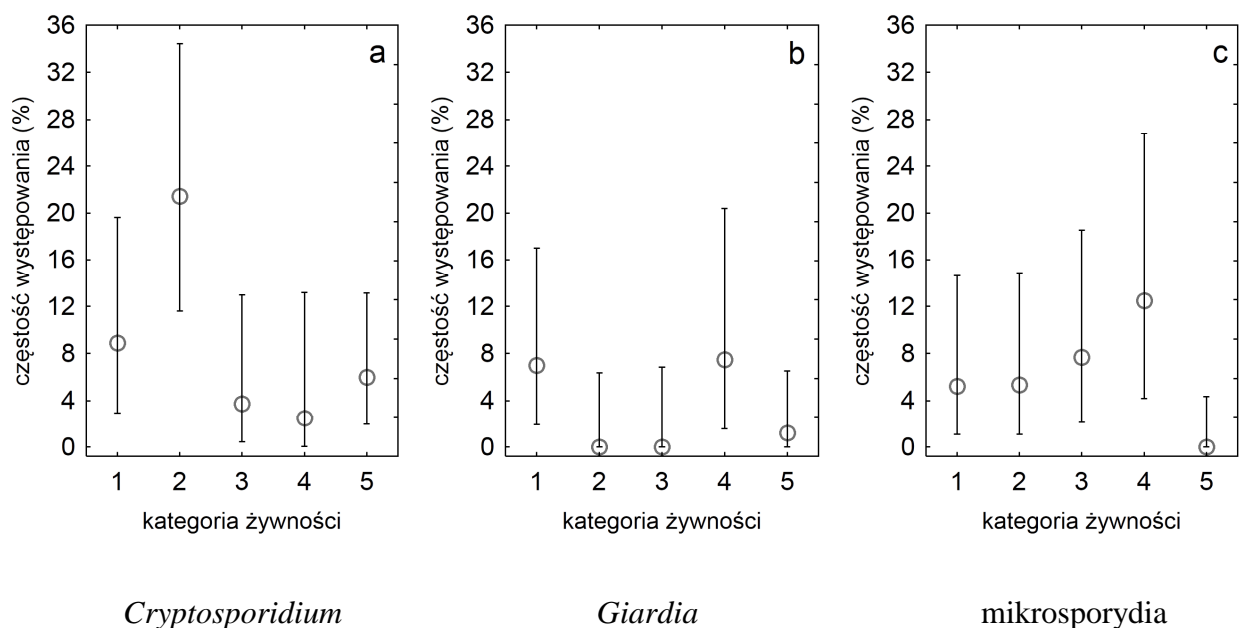
Pasożyty rzadko wykrywano na ziołach. Stadia dyspersyjne były obecne w siedmiu z 83 badanych prób. Pasożyty stwierdzono w pięciu spośród dziesięciu rodzajów ziół. Z reguły pasożyty były obecne na liściach kolendry (dwie z ośmiu prób były pozytywne) i koperku (dwie z dziewięciu prób były pozytywne). Z kolei, w jednej z dziesięciu zbadanych prób mięty, jednej z ośmiu prób rozmarynu i jednej z siedmiu prób oregano stwierdzono obecność stadiów dyspersyjnych pasożytów. W żadnej próbie bazylii (9), melisy (8), majeranku (8), tymianku (8) i szałwii (8) nie stwierdzono obecności stadiów rozwojowych pasożytów. Podobnie, jak w przypadku kiełków i sałat, najczęściej w zbadanych ziołach wykrywano oocysty *Cryptosporidium* – w pięciu z siedmiu pozytywnych prób. Ponadto, w dwóch próbach zidentyfikowano jaja *Ascaris*, w tym w jednej także cysty *Giardia*.

Równie rzadko stwierdzono występowanie pasożytów w próbach sałatek warzywnych. Tylko w jednej z 12 prób zidentyfikowano stadia dyspersyjne pasożytów (Tabela 12). Spośród pięciu rodzajów badanych prób sałatek warzywnych, pasożyty były obecne tylko w jednej z czterech zbadanych prób sałatki Kalifornia mix, w której zidentyfikowano spory mikrosporydiów. W mieszankach Sałata mix, Fitness mix, Bolero mix i Lololita nie stwierdzono obecności pasożytów.

Warzywa były najrzadziej zanieczyszczone stadiami dyspersyjnymi pasożytów. Spośród 53 prób warzyw w czterech próbach wykryto obecność pasożytów (Tabela 12). Przeważnie zanieczyszczone były natki pietruszki – co czwarta próba. Stwierdzono także zanieczyszczenie pasożytami jednej z ośmiu badanych prób pora. Nie wykryto obecności stadiów dyspersyjnych pasożytów w próbach rzodkiewek, cebuli dymki, selera, brokułów i liści buraka. We wszystkich pozytywnych próbach zidentyfikowano obecność spor mikrosporydiów, w tym w jednej próbie również oocysty *Cryptosporidium*.

W celu stwierdzenia, czy istnieją różnice w częstości występowania trzech najczęściej wykrywanych pasożytów w różnych kategoriach żywności pochodzenia roślinnego, uzyskane wyniki zanalizowano przy użyciu testu zgodności chi-kwadrat (Paersona). Do analizy statystycznej wybrano pięć najliczniejszych prób żywności. Ze względu małą liczbę prób analizie statystycznej nie poddano 12 sałatek warzywnych. W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono statystycznie istotne różnice w częstości występowania *Cryptosporidium* ($p=0.00336$), *Giardia* ($p=0.02721$) i mikrosporydiów ($p=0.04932$) w poszczególnych kategoriach żywności (Rycina 5).

Rycina 5. Analiza częstości występowania *Cryptosporidium*, *Giardia* i mikrosporydiów w badanych kategoriach żywności pochodzenia roślinnego.



Objaśnienia: 1 – sałaty, 2 – kielki, 3 – warzywa, 4- owoce, 5- zioła

4.2. Zanieczyszczenie stadiami dyspersyjnymi pasożytów nasion używanych do hydroponicznej uprawy kiełków

Spośród 30 zbadanych prób nasion używanych do uprawy kiełków, stadia dyspersyjne pasożytów stwierdzono tylko w dwóch próbach (6,7%). Wykryto jedynie oocysty *Cryptosporidium* w nasionach lucerny (n=16). Żadna z ośmiu prób nasion fasoli mung oraz sześciu prób nasion pszenicy nie była zanieczyszczona stadiami dyspersyjnymi pasożytów.

4.3. Korelacja między częstością występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów na żywności pochodzenia roślinnego a miejscem zakupu

Stwierdzono różnice w częstości występowania pasożytów na produktach roślinnych zakupionych w różnych lokalizacjach. Pod uwagę brano trzy odrębne kategorie miejsc zakupu żywności: duże markety, małe sklepy warzywnicze oraz targowiska miejskie. Najczęściej stwierdzano zanieczyszczenie stadiami dyspersyjnymi pasożytów żywności pochodzenia roślinnego, którą zakupiono w małych sklepach warzywniczych i na targowiskach (Tabela 13). Obecność pasożytów stwierdzono w żywności zakupionej w trzech z pięciu sklepów warzywniczych. Natomiast produkty żywnościowe pochodzenia roślinnego zakupione we wszystkich sześciu marketach i na dwóch targowiskach zawierały stadia dyspersyjne pasożytów, jakkolwiek stwierdzano różnice w częstości ich występowania w poszczególnych miejscach zakupu, jednak różnice te nie były statystycznie istotne ($p=0,63846$).

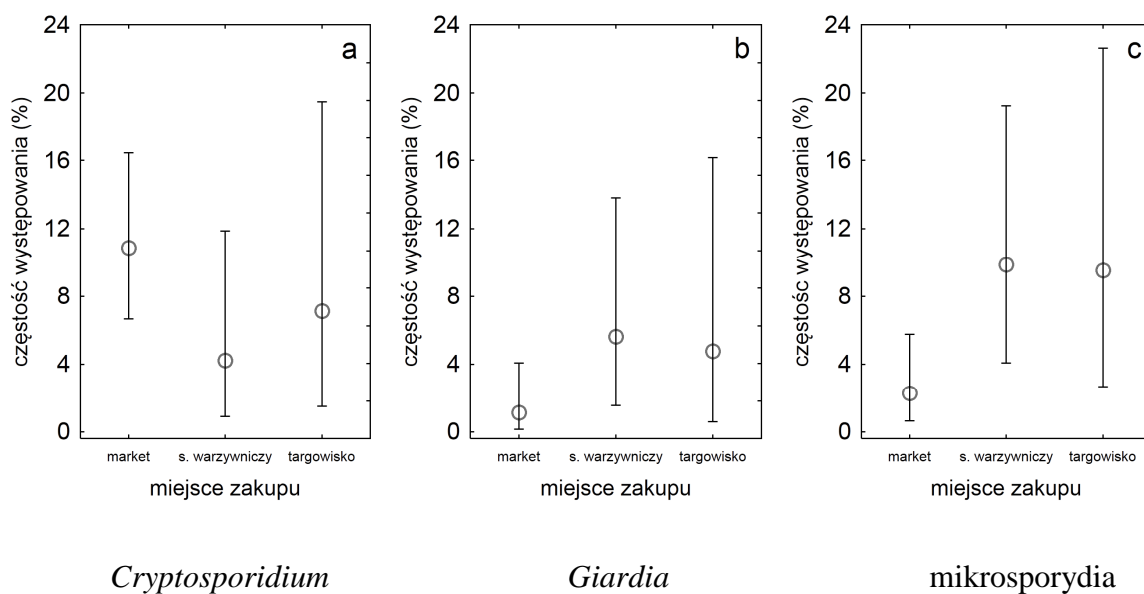
Tabela 13. Częstość występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów na żywności pochodzenia roślinnego w zależności od miejsca zakupu prób.

Miejsce zakupu	L-ba badanych/ l-ba pozytywnych prób (%)
Markety	183/24 (13.1)
I	33/4 (12.1)
II	4/1 (25.0)
III	24/2 (8.3)
IV	26/3 (11.5)
V	79/11 (13.9)
VI	17/3 (17.7)
Sklepy warzywnicze	72/13 (18.1)
I	50/9 (18.0)
II	14/3 (21.4)
III	5/1 (20.0)
IV	2/0
V	1/0
Targowiska	45/8 (17.8)
I	30/7 (23.3)
II	15/1 (6.7)
Ogółem	300/45 (15.0)

Przy użyciu testu zgodności chi-kwadrat Paersona sprawdzano także, czy istnieją różnice w częstości występowania trzech najczęściej wykrywanych pasożytów na żywności pochodzenia roślinnego w zależności od miejsca jej zakupu. Statystycznie istotne różnice stwierdzono jedynie w częstości występowaniu mikrosporydiów w próbach zakupionych

w różnych miejscach ($p=0.02104$). W przypadku *Cryptosporidium* i *Giardia* różnice te były nieistotne i wynosiły odpowiednio ($p=0.22890$ i $p=0.10519$) Żywność zakupiona na miejskich targowiskach oraz małych sklepach warzywniczych była częściej zanieczyszczona sporami mikrosporydiów niż żywność pochodząca z marketów (Rycina 6).

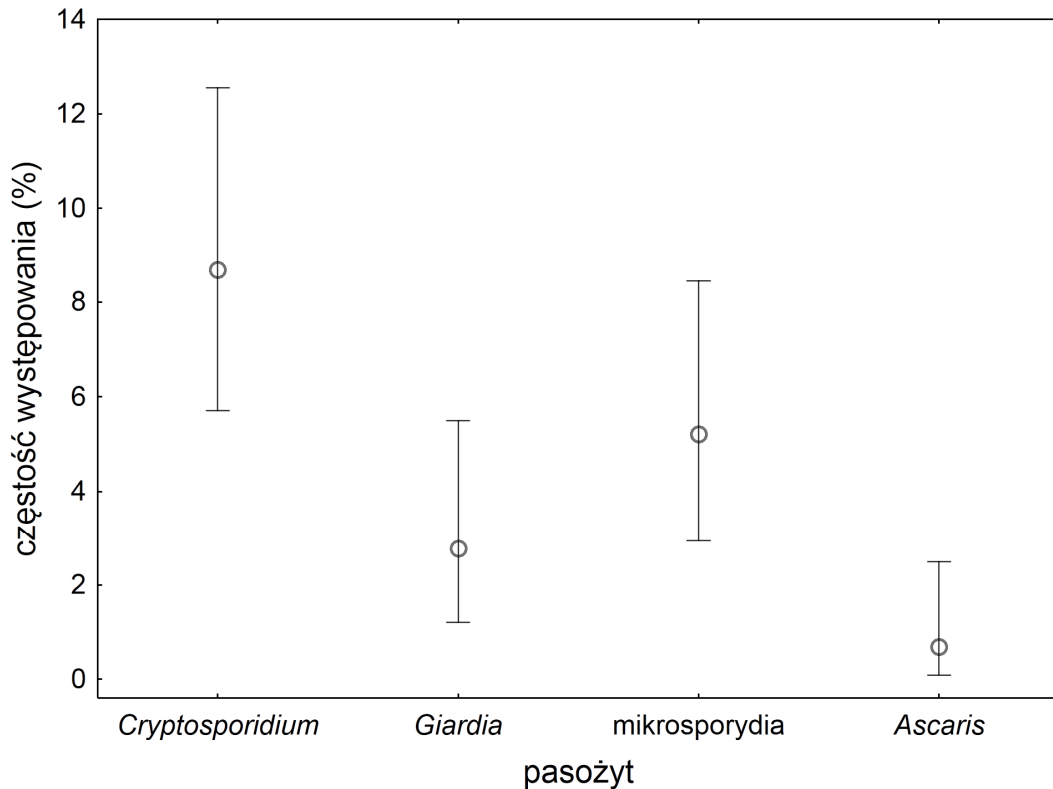
Rycina 6. Analiza częstości występowania *Cryptosporidium*, *Giardia* i mikrosporydiów w żywności pochodzenia roślinnego w zależności od miejsca zakupu.



4.4. Identyfikacja pasożytów w próbach żywności pochodzenia roślinnego i nasion

W badanych próbach żywności pochodzenia roślinnego najczęściej stwierdzano występowanie oocyst *Cryptosporidium* i spor mikrosporydiów, a najrzadziej cysty *Giardia* i jaja *Ascaris*. Przy pomocy testu zgodności chi-kwadrat Paersona stwierdzono statystycznie istotną różnicę ($\chi^2 = 23.0$, $df = 3$, $p < 0.001$) w częstości występowania stadiów dyspersyjnych tych pasożytów na badanej żywności (Rycina 7)

Rycina 7. Analiza częstości występowania *Cryptosporidium*, *Giardia*, mikrosporydiów i *Ascaris* w badanych próbach żywności pochodzenia roślinnego.



Spośród 45 prób żywności pochodzenia roślinnego, w których wykryto stadia dyspersyjne pasożytów, aż w 25 (55,6%) zidentyfikowano oocysty *Cryptosporidium*, w 16 (35,6%) spory mikrosporydiów, w 8 (17,8%) cysty *Giardia* i w dwóch jaja *Ascaris* (4,4%). Obecność stadiów dyspersyjnych dwóch pasożytów stwierdzono w sześciu próbach (13,3%) W żadnej ze zbadanych prób nie stwierdzono obecności trzech lub więcej pasożytów. Natomiast w próbach nasion (n=30) wykryto tylko oocysty *Cryptosporidium*.

4.4.1. Występowanie oocyst *Cryptosporidium* w próbach żywności i nasion

Do identyfikacji oocyst *Cryptosporidium* wykorzystano metodę Ziehl-Neelsena oraz komercyjny test immunofluorescencyjny. Rozpoznanie oocyst *Cryptosporidium* w preparatach barwionych metodą Ziehl-Neelsena oparte było na ich kształcie, wielkości i ciemnoczerwonym zabarwieniu. Wielkość wykrytych oocyst wahała się od 4,5 do 5,3 μm .

Ponadto, w celu identyfikacji oocyst zastosowano test IFA. Oocysty *Cryptosporidium* zidentyfikowano biorąc pod uwagę wielkość, kształt i charakterystyczny, jasnozielony kolor świecenia ścian oocyst.

W zbadanych łącznie 330 próbach żywności i nasion, oocysty *Cryptosporidium* stwierdzono w 27 próbach, w tym w 25 próbach żywności (8,3%) i w dwóch próbach nasion (6,7%). Oocysty *Cryptosporidium* wykryto we wszystkich kategoriach żywności, za wyjątkiem sałatek warzywnych (Tabela 14).

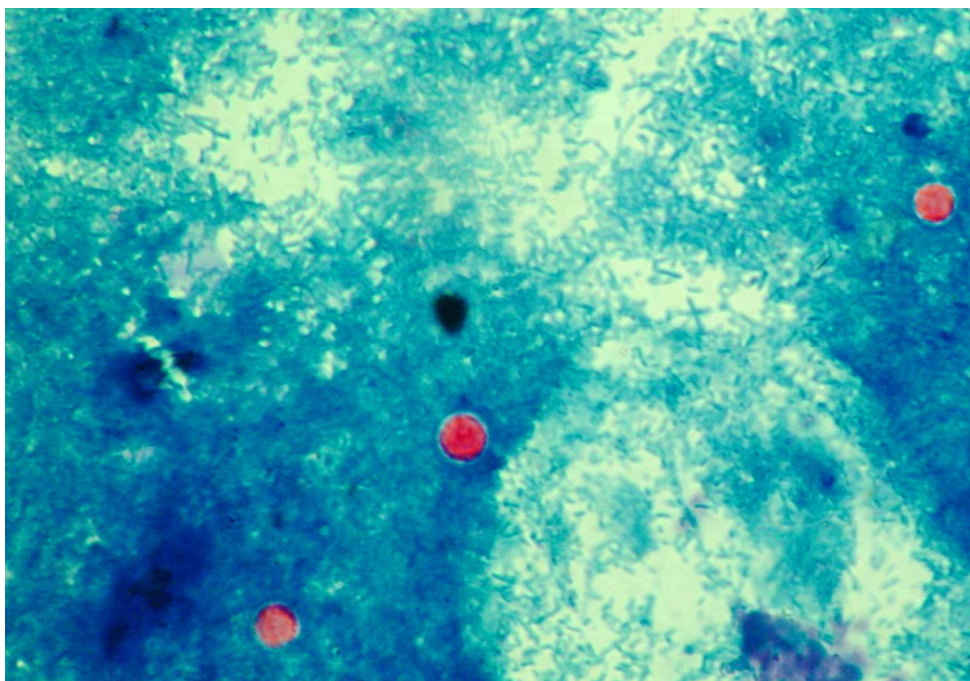
Tabela 14. Występowanie oocyst *Cryptosporidium* w próbach żywności.

Kategoria żywności	Próby żywności			
	Liczba badanych prób	Liczba pozytywnych prób		Liczba pozytywnych prób (%)
		Rozmaz barwiony Z-N	IFA	
Sałaty	56	6	6	6 (10,7)
Kiełki	56	12	11	12 (21,4)
Warzywa	53	1	1	1 (1,9)
Owoce	40	1	1	1 (2,5)
Zioła	83	5	5	5 (6,0)
Sałatki warzywne	12	0	0	0 (0)
Ogółem	300	25	24	25 (8,3)

Najczęściej oocysty *Cryptosporidium* wykrywano w kiełkach (Tabela 14). Stadia dyspersyjne pasożyta stwierdzono w czterech próbach mieszanki kiełków, w trzech lucerny, w dwóch kiełków brokułu, oraz w pojedynczych próbach kiełków fasoli mung, pszenicy oraz rzodkiewki. Oocyst nie stwierdzono w próbach kiełków słonecznika. W większości prób oocysty identyfikowano w preparatach barwionych metodą Ziehl-Neelsena, jak i w teście IFA. Tylko w jednej mieszance kiełków w preparacie barwionym metodą Ziehl-Neelsena wykryto pojedyncze oocysty. W pozostałych próbach kiełków liczba oocyst wahała się od 10 do 148; część z nich nie zawierała sporozoitów.

Oocysty pasożyta stwierdzono również w sześciu próbach sałat: trzech sałaty masłowej, jednej roszponki (Fot. 1), jednej rukoli i sałaty dekoracyjnej. Wszystkie próby były pozytywne, zarówno w preparacie barwionym metodą Ziehl-Neelsena, jak i w teście IFA. Liczba obserwowanych oocyst wynosiła od pięciu do 164. Tylko w próbie rukoli część oocyst nie zawierała sporozoitów.

Fotografia 1. Oocysty *Cryptosporidium* w preparacie osadu uzyskanego z roszponki barwionym metodą Ziehl-Neelsena.



Cryptosporidium zidentyfikowano w pięciu próbach ziół (dwie koperku, dwie kolendry, jedna mięty). Wszystkie one były pozytywne zarówno w preparacie barwionym metodą Ziehl-Neelsena jak i w teście IFA. W większości pozytywnych prób oocysty były nieliczne, tylko w próbie mięty stwierdzono ich 286; z reguły zawierały sporozoitów.

Pojedyncze oocysty tego pasożyta wykryto, zarówno w preparacie barwionym metodą Ziehl-Neelsena jak i teście IFA w jednej próbie warzyw (natka pietruszki) i owoców (truskawki).

Niewielką liczbę pustych oocyst *Cryptosporidium* (cztery do pięciu) wykryto w dwóch próbach nasion lucerny zarówno w preparatach barwionych metodą Ziehl-Neelsena, jak i w teście IFA.

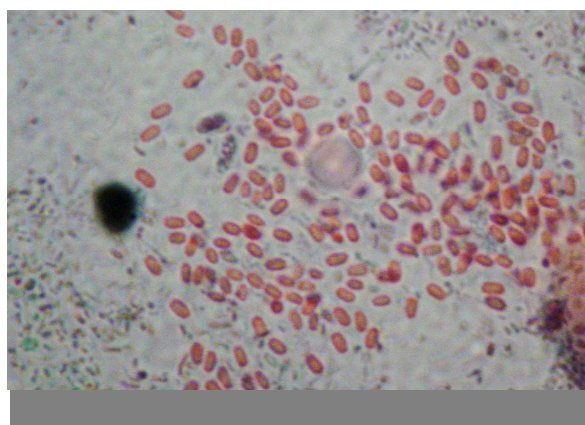
4.4.2. Występowanie spor mikrosporydiów w próbach żywności

W preparatach barwionych chromotropem obecność spor mikrosporydiów stwierdzono w 16 próbach (5,3%) (Tabela 15, Fot. 2). Przy wykorzystaniu techniki FISH potwierdzono obecność spor mikrosporydiów, a także zidentyfikowano gatunki pasożyta. Większość wyników potwierdzono również przy użyciu techniki multiplex FISH. W próbach zidentyfikowano spory czterech gatunków mikrosporydiów inwazyjnych dla człowieka.

Tabela 15. Występowanie mikrosporydiów w próbach żywności.

Kategoria żywności	Próby żywności			
	Liczba badanych prób	Liczba pozytywnych prób		Liczba pozytywnych prób (%)
		Rozmaz barwiony chromotropem	FISH	
Sałaty	56	3	3	3 (5,4)
Kielki	56	3	3	3 (5,4)
Warzywa	53	4	4	4 (7,6)
Owoce	40	5	5	5 (12,5)
Zioła	83	0	0	0 (0)
Sałatki warzywne	12	1	1	1 (8,3)
Ogółem	300	16	16	16 (5,3)

Fotografia 2. Spory mikrosporydiów w preparacie barwionym chromotropem uzyskanym z osadu sałatki warzywnej Kalifornia mix.



4.4.2.1. Występowanie *E. bieneusi*

Spory *E. bieneusi* stwierdzono w 10 zbadanych próbach (3,3%), w tym w dwóch sałaty dekoracyjnej i jednej sałaty masłowej, w trzech różnych rodzajach kiełków (kiełki brokuła, kiełki lucerny i mieszanka kiełków), dwóch warzyw (natka pietruszki i por) oraz dwóch próbach malin.

4.4.2.2. Występowanie *E. intestinalis*

Obecność spor *E. intestinalis* zidentyfikowano w trzech próbach (1%) - w dwóch truskawek i jednej malin.

4.4.2.3 Występowanie *E. cuniculi*

W dwóch zbadanych próbach żywności pochodzenia roślinnego wykryto spory *E. cuniculi*. Obecne w natce pietruszki (0.7 %).

4.4.2.4. Występowanie *E. hellem*

Spory *E. hellem* zidentyfikowano poprzez wykorzystanie techniki FISH i multiplex FISH tylko w jednej próbce (0,3%) - w sałatce wielowarzywnej Kalifornia mix.

4.4.3. Występowanie cyst *Giardia*

Cysty *Giardia* stwierdzono w ośmiu zbadanych próbach (2,7%) żywności pochodzenia roślinnego (Tabela 16). Cysty w preparatach świeżych zidentyfikowano na podstawie wielkości, kształtu i charakterystycznych cech budowy wewnętrznej. Identyfikację cyst *Giardia* w preparatach świeżych potwierdzono przy użyciu komercyjnego testu immunofluorescencji bezpośredniej MERIFLUOR *Cryptosporidium/Giardia* tylko w czterech przypadkach.

Tabela 16. Występowanie cyst *Giardia* w próbach żywności.

Kategoria żywności	Próby żywności			
	Liczba badanych prób	Liczba pozytywnych prób		Liczba pozytywnych prób (%)
		Rozmaz świeży/trwały	IFA	
Sałaty	56	4/4	1	4 (7,1)
Kielki	56	0/0	0	0 (0)
Warzywa	53	0/0	0	0 (0)
Owoce	40	3/3	3	3 (7,5)
Zioła	83	1/1	0	1 (1,2)
Sałatki warzywne	12	0/0	0	0 (0)
Ogółem	300	8/8	4	8 (2,7)

Cysty *Giardia* stwierdzono w czterech próbach sałat (dwóch sałaty dekoracyjnej, jednej sałaty masłowej oraz jednej insalatiny), trzech próbach owoców (dwóch truskawek i jednej borówki czarnej) oraz w jednej próbie oregano. Zazwyczaj wykrywano pojedyncze cysty pasożyta (jedna do dwóch); tylko w jednej próbie truskawek stwierdzono siedem cyst *Giardia* (Fot.3).

Fotografia 3. Cysta *Giardia* w preparacie świeżym uzyskanym z osadu borówki czarnej.



4.4.4. Występowanie jaj *Ascaris*

Obecność pojedynczych jaj *Ascaris* stwierdzono tylko w dwóch próbach ziół (0,7% zbadanych) - w oregano i w rozmarynie. W osadzie uzyskanym z oregano wykryto obecność dwóch (Fot.4), a z rozmarynu jednego jaja. Wielkość jaj wynosiła od 64 do 71 μm i odpowiadała wielkością zapłodnionym jajom *Ascaris*.

Fotografia 4. Jajo *Ascaris* w preparacie świeżym osadu uzyskanym z oregano.



4.5. Różnice w występowaniu stadiów dyspersyjnych pasożytów w próbach żywności wyprodukowanej przez polskich producentów i pochodzącej z importu

Żywność pochodzenia krajowego była częściej zanieczyszczona stadiami dyspersyjnymi pasożytów niż żywność importowana. Różnica ta jednak nie była statystycznie istotna ($p > 0,41852$). Spośród 259 prób żywności wyprodukowanej w kraju stadia dyspersyjne pasożytów stwierdzono w 41 próbach (15.8%), zaś z 41 prób pochodzących z importu,

zanieczyszczenie pasożytami wykryto tylko w czterech próbach (9.8%). Oocysty *Cryptosporidium* wykryto w trzech próbach sałat, w tym w dwóch pochodzących z Włoch (sałata dekoracyjna i rukola) i w roszone importowanej z Niemiec. Ponadto, w jednej próbie insalaty wyprodukowanej we Włoszech stwierdzono obecność cyst *Giardia*.

5. DYSKUSJA

Produkty pochodzenia roślinnego są istotnym składnikiem zdrowej diety, ponieważ stanowią istotne źródło witamin i minerałów oraz błonnika, który pęczniąc w przewodzie pokarmowym pochłania nadmiar tłuszczu i cholesterolu, a także toksyny pochodzące z nie strawionych i nie wchłoniętych składników pokarmowych. Spożywanie surowych warzyw i owoców jest rekomendowane w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego, niektórych nowotworów, a także w leczeniu otyłości (Van Duyn i Pivonka, 2000). Z drugiej jednak strony, te produkty żywnościowe mogą być zanieczyszczone groźnymi dla zdrowia i życia bakteriami, pasożytami i toksynami. Ze względu na skomplikowaną powierzchnię i porowatość, produkty żywnościowe pochodzenia roślinnego częściej ulegają zanieczyszczeniu patogenami, a swoisty mikroklimat stwarza warunki do lepszego ich przeżywania. Zatem zanieczyszczona żywność może stanowić zagrożenie zdrowia publicznego.

Produkty roślinne, ze względu na swoją strukturę i różnorodność, stanowią bardzo trudny materiał do badań, toteż stosunkowo niewiele jest prac dotyczących występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów w próbach żywności pochodzenia roślinnego oraz żywnościopochodnych epidemii. W ostatnich dwóch dekadach szczególną uwagę zwraca się raczej na badanie wody, jako główne źródło wodnopochoodnych epidemii wywoływanych przez pasożytnicze pierwotniaki. Stąd też badania wody traktowano priorytetowo i są już opracowane standardy metod monitorowania wody na obecność stadiów dyspersyjnych pierwotniaków (Karanis i wsp., 2007; Smith i Nichols, 2009; Macarisin i wsp., 2010). Natomiast opracowanie standardowych metod do badania prób żywności stanowi nadal duże wyzwanie, głównie ze względu na dużą różnorodność materiału roślinnego, jak samych pasożytów, do których wykrywania i identyfikacji stosowane są rozmaite metody.

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że cele badań prób żywności pochodzenia roślinnego były różne. Celem większości badań było wykrycie jedynie obecności jaj i larw helmintów w próbach żywności pochodzenia roślinnego (Kozan i wsp., 2005, Amoah i wsp., 2006, Andoh i wsp., 2009, Gupta i wsp., 2009, Avcioglu i wsp., 2010, Alli i wsp., 2011). Niektórzy badacze oprócz obecności jaj helmintów dodatkowo identyfikowali także cysty *Giardia* (Gharavi i wsp., 2002, Erdoğrul i Sener 2005, Daryani i wsp., 2008, Abougrain i wsp., 2009, Fallah i wsp., 2012), a celem nielicznych badań było wykrycie tylko oocyst *Cryptosporidium* (Rzeżutka i wsp., 2010) i/lub cyst *Giardia* (Amorós i wsp., 2010). Natomiast celem prezentowanych badań było wykrycie wszystkich pasożytów, potencjalnie występujących w próbach żywności pochodzenia roślinnego – od mikrosporydiów do helmintów. Zatem zakres niniejszych badań był szerszy i wiązał się z zastosowaniem różnych metod identyfikacji pasożytów. Także wyniki tych badań pozwoliły na uzyskanie pełniejszych danych, dotyczących zanieczyszczenia żywności pochodzenia roślinnego stadiami dyspersyjnymi pasożytów.

Prawidłowe oszacowanie ryzyka zarażenia wiąże się z badaniem odpowiedniej wielkości prób żywności pochodzenia roślinnego (Smith i Nichols, 2009). Jednakże z przeglądu piśmiennictwa wynika, że wielkość badanych prób produktów roślinnych znacznie się różniła. Niektórzy autorzy badali zbyt duże próby – od 1 kg do 2.5 kg (Szelągiewicz i Tarczyński, 1969; Amahmid i wsp., 1999), inni natomiast zbyt małe próby – od 20 do 50 g (Rai i wsp., 2008; Rzeżutko i wsp., 2010). Jednak badanie zbyt małej lub zbyt dużej próby na obecność stadiów dyspersyjnych wiąże się z niedoszacowaniem lub przeszacowaniem ryzyka zarażenia. Uważa się, że przy opracowywaniu metod wykrywania stadiów dyspersyjnych pasożytów należy badać próbę o takiej wadze, jaką spożywa przeciętny konsument, bo wówczas uzyskuje się użyteczne dane do oszacowania ryzyka zarażenia (Smith i Nichols, 2009). Toteż w prezentowanej pracy wielkość każdej badanej

próby żywności pochodzenia roślinnego wynosiła 100 g, czyli tyle, ile z reguły spożywa jednorazowo przeciętny konsument. Taką wielkość próby badali także inni autorzy (Erdoğrul i Sener 2005; Abougrain i wsp., 2009; Andoh i wsp., 2009; Gupta i wsp., 2009). Należy podkreślić również, że ustalenie standardowej wielkości badanej próby umożliwi zarówno prawidłowe oszacowanie ryzyka zarażenia, jak i porównywanie wyników badań.

Kolejnym problemem utrudniającym przeprowadzanie badań jest brak ujednoliconych i odpowiednio skutecznych metod wymywania, odzyskiwania i wykrywania stadiów dyspersyjnych pasożytów oraz ich identyfikacji (Smith i Nichols, 2009). W celu separacji stadiów dyspersyjnych pasożytów z materiału roślinnego stosowano różne zabiegi mające na celu ich odczepienie od powierzchni materiału roślinnego. Aby wymyć i wypłukać stadia dyspersyjne z badanych prób często wykorzystywano wodę wodociągową (Szelągiewicz i Tarczyński, 1969; Kasprzak i wsp., 1981; Ghavari i wsp., 2002; Andoh i wsp. 2009; Sia Su i wsp., 2012), roztwory soli fizjologicznej (Amahmid i wsp., 1999; Erdoğrul i Sener 2005; Amoah i wsp., 2006; Daryani i wsp., 2008; Abougrain i wsp., 2009; Gupta i wsp., 2009; Al-Megrin 2010; Fallah i wsp., 2012) lub zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (Rai i wsp., 2008). Należy jednak podkreślić, że płukanie warzyw i owoców w wodzie wodociągowej może wiązać się z możliwością zanieczyszczenia badanych prób oocystami *Cryptosporidium* i cystami *Giardia*, o czym świadczy fakt, że 32% wodnopochoдных epidemii giardiozy i ponad 23% epidemii kryptosporidiozy związana była z wodą wodociągową. W związku z tym wyniki badań, w których do wypłukiwania stadiów dyspersyjnych stosowano wodę wodociągową mogą być obarczone błędem. Ponadto, ze względu na właściwości adhezyjne stadiów dyspersyjnych niektórych pasożytów (Macarasin i wsp. 2010) niektórzy autorzy stosowali ultradźwięki lub detergenty (m.in. Tween 20, Tween 80, laurylosiarczan sodu, glicynę), które przyczyniają się do zwiększenia efektywności wymywania stadiów pasożytów (Kozan i wsp., 2005; Jędrzejewski i wsp., 2007; Rai i wsp., 2008; Rzeżutka i wsp., 2010).

Ostatnio wykazano również, że niektóre detergenty używane do mycia szkła laboratoryjnego, np. 0.1% Alconox, mogą skutecznie zwiększać efektywność wmywania oocyst *Cryptosporidium* z powierzchni żywności (Shields i wsp., 2012). Skuteczne wmywanie stadiów dyspersyjnych pasożytów, szczególnie o małych rozmiarach, jest niezwykle istotne. Dzięki zastosowaniu laserowego mikroskopu konfokalnego i monoklonalnych przeciwciał przeciw *Cryptosporidium* znakowanych fluoresceiną, doświadczalnie stwierdzono, że oocysty *C. parvum* wykazują duże zdolności adhezyjne do liści szpinaku, podlewanego zanieczyszczoną wodą (Macarisin i wsp., 2010). Zaobserwowano również, że niektóre oocysty biernie dostawały się przez otwory szparkowe do wnętrza liści i utrzymywały się na poziomie mezofilu, co także wpływa na zmniejszoną skuteczność ich wmywania.

Analizując dostępną literaturę oraz mając na uwadze cel niniejszych badań, do wmywania stadiów dyspersyjnych pasożytów z prób żywności pochodzenia roślinnego zastosowano jałowy roztwór soli fizjologicznej z dodatkiem 0.01% roztworu Tween 80. Badaną próbę umieszczano w tym roztworze i intensywnie mieszano przez 30 minut, a następnie przesączało przez warstwę gazy w celu oczyszczenia zawiesiny z fragmentów badanej żywności. Procedury stosowane przez autorów innych badań różnią się znacznie czasem płukania i/lub wytrząsania badanych produktów - od jednej minuty do 24 godzin (Gharavi i wsp., 2002; Erdoğan i Sener 2005; Rai i wsp., 2008; Gupta i wsp., 2009; Rzeżutka i wsp., 2010; Al-Megrin 2010; Fallah i wsp., 2012). Często w publikacjach brak jest jednak takiej informacji Szelągiewicz i Tarczyński 1969; Kasprzak i wsp., 1981; Amahmid i wsp., 1999; Amoah i wsp., 2006; Daryani i wsp., 2008; Abougrain i wsp., 2009; Andoh i wsp., 2009; Avcioglu i wsp., 2010; Sia Su i wsp., 2012). Należy sądzić, że tak zróżnicowane procedury wmywania stadiów dyspersyjnych pasożytów mogą mieć znaczący wpływ na uzyskane wyniki.

Mała liczba stadiów dyspersyjnych występujących na powierzchni żywności wymaga użycia technik zagęszczających. Zazwyczaj stosowano metodę sedymentacyjną (w tym wirowanie). W dostępnych opracowaniach stosowano różny czas i prędkość wirowania. Najczęściej próby wirowano przez 15 minut przy 2164 g (Amahmid i wsp., 1999; Erdoğan i Sener 2005; Abougrain i wsp., 2009; Gupta i wsp., 2009) lub przy 1500 g (Kozan i wsp., 2005; Avcioglu i wsp., 2010). Stosowano również wirowania przez 5, 15 lub 20 minut przy 2000 g (Daryani i wsp., 2008; Al-Megrin 2010; Fallah i wsp., 2012) lub przez 10 minut przy 2500 g (Rzeżutka i wsp., 2010). Ze względu na to, że w niniejszych badaniach, wykrywano również obecność bardzo małych stadiów dyspersyjnych, jakimi są spory mikrosporydiów, zdecydowano się wydłużyć czas wirowania. W związku z tym, próby żywności pochodzenia roślinnego i nasion wirowano przez 30 minut przy 2000 g w temperaturze 4°C.

Tylko w jednej pracy, której celem było wykrycie *Cryptosporidium* w próbach żywności, do odzysku oocyst z osadu wykorzystano komercyjny test immunomagnetycznej separacji (Rzeżutka i wsp., 2010). Chociaż metoda immunomagnetycznej separacji zwiększa odzysk oocyst z badanej próby, to jednak ma szereg wad. Na rynku dostępne są zestawy służące jedynie do izolacji oocyst *Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii* i cyst *Giardia* oraz test służący do jednoczesnej separacji cyst *Giardia* i oocyst *Cryptosporidium*. Istotną przeszkodą w ich wykorzystaniu jest wysoka cena, np. zestaw, umożliwiający zbadanie tylko dziesięciu prób kosztuje ponad 2,5 tys. zł. Jeszcze wyższy jest koszt specjalistycznego wyposażenia do przeprowadzenia tych badań (mikser laboratoryjny, statyw magnetyczny, specjalny typ próbek). Ponadto, producenci do opłaszczania kulek magnetycznych wykorzystują różne przeciwciała (IgM lub IgG), które różnią się powinowactwem. Stwierdzono różnice między dwoma komercyjnymi zestawami w skuteczności odzysku oocyst różnych izolatów *Cryptosporidium* (Paton i wsp., 2001). Wykazano także, iż czynniki fizyko-chemiczne badanej próby, takie jak pH, mętność, obecność dwuwartościowych

kationów lub glonów wpływają na wiązanie przeciwciał (Paton i wsp., 2001; Cook i wsp., 2006a). A co najważniejsze istnieją wątpliwości, czy zestawy do immunomagnetycznej separacji umożliwiają wykrycie wszystkich gatunków, genotypów i subgenotypów *Cryptosporidium* i *Giardia*. (Smith i Nichols, 2009).

W celu wykrycia i identyfikacji pasożytów w uzyskanym osadzie, w tych badaniach wykorzystano metody mikroskopowe, immunologiczne i molekularne. Zastosowane w niniejszej pracy metody mikroskopowe nie odbiegały od powszechnie stosowanych w podobnych badaniach. Z reguły, w pracach dotyczących występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów przeglądano w mikroskopie świetlnym świeże preparaty osadu zawieszonego w roztworze soli fizjologicznej (Szelażewicz i Tarczyński 1969; Kasprzak i wsp., 1981; Amahmid i wsp., 1999; Gharavi i wsp., 2002; Erdoğrul i Sener 2005; Kozan i wsp., 2005; Amoah i wsp., 2006; Abougrain i wsp., 2009; Andoh i wsp., 2009; Gupta i wsp., 2009; Avcioglu i wsp., 2010; Al-Megrin, 2010), a w niektórych badaniach preparaty podbarwiano także płynem Lugola, w celu lepszego uwidocznienia organelli pierwotniaków (Rai i wsp., 2008; Daryani i wsp., 2008; Sia Su i wsp., 2012; Fallah i wsp., 2012). Mając na uwadze fakt, że mikroskopowa analiza świeżych preparatów z reguły pozwala na wstępne rozpoznanie pierwotniaków, w niniejszych badaniach przeglądano zarówno świeże preparaty, jak i preparaty trwałe, barwione trichromem. Ponadto, wykrycie niektórych pasożytów (np. *Cryptosporidium* i mikrosporydiów) wymaga zastosowania specyficznych metod identyfikacji. W celu wykrycia obecności oocyst *Cryptosporidium* w próbach żywności pochodzenia roślinnego stosowano albo test IFA (Rzeżutka i wsp., 2010), albo preparaty barwione metodą Ziehl-Neelsena (Calvo i wsp., 2004) lub też preparaty barwiono metodą Ziehl-Neelsena, a pozytywne próby potwierdzano przy użyciu testu IFA (Robertson i Gjerde, 2001a; Rai i wsp., 2008). Taką samą procedurę, jaką stosowali Robertson i Gjerde (2001a) oraz Rai i współpracownicy (2008) zastosowano także w tych badaniach.

Natomiast, w tych badaniach zastosowano po raz pierwszy specyficzną metodę barwienia chromotropem, która umożliwia wykrycie obecności spor mikrosporydiów, a do identyfikacji gatunkowej wykorzystano metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH i multiplex FISH).

Techniki biologii molekularnej są wykorzystywane do precyzyjnej identyfikacji gatunku i genotypu pasożyta, która jest niezwykle istotna w dociekaniach epidemiologicznych. Jednak ich wykorzystanie w badaniach prób żywności wiąże się z wieloma trudnościami (Smith i Nichols, 2009; Rzeżutka i wsp., 2010). Wynikają one, m. in. z braku standaryzacji metod ekstrakcji DNA z prób środowiskowych, dużej różnorodności starterów, obecności niewielkiej liczby stadiów dyspersyjnych pasożytów oraz licznych inhibitorów polimerazy (np. kwasy humusowe, polifenole). Stąd też, tylko w jednej pracy wykorzystano technikę PCR-RFLP do identyfikacji gatunku *Cryptosporidium* w próbach żywności (Rzeżutka i wsp., 2010). Autorzy tej pracy uzyskali produkt amplifikacji DNA *Cryptosporidium* tylko z jednej próby, co wskazuje na duże problemy w wykorzystaniu technik biologii molekularnej do precyzyjnej identyfikacji pasożytów w próbach żywności. W badaniach pilotażowych podjęto również próby izolacji DNA *Cryptosporidium*, niestety zakończyły się one niepowodzeniem. Zatem konieczne są dalsze badania nad opracowaniem bardziej specyficznych i czułych technik biologii molekularnej, które byłyby użyteczne w badaniu prób żywności (Smith i Nichols, 2009). Ponadto, w przypadku obecności „pustych” cyst i/lub oocyst pierwotniaków w badanej próbce, nie można izolować DNA pasożytów. Jednak obecność samych otoczek wskazuje, że żywność była zanieczyszczona kałem, który może zawierać także inne patogeny.

W tych badaniach z reguły za próby pozytywne uważano te, w których obecność spor mikrosporydiów, cyst *Giardia* i oocyst *Cryptosporidium* potwierdzono, co najmniej dwoma metodami. Tylko w przypadku czterech prób (3 próby sałaty i 1 próba oregano) pojedyncze cysty *Giardia* wykryto mikroskopowo w świeżych i trwałych preparatach. Natomiast nie

zidentyfikowano ich przy użyciu testu IFA. Jednak, ze względu na charakterystyczną budowę, kształt i widoczne organella cyst, próby te również uznano za pozytywne. Tak samo postąpiono z jedną próbą żywności (mieszanka kiełków), w której obecność pojedynczych oocyst *Cryptosporidium* stwierdzono tylko w preparacie barwionym metodą Ziehl-Neelsena.

W prezentowanych badaniach stadia dyspersyjne pasożytów stwierdzono w 45 próbach z 300 badanych (15%). Ze względu na różną metodykę badań, różnorodny materiał badań i cele oraz regiony geograficzne trudno porównywać uzyskane wyniki z wynikami innych autorów. Nie mniej, z dostępnych danych wynika, że ogólna częstość zanieczyszczenia prób żywności pochodzenia roślinnego w innych regionach świata była zdecydowanie wyższa, m.in. aż 65% badanych prób żywności w Iranie było zanieczyszczonych pasożytami (Gharavi i wsp., 2002), 58% w Libii (Abougrain i wsp., 2009), 45.4% w Nigerii (Alli i wsp. 2011), 44% w Indiach (Gupta i wsp., 2009) i 31.4% w Turcji (Erdoğan i Sener 2005). Natomiast, w Norwegii i Turcji stadia dyspersyjne pasożytów wykryto odpowiednio tylko w 6% i 3% badanych prób (Robertson i wsp., 2001a; Avcioglu i wsp., 2010).

Należy jednak dodać, że częstość występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów w próbach żywności pochodzenia roślinnego może być wyższa niż to opisywano. Doświadczalnie wykazano, że efektywność odzysku oocyst *Cryptosporidium*, zależy od zastosowanych metod i rodzaju badanego materiału roślinnego i waha się od 1 do 59% (Smith i Nichols, 2009).

W przeprowadzonych badaniach zakupione próby żywności pochodzenia roślinnego podzielono na sześć odrębnych kategorii zgodnie z kryterium biologicznym i podziałem na grupy użytkowe, a następnie analizowano częstość występowania pasożytów w poszczególnych kategoriach. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że najczęściej stadia dyspersyjne wykrywano w kiełkach (23,2%), sałatach (21,4%) i owocach (20%). Podobnie, także inni autorzy stwierdzali, że sałaty były najczęściej zanieczyszczone

stadiumi dyspersyjnymi pasożytów, m.in. 60% badanych prób sałat w Ghanie (Amoah i wsp., 2006), 43,8 % prób w Indiach (Gupta i wsp., 2009), 27,8% w Arabii Saudyjskiej (Al-Megrin i wsp., 2010) i 11,4 % w Turcji (Kozan i wsp., 2005). Większe zanieczyszczenie sałat wynika prawdopodobnie z dużej powierzchni liści oraz ich struktury, czego potwierdzeniem jest fakt, że w niniejszych badaniach najczęściej pasożyty wykrywano w próbach sałaty dekoracyjnej i masłowej, a rzadko w sałatach o małej powierzchni liści, takich jak insalatina, rukola i rosłonka. Równie duże zanieczyszczenie owoców (głównie truskawek) pasożytami stwierdzali także inni autorzy (Szelągiewicz i Tarczyński, 1969; Kasprzak i wsp., 1981; Erdoğrul i Sener 2005). Natomiast, tylko Robertson i Gjerde (2001a) badali kiełki w kierunku obecności oocyst *Cryptosporidium* i cyst *Giardia*; jednak częstość zanieczyszczenia stadiumi dyspersyjnymi tych pasożytów była niższa niż w tych badaniach. Zanieczyszczenie kiełków stadiumi dyspersyjnymi pasożytów może być wynikiem stosowania skażonych nasion lub wody do hodowli. W tych badaniach wykazano, że dwie z 30 badanych prób było pozytywnych na obecność pasożytów. Występowanie pasożytów na kiełkach niesie ze sobą duże ryzyko zarażenia, ponieważ dostępne na rynku kiełki są z reguły gotowe do spożycia.

Celem prezentowanej pracy było także stwierdzenie, czy istnieje korelacja między częstością występowania stadiumi dyspersyjnych pasożytów na żywności pochodzenia roślinnego, a miejscem ich zakupu. Chociaż najczęściej zanieczyszczone pasożytami były produkty kupowane w małych sklepach warzywniczych i na targowiskach, to jednak na podstawie analizy statystycznej nie stwierdzono istotnych różnic. Natomiast, kiedy poddano statystycznej analizie częstość występowania trzech najczęściej wykrywanych pasożytów (*Cryptosporidium*, *Giardia* i mikrosporydia) na żywności pochodzenia roślinnego, wykazano statystycznie istotne różnice w częstości występowania mikrosporydiów. W produktach roślinnych zakupionych w sklepach warzywniczych i na targowiskach częściej wykrywano spory mikrosporydiów niż w żywności zakupionej w marketach. Tylko nieliczni autorzy

badali podobną zależność. Szelągiewicz i Tarczyński (1969) wykazali, że truskawki pochodzące z niewielkich upraw były częściej zanieczyszczone pasożytami niż te, pochodzące z wielkich plantacji. Także Daryani i wsp. (2008) wykazali, że żywność uprawiana w przydomowych ogródkach była zdecydowanie częściej zanieczyszczona pasożytami (71%) niż żywność zakupiona w marketach (50%). Można sądzić, że produkty roślinne zakupione w marketach pochodzą od dużych producentów, którzy mają uprawy w szklarniach lub tunelach, co zapobiega zanieczyszczeniu odchodami ludzi i zwierząt. Natomiast produkty zakupione w małych sklepach warzywniczych i targowiskach z reguły pochodzą od indywidualnych producentów, którzy prawdopodobnie stosują odchody do nawożenia upraw.

W tych badaniach nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zanieczyszczeniu pasożytami żywności pochodzenia roślinnego wyprodukowanej w kraju i pochodzącej z importu. Także Robertson i Gjerde (2001a) nie stwierdzili różnic w zanieczyszczeniu żywności krajowej i pochodzącej z importu.

W badanych w tej pracy próbach żywności pochodzenia roślinnego zidentyfikowano występowanie stadiów dyspersyjnych czterech pasożytów. Najczęściej stwierdzano obecność oocyst *Cryptosporidium* (w 8,3% badanych prób) i spor mikrosporydiów (w 5,3% prób). Rzadziej cysty *Giardia* i jaja *Ascaris*, które stwierdzano odpowiednio w 2,7% i 0,7% badanych prób żywności pochodzenia roślinnego. Różnice w częstości występowania tych pasożytów były statystycznie istotne.

W prezentowanych badaniach stwierdzano oocysty *Cryptosporidium* we wszystkich badanych kategoriach prób żywności, za wyjątkiem sałatek warzywnych; z reguły wykrywano je w kiełkach i sałatach, rzadziej w ziołach, owocach i warzywach. Zazwyczaj wykrywano znaczną liczbę oocyst (od 5 do 268) zawierających sporozoioty. Także Calvo i wsp. (2004) wykrywali oocysty tego pasożyta we wszystkich badanych produktach

pochodzenia roślinnego (sałacie, pietruszce, kolendrze i borówce), za wyjątkiem truskawek. Natomiast, Robertson i Gjerde (2001a) stwierdzili oocysty *Cryptosporidium* w 19 z 475 badanych prób żywności (4%), w tym w 14 próbach kiełków fasoli mung i 5 próbach sałat. Z kolei Rai i wsp. (2008) oocysty *Cryptosporidium* wykryli w jednej z 21 badanych prób warzyw. W badaniach prowadzonych w innym regionie Polski (okolice Lublina) oocysty *Cryptosporidium* wykryto w 3.6% badanych prób warzyw i owoców; przy czym z reguły „puste” oocysty stwierdzono w dwóch próbach kapusty białej, jednej próbie kapusty czerwonej i pekińskiej oraz w próbie selera i pora (Rzeżutka i wsp., 2010). Autorzy ci zidentyfikowali przy pomocy techniki PCR-RFLP *C. parvum* tylko w jednej próbie. Natomiast w tych badaniach, jak i w pozostałych (Robertson i Gjerde, 2001a; Calvo i wsp., 2004; Rai i wsp., 2008) nie przeprowadzono identyfikacji gatunku *Cryptosporidium*. Mając na uwadze, że tylko osiem gatunków *Cryptosporidium* i niektóre genotypy są inwazyjne dla człowieka, oszacowanie ryzyka zarażenia wiąże się ściśle z precyzyjną identyfikacją gatunku, genotypu, a nawet subgenotypu *Cryptosporidium*. Jednak, jak już wcześniej wspomniano, stanowi to duże wyzwanie. Wykrycie w niektórych badanych próbach znacznej liczby oocyst wskazuje na bezpośrednie zanieczyszczenie żywności kałem zarażonego człowieka lub zwierząt. W Polsce częstość występowania *Cryptosporidium* u ludzi i zwierząt jest stosunkowo wysoka i wynosi od 0 do 42.9% u ludzi, od 0 do 88% u zwierząt hodowlanych, od 0-73% u zwierząt dzikich i od 1.2-27.4% u psów i kotów (wg Bajer, 2008). Toteż środowisko może być znacznie zanieczyszczone oocystami *Cryptosporidium*, tym bardziej, że zarażony osobnik może wydalać nawet 10^{10} oocyst dziennie (Casey, 1991).

W tych badaniach, drugimi pod względem częstości występowania w próbach żywności pochodzenia roślinnego były mikrosporydia. Spory mikrosporydiów wykryto w 16 z 300 badanych prób (5.3%). Chociaż we wcześniejszych badaniach wykryto obecność spor mikrosporydiów w próbach sałaty, pietruszki, kolendry i truskawek, to jednak nie

zidentyfikowano gatunku (Calvo i wsp. 2004). Mając na uwadze olbrzymią różnorodność gatunkową, samo wykrycie spor nie pozwala na oszacowanie ryzyka zarażenia (Didier, 2005; Suankratay i wsp. 2012). Z ponad 1200 opisanych gatunków mikrosporydiów, u człowieka stwierdzono dotychczas występowanie jedynie 15 gatunków (www.dpd.cdc.gov/dpdx; Didier i Weiss, 2006; Chaudhary i wsp., 2011; Suankratay i wsp., 2012). W tych badaniach po raz pierwszy na świecie zidentyfikowano cztery gatunki mikrosporydiów inwazyjnych dla człowieka w próbach żywności pochodzenia roślinnego, dzięki zastosowaniu techniki FISH.

Najczęściej w badanych próbach identyfikowano spory *E. bienersi* (3.3%) i *E. intestinalis* (1%). Natomiast spory *E. cuniculi* wykryto jedynie w dwóch próbach (0.7%) natki pietruszki, *E. hellem* w jednej próbce (0.3%) sałatki wielowarzywnej. Fragment badań dotyczących wykrywania mikrosporydiów w próbach żywności pochodzenia roślinnego, został już opublikowany (Jedrzejewski i wsp., 2007). W tej pracy potwierdzono, że produkty pochodzenia roślinnego są zanieczyszczone sporami mikrosporydiów inwazyjnych dla człowieka w liczbie umożliwiającej zarażenie. Średnio z produktów roślinnych odzyskiwano $8,5 \times 10^2$ spor. Ze względu na to, że mikrosporydia są nowymi patogenami człowieka, dawka inwazyjna nadal nie jest znana (Weiss, 2001), jakkolwiek z badań na zwierzętach wynika, że minimalna dawka inwazyjna jest bardzo niska (Didier i wsp., 2004). Zatem należy sądzić, że średnia liczba wykrytych spor mikrosporydiów inwazyjnych dla człowieka jest na tyle wysoka, że stanowi istotne ryzyko zarażenia dla potencjalnych konsumentów. Jedyna jak dotąd żywnościopochodna epidemia mikrosporydiozy wywołana przez *E. bienersi* wskazuje, że żywność pochodzenia roślinnego stanowi źródło zarażenia tymi groźnymi patogenami (Decraene i wsp. 2012). Ponadto, dzięki zastosowaniu techniki FISH, nie tylko zidentyfikowano gatunki mikrosporydiów, ale także określono żywotność spor. Zatem technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* ma znaczącą przewagę nad technikami barwienia, które nie pozwalają na identyfikację gatunku oraz nad PCR, bowiem ta technika

nie pozwala na określenie żywotności spor oraz badania ilościowe. Nie wiadomo jednak, co było przyczyną zanieczyszczenia produktów żywnościowych sporami mikrosporydiów. W Polsce, stwierdzono występowanie *E. bienewsi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* i *E. hellem* u różnych gatunków zwierząt (Słodkiewicz-Kowalska i wsp., 2006; 2007; 2012), ale brak jest informacji o występowaniu tych patogenów u ludzi.

W niniejszych badaniach cysty *Giardia* wykryto tylko w ośmiu z 300 badanych prób (2,7%) żywności pochodzenia roślinnego. Ich obecność stwierdzono głównie w próbach sałat (cztery próby) oraz owoców (w dwóch próbach truskawek i jednej próbie borówki). Obecność cyst stwierdzono również w jednej próbie oregano. Z reguły wykrywano pojedyncze cysty w preparatach świeżych podbarwionych płynem Lugola i w preparatach trwałych barwionych trichromem. Tylko w czterech próbach cysty *Giardia* zidentyfikowano zarówno w preparatach świeżych i trwałych, jak i przy użyciu testu IFA. Wszystkie cysty wykryte przy użyciu testu IFA były żywe. Z analizy danych literaturowych wynika, że na świecie występuje znaczne zróżnicowanie w częstości występowania tego pasożyta w próbach żywności pochodzenia roślinnego. Wysoką częstość występowania cysty *Giardia* w próbach warzyw stwierdzano w Indiach i w Arabii Saudyjskiej, gdzie odpowiednio aż 57.1% i 31,5 % prób było zanieczyszczonych cystami tego pasożyta (Rai i wsp., 2008; Al-Megrin i wsp., 2010). Przeważnie jednak częstość występowania stadiów dyspersyjnych tego pasożyta była niższa i wynosiła odpowiednio: 1,3% (Sia Su i wsp., 2012), 5,5% (Erdoğrul i Sener 2005), 5,7% (Gharavi i wsp., 2002), 7% (Daryani i wsp., 2008) do 10 % badanych prób żywności (Abougrain i wsp., 2009). Najczęściej cysty *Giardia* wykrywano w próbach sałat (Erdoğrul i Sener 2005; Al-Megrin 2010) i pietruszki (Gharavi i wsp., 2002; Al-Megrin i wsp., 2010).

W tej pracy oraz w żadnych wyżej cytowanych pracach nie zidentyfikowano gatunku i genotypu *Giardia*, jakkolwiek niektórzy autorzy *a priori* przyjęli, że wykrywane przez nich cysty należą do gatunku *G. intestinalis* (Gharavi i wsp., 2002; Al-Megrin i wsp., 2010; Sia Su

i wsp., 2012). Jednak ze względu na fakt, że cysty większości gatunków *Giardia* mają taką samą budowę, identyfikacja gatunku *Giardia* na podstawie obserwacji cyst jest niemożliwa. Zatem ustalenie źródła zanieczyszczenia produktów roślinnych jest również niemożliwe. Należy jednak dodać, że częstość występowania *Giardia* u ludzi w Polsce jest stosunkowo niska i wynosi od 0,4% do 8,8%, podczas gdy u zwierząt ekstensywność występowania giardiozy waha się do od 0 do 14% u zwierząt hodowlanych, od 0 do 87% u zwierząt dzikich i od 1% do 53.5% u psów i kotów (wg Bajer, 2008). Także ptaki mogą się przyczyniać do zanieczyszczania żywności pochodzenia roślinnego cystami *Giardia* (Majewska A. C. i wsp., 2009).

W niniejszej pracy, spośród czterech identyfikowanych pasożytów, najrzadziej wykrywano *Ascaris*. Pojedyncze jaja tego pasożyta wykryto tylko w dwóch z 300 badanych prób (0,7%) – w oregano i rozmarynie, przy czym rozmiary tych jaj odpowiadały wielkości jaj zapłodnionych. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że zanieczyszczenie produktów roślinnych jajami *Ascaris* jest w wielu krajach powszechne, co nie dziwi, ponieważ *A. lumbricoides* jest najczęstszym pasożytem człowieka; również *A. suum* często występuje u świń i dzików (Dold i Holland, 2010). Wysoką częstość występowania jaj *Ascaris* w próbach żywności pochodzenia roślinnego stwierdzono w Ghanie (w 85% prób) (Amoah i wsp., 2005), w Libii (w 68% badanych prób) (Abougrain i wsp., 2009), na Filipinach (w 45% prób) (Sia Su i wsp., 2012), w Indiach (36% prób) (Gupta i wsp., 2009) i w Turcji (31.4% prób) (Erdoğrul i Sener 2005). Natomiast rzadko wykrywano jaja *Ascaris* w produktach roślinnych (w 1 do 2% badanych prób) w Turcji i w Iranie (Kozan i wsp., 2005; Daryani i wsp., 2008; Avcioğlu i wsp., 2010). Różnice w częstości zanieczyszczenia produktów roślinnych jajami *Ascaris* mogą, między innymi, być odzwierciedleniem różnic w częstości występowania tego pasożyta u ludzi i świń w różnych regionach świata. W Polsce częstość występowania glistnicy u ludzi szacuje się na ok. 2.7% (Dyńska i wsp., 2011),

podczas gdy w Afryce i Azji askarioza jest często stwierdzana u ludzi, co wynika głównie z uwarunkowań ekologicznych, socjoekonomicznych i sanitarnych, gdzie brak urządzeń sanitarnych prowadzi do zanieczyszczenia środowiska kałem ludzkim (Dold i Holland, 2010).

W tych badaniach nie zidentyfikowano gatunku *Ascaris*, ponieważ jaja obu gatunków tego nicienia są morfologicznie identyczne. Nie mniej, niektórzy autorzy, wykryte w próbach żywności jaja identyfikowali jako jaja *A. lumbricoides* (Amoah i wsp., 2005; Kozan i wsp., 2005; Gupta i wsp., 2009; Avcioglu i wsp., 2010). Z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć prawidłowość takiej identyfikacji tylko w odniesieniu do krajów muzułmańskich, gdzie ze względów religijnych nie prowadzi się hodowli świń i gdzie częstość występowania glistnicy u ludzi jest wysoka. Należy jednak podkreślić, że nie tylko *A. lumbricoides* wywołuje inwazję u ludzi, ale znane są także przypadki zarażenia ludzi *A. suum* (Maruyama i wsp., 1997; Inatomi i wsp., 1999; Sakakibara i wsp., 2002; Izumikawa i wsp., 2011). Ponadto, na podstawie molekularnej analizy DNA *Ascaris* uzyskanych od ludzi i świń wykazano, że glistnica u ludzi w Danii ma charakter zoonotyczny (Nejsum i wsp., 2005). Zoonotyczna askarioza może być również problemem w innych uprzemysłowionych krajach. W tym celu należy jednak wykorzystywać techniki biologii molekularnej do identyfikacji *Ascaris* wykrywanych u ludzi. Warto również dodać, że jaja *A. suum* wykorzystano jako broń biologiczną (Bellamy i Freedman, 2001). W 1970 roku, kanadyjski absolwent parazytologii, mszcząc się na swoich kolegach, podał im posiłki zanieczyszczone dużą liczbą zapłodnionych jaj *A. suum*; u zarażonych mężczyzn wystąpiła ostra niewydolność oddechowa (Phills i wsp., 1972). Mimo że, w tych badaniach wykryte w dwóch próbach ziół jaja zidentyfikowano tylko do rodzaju *Ascaris*, to jednak wobec powyższych danych, zanieczyszczone jajami *Ascaris* produkty roślinne mogą stanowić poważne zagrożenie zdrowia publicznego.

Żywność pochodzenia roślinnego zanieczyszczona stadiami dyspersyjnymi pasożytów może stanowić poważne zagrożenie zdrowia publicznego. Chociaż w ostatnich latach dokonano znacznego postępu w wykrywaniu i identyfikowaniu pasożytów zanieczyszczających żywność, to jednak znamy tylko wierzchołek góry lodowej, który nie odzwierciedla rzeczywistości. Uważa się również, że opisywane żywnościopochodne epidemie stanowią tylko niewielką część faktycznych przypadków. Zatem wiele pozostaje do zrobienia zanim dogłębnie poznamy rolę wody i żywności w transmisji pasożytów (Smith i Nichols., 2009).

6. WNIOSKI

1. W próbach żywności pochodzenia roślinnego zidentyfikowano stadia dyspersyjne *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Ascaris* i mikrosporydiów, natomiast w próbach nasion wykorzystywanych do hydroponicznej uprawy kiełków wykryto tylko oocysty *Cryptosporidium*, co wskazuje, że produkty roślinne były zanieczyszczone odchodami.
2. Stadia dyspersyjne pasożytów najczęściej stwierdzano w próbach kiełków i sałat i owoców. Większe zanieczyszczenie sałat i owoców wynika prawdopodobnie z dużej powierzchni liści i/lub ich struktury. Zanieczyszczenie kiełków stadiami dyspersyjnymi pasożytów może być wynikiem stosowania skażonych nasion lub wody do hodowli.
3. Wykazano statystycznie istotną korelację tylko między częstością występowania spor mikrosporydiów na żywności pochodzenia roślinnego, a miejscem jej zakupu. Mikrosporydia częściej wykrywano w produktach zakupionych w sklepach warzywniczych i na targowiskach niż w marketach. Produkty zakupione w małych sklepach warzywniczych i targowiskach z reguły pochodzą od indywidualnych producentów, którzy prawdopodobnie stosują odchody do nawożenia upraw.
4. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w występowaniu pasożytów na żywności produkcji krajowej i pochodzącej z importu.
5. Większość pasożytów, za wyjątkiem mikrosporydiów, zidentyfikowano na zbyt wysokim poziomie taksonomicznym (rodzaj) i w związku z tym oszacowanie ryzyka zarażenia konsumentów jest trudne, ponieważ różne gatunki cechują się różną specyficznością żywicielską; nie mniej obydwie gatunki *Ascaris* są inwazyjne dla człowieka.

6. Wykrycie po raz pierwszy spor *E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* i *E. hellem* w próbach żywności pochodzenia roślinnego świadczy o tym, że żywność może być przyczyną zarażenia i stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi.

7. PIŚMIENICTWO

1. Abougrain, A. K., Nahaisi, M. H., Madi, N. S., Saied, M. M., Ghenghesh, K. S.: Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. *Food Contr.*, 21, 760-762, 2010.
2. Abreu-Acosta N., Lorenzo-Morales J., Leal-Guio Y., Coronado-Alvares N., Foronda P., Alcoba-Florez J., Izquierdo F., Batista-Diaz N., del Aguila C., Valladares B.: *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 99, 848-855, 2005.
3. Alli J.A., Abolade G.O., Kolade A.F., Salako A.O., Mgbakor C.J., Ogundele M.T., Oyewo A.J. and Agboola M.O.: Prevalence of Intestinal Parasites on Fruits Available in Ibadan Markets, Oyo State, Nigeria *Acta Parasitol. Glob.*, 2, 6-10, 2011.
4. Al-Megrin W. A. I.: Prevalence of intestinal parasites in leafy vegetables in Riyadh, Saudi Arabia. *Int. J. Zool. Res.*, 6, 190-195, 2010.
5. Amahmid O., Asmama S., Bouhoum K.: The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination level of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. *Int. J. Food Microbiol.* 49, 19-26, 1999.
6. Amoah P., Drechsel P., Abaidoo R. C., Ntow W. J.: Pesticide and Pathogen Contamination of Vegetables in Ghana's Urban Markets. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 50,1-6, 2006.
7. Amorós I, Alonso J.L, Cuesta G.: *Cryptosporidium* oocysts and giardia cysts on salad products irrigated with contaminated water. *J. Food Prot.*, 73, 1138-1140, 2010.
8. Andoh L. A., Abaidoo R.C., Obiri-Danso K., Drechsel P., Kondrasen F., Klank L.T.: Helminth contamination of lettuce and associated risk factors at production sites, markets and street food vendor points in urban and peri-urban Kumasi, Ghana. *Res J Microbiol*, 4, 13-22, 2009.
9. Anonim: Basic Laboratory methods in medical *Parasitology*. WHO, Geneva, 18, 1991.
10. Anonim: *Cryptosporidium* outbreak in British Columbia. *Cryptosporidium* Capsule 1, 1-3. 1996.
11. Anonim: *Cryptosporidium* and water: a public health handbook. Atlanta, Georgia: Working Group on Waterborne Cryptosporidiosis, 1997.
12. Avcioglu H., Soykan E, Tarakci U.: Control of Helminth Contamination of Raw Vegetables by Washing. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 11, 189-191, 2011.
13. Bajer A.: *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitol Res.*, 104, 1-17, 2008.
14. Bellamy R.J. i Freedman A.R.: Bioterrorism, *QJM* 94, 227-234, 2001.
15. Bethony J., Brooker S., Albonico M.: Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*, 367, 1521-1532, 2006.
16. Bier J. W.: Isolation of parasites on fruits and vegetables, *South East Asian J Tropic Medic. Public Health*, 22 Supplement 144-145, 1990.
17. Black S. S., Steinhort L. A., Bertucci L. B., Rogers L. B., Didier E. S.: *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet. Patho*, 34, 189-198, 1997.
18. Blackburn B.G., Mazurek J.M., Hlavsa M., Park J., Tillapaw M., Parrish M., Salehi E., Franks W., Koch E., Smith F., Xiao L., Arrowood M., Hill V., da Silva A., Johnston S., Jones J.L.: Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 684-686, 2006.
19. Bornay-Llinares F. J., da Silva A. J., Moura H., Schwartz D. A., Visvesvara G. S., Pieniazek N. J., Cruz-López A., Hernández-Jaúregui P., Guerrero J., Enriquez F. J.: Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J. Infect. Dis.*, 178, 820-826, 1998.

20. Bouchet F., Baffier D., Girard M., Morel P., Paicheler J. C., David F. : Paléoparasitologie en contexte pléistocène: première observation à la Grande Grotte d'Arcy-sur-Cure (Yonne), France. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 319, 147-151, 1996.
21. Brandoniso O, Maggi P.: Prevalence of Cryptosporidiosis in HIV-infected patients with diarrhea illness. *Eur J Epidemiol.*; 9, 190-194, 1993.
22. Caccio S., Thompson A., McLauchlin J., Smith H. V.: Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasit.*, 21, 430-437, 2005.
23. Cali A., Kotler D. P., Orenstein J. M.: *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J. Protozool.*, 40, 101-112, 1993.
24. Calvo M., Carazo M. L. Arias C. Chaves R. Monge and Chinchilla M.: Prevalence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica. *Arch. Latinoam. Nutr.* 54: 428-432, 2004.
25. Cavalier-Smith T.: Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European J. Protist.*, 39, 338-348, 2003.
26. Choudhary M.M., Metcalfe M.G., Arrambide K., Bern C., Visvesvara G.S., Pieniazek N.J.: Tubulinosema sp. microsporidian myositis in immunosuppressed patient. *Emerg. Infect. Dis.*, 17, 27-30, 2011.
27. Casey M.J.: *Cryptosporidium* and bovine cryptosporidiosis: A review *Ir. Vet. J.*, 44, 2-7, 1991.
28. Conroy D.A.: A note on the occurrence of *Giardia* sp. in a Christmas pudding. *Rev. Iber. Parasitol.* 20, 567-571, 1960.
29. Cook G. C. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* infection: current diagnostic strategies. *Parasite*, 2, 107-112, 1995.
30. Cook N., Paton C.A., Wilkinson N., Nichols R.A.B., Barker K., Smith H.V.: Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1. Development and optimization of methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 109, 215-221, 2006.
31. Cotte L., Rabodonirina M., Chapuis F., Bailly F., Bissuel F., Raynal C., Gelas P., Persat F., Piens M. A., Treppo C.: Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, 180, 2003-2008, 1999.
32. Croppo G. P., Visvesvara G. S., Leitch G. J., Wallace S., Schwartz D. A.: Identification of the microsporidian *Encephalitozoon hellem* using immunoglobulin G monoclonal antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 122, 182-186, 1998.
33. Daryani A., Etehad G. H., Sharif M., Ghorbani L. i Ziaei H.: Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed in Ardabil, Iran. *Food Contr.*, 19, 790 e794, 2008.
34. Dascomb K., Frazer R., Clark R. A., Kissinger P., Didier E. S.: Microsporidiosis and HIV. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 24, 290-292, 2000.
35. Dawson D.: Foodborne protozoan parasites. *Int. J. Food Microbiol.*, 103, 207- 227, 2005.
36. Decraene V., Lebbad M., Botero-Kleiven S. , Gustawsson A-M. and M. Löfdahl.: First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, . *Epidemiol. Infect.* 140, 519-527, 2012.
37. del Aguila C. Lopez-Velez R., Fenoy S., Turrientes C., Cobo J., Navajas R., Visvesvara G. S., Croppo G. P., Da Silva A. J., Pieniazek N. J.; Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2 year history of intestinal microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 1862-1866, 1997.
38. del Aguila C., Izquierdo F., Haro M., Bernardo R., Rueda C., Andres I., Alonso F., Ponce F., Fenoy S., Henriques N.: Zoonotic potential of microsporidiosis in Spain. W: *Programme and*

Abstracts; Emergent Pathogens in the 21st Century, First United Workshop on Microsporidia from Invertebrate and Vertebrate Hosts, České Budejovice, July 12-15, 2004, 26, 2004.

39. Delis SG, Tector T, Kato N, Mittal D: Diagnosis and treatment of *Cryptosporidium* infection in intestinal transplant recipients. *Transplant. Proce.* 34, 951–952, 2002.
40. Deplazes P., Mathis A., Baumgartner R., Tanner I., Weber R.: Immunologic and molecular characterization of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clin. Infect. Dis.*, 22, 557-559, 1996.
41. Didier E. S., Didier P. J., Friedberg D. N., Stenson S. M., Orenstein J. M., Yee R. W., Tio F. O., Davis R. M., Vossbrinck C., Millichamp N., Shadduck J. A.: Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.) from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.*, 163, 617-621, 1991.
42. Didier E. S., Orenstein J. M., Aldras A., Bertucci D., Rogers L. B., Janney F. A.: Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 3138-3145, 1995.
43. Didier E. S., Visvesvara G. S., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., De Groote M. A., Vossbrinck C. R.: A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2835-2837, 1996.
44. Didier E. S., Stoval M. E., Green L. C., Brindley P. J., Sestak K., Didier P. J.: Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.*, 126, 145-166, 2004.
45. Didier E. S.: Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.*, 94, 61-76, 2005.
46. Didier E. S. i Weiss L. M.: Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 19, 485-492, 2006.
47. Dold C., Holland C. V.: *Ascaris* and ascariasis. *Microbes and Infection* doi: 10.1016/j.micinf.2010.09.012, 2010.
48. Dorny P., Praet N., Deckers N., Gabriel S.: Emerging food-borne parasites. *Vet. Parasito.*, 163, 196-206, 2009.
49. DuPont H., Chappell C, Sterling C, Okhuysen P, Rose J, Jakubowski W.: The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.*, 332, 855–859, 1995.
50. Dyńska E., Płaneta-Małecka I., Czkwianianc E.: Evaluation of selected clinical parameters, serological and immunological, in *Ascaris lumbricoides* infection in children before and after treatment. *Pediatrica Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 13, 209-212, 2011.
51. Einstein L., Bodager D., Ginzl D.: Outbreak of giardiasis and cryptosporidiosis associated with a neighborhood interactive water fountain –Florida, 2006. *J. Environ. Health*, 71, 18-22, 2008.
52. Erdoğan O. R., & Sener, H.: The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolytica* cysts and *Giardia lamblia* cysts. *Food Control*, 16, 557–560, 2005.
53. Erlandsen S. L., Bemrick W. J.: SEM evidence for a new species, *G. psittaci*. *J. Parasitol.*, 73, 623-629, 1987.
54. Erlandsen S. L., Bemrick W. J., Wells C. I., D. E. Feely, Knudson L., Campbell S. R., van Keulen H., Jaroll E. L.: Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J. Parasitol.*, 76, 717–724, 1990.

55. Fallah A. A., Pirali-Kheirabadi K., Shirvani F., Saei-Dehkordi S.: Prevalence of parasitic contamination in vegetables used for raw consumption in Shahrekord, Iran: Influence of season and washing procedure. *Food Control*, 25, 617e620, 2012.
56. Fayer R., Speer C. A., Dubey J. P.: General biology of *Cryptosporidium*. W: *Cryptosporidiosis in Man and Animals*. (red. J. P. Dubey, C. A. Speer, R. Fayer), CRC Press, Boca Raton, Floryda, 1, 1990.
57. Fayer R.: *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol.*, 126, 37–56, 2004.
58. Fayer R.: Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.*, 124, 90-97, 2010.
59. Feltus D.C., Giddings C. W., Schneck L. B., Monson T., Warshauer D., McEvoy J. M.: Evidence Supporting Zoonotic Transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol* 44, 4303–4308, 2006.
60. Feely D. L.: Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *J. Protozool.*, 35, 52-54, 1988.
61. Feng Y., Xiao L.: Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 24, 110-140, 2011.
62. Filice F. P.: Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *University of California Publication in Zoology*, 57, 53-145, 1952.
63. Foley S. L., Grant K.: Molecular techniques of detection and discrimination of foodborne pathogens and their toxins. W: *Infectious diseases: foodborne diseases*. Ed. Simjee S., Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA, 485-510, 2007.
64. Franzen C., Kuppers R., Müller A., Salzberger B., Fatkenheuer G., Vetten B., Diehl V., Schrappe M.: Genetic evidence for latent *Septata intestinalis* infection in human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. *J. Infect. Dis.*, 173, 1038-1040, 1996.
65. Gamboa-Dominguez A., De Anda J., Donis J., Ruiz-Maza F., Visvesvar G. S., Diliz H.: disseminated *Encephalitozoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation*, 75, 1898-1900, 2003.
66. Garcia L. S.: Diagnostic Medical Parasitology. ASM Press, Washington, D.C., Fourth ed., 759-764, 2001.
67. Garcia L. S.: Laboratory identification of the microsporidia. *J. Clin. Microbiol*, 40, 1892-1901, 2002.
68. Gelletlie R., Stuart J., Soltanpoor N., Armstrong R. and Nichols G.: Cryptosporidiosis associated with school milk. *Lancet* 350, 1005-1006, 1997.
69. Gharavi M.J., Jahani M.R., Rokni M.B.: Parasitic Contamination of Vegetables from Farms and Markets in Tehran. *Iranian J. Publ. Health.*, 31, 83-86, 2002.
70. Graczyk T., Cranfield M., Fayer R., Anderson M.S., Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3234–3237, 1996.
71. Graczyk T. K., Bosco-Nizeyi J., da Silva A. J., Moura I. N. S., Pieniazek N. J., Cranfield M. R., Lindquist H. D. A.: A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sparing their habitats in Uganda. *Parasitol. Res.*, 88, 926-931, 2002.
72. Graczyk T. K., Kacprzak M., Neczaj E., Tamang L., Graczyk H., Lucy F. E., Girouard A. S.: Human-virulent microsporidian spores in solid waste landfill leachate and sewage sludge, and effects of sanitization treatments on their inactivation. *Parasitol. Res.*, 101, 569-575, 2007a.

73. Graczyk T. K., Sunderland D., Rule A. M., da Silva A. J., Moura I. N. S., Tamang L., Girouard A. S., Schwab K. J., Breyse P. N., Urban feral pigeons (*Columbia livia*) as a source for air-and-waterborne contamination with *Enterocytozoon bieneusi* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4357-4358. 2007b.
74. Graczyk T. K., Majewska, A. C., Schwab K. J., The role of aquatic birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends in Parasitology*, 24, 55-59, 2008.
75. Gupta N., Khan D K., Santra S C., Prevalence of intestinal helminth eggs on vegetables grown in wastewater-irrigated areas of Titagarh, West Bengal, India. *Food Control.*, 10, 942-945, 2008.
76. Haro M., Izquierdo F., Henriques-Gil N., Andres I., Alonso F., Fenoy S., del Aguila C.: First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3153–3157, 2005.
77. Harper C.M., Cowell N.A., Adams B.C., Langley A.J., Wohlsen T.D.: Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Commun. Dis. Intell.* 26, 449–500, 2002.
78. Herwaldt B.L.: *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clin. Infect. Dis.* 31, 1040– 1057, 2000.
79. Hester J. D., Lindquist H. D. A., Bobst A. M., Schaefer F. W.: Fluorescent in situ detection of *Encephalitozoon hellem* spores with a 6-carboxyfluorescein-labeled ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probe. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47, 299-308, 2000.
80. Hirt R. P., Logsdon Jr J. M., Healy B., Dorey M. W., Doolittle W. F., Embley T. M.: Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 580-585, 1999.
81. Inatomi Y, Murakami T, Tokunaga M, Ishiwata K, Nawa Y, Uchino M. Encephalopathy caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum*. *J Neurol Sci.* 164, 195-199, 1999.
82. Insulander, M., de Jong B., Svenungsson B.: A food-borne outbreak of Cryptosporidiosis among guests and staff at a hotel restaurant in Stockholm county, Sweden, September 2008. *Euro Surveill.* 13, 51, Article 6. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19071>, 2008.
83. Izquierdo F., Castro Hermida J. A., Fenoy S., Mezo M., Gonzáles-Warleta M., del Aquila C.: Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Res.*, 45, 4837-4843, 2011.
84. Izumikawa K, Kohno Y, Izumikawa K, Hara K, Hayashi H, Maruyama H, Kohno S. Eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans possibly caused by *Ascaris suum*: a case report and review of recent literatures., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 428-32, 2011.
85. Jedrzejewski Sz., Graczyk T. K., Slodkiewicz-Kowalska A., Tamang L., Majewska A. C.: Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4071-4073, 2007.
86. Johnson H.G., Stout B.K.: Activity of a novel hydroquinone inhibitor of leukotriene synthesis (U-66,858) in the rhesus monkey *Ascaris* reactor. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 87, 204-207, 1988.
87. Karabiber N., Aktas F., Foodborne giardiasis. *Lancet*, 377, 376–377, 1991.
88. Karanis P., Kourenti Ch., Smith H.: Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health*, 5, 1-38, 2007.
89. Kasprzak W., Rauhut W., Mazur T.: Przenoszenie cyst *Giardia*. Owoce i jarzyny jako źródło inwazji. *Wiad. Parazytol.* 27, 566-571, 1981.

90. Kniel K.E., Sumner S.S., Lindsay D.S., Hackney C.R., Pierson M.D., Zajac A.M., Golden D.A., Fayer R.: Effect of organic acids and hydrogen peroxide on *Cryptosporidium parvum* viability in fruit juices. *J. of Food Prot.*, 66, 1650–1657, 2003.
91. Kozan E., Gonenc B., Sarimehmetoglu O., & Aycicek H.: Prevalence of helminth eggs on raw vegetables used for salads. *Food Control*, 16, 239–242, 2005.
92. Koudela J., Nohýnková E.: Flagellates of the human intestine and intestines of other species. W: *Parasitic Protozoa*, Academic Press, NY, II, 1-138, 1978.
93. Kudela B., Kucerova S., Hudcovic T. Effect of low and high temperature on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitol. (Praha)*, 46, 171-174, 1999.
94. Lal A., Hales S., French N., Baker M. G.: Sesonality of human enteric disease: a systematic review. *PLOS ONE* 7 (4): e31883. doi:10.1371/journal.pone.0031883, 2012.
95. Latib M. A., Pascoe M. D., Duffield M. S., Kahn D.: Microsporidiosis in the graft of a renal transplant recipient. *Transpl. Int.*, 14, 274-277, 2001.
96. Lee J. H.: Prevalence and molecular characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle in Korea. *Parasitol. Res.*, 101, 391-396, 2007.
97. Li X., Palmer R., Trout J. M., Fayer R. Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.*, 89, 185-188, 2003.
98. Lippert U., Schottelius J., Manegold C.: Disseminated microsporidiosis (*Encephalitozoon intestinalis*) in a patient with HIV infection. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 128, 1769-1772, 2003.
99. Macarisin D., Bauchan G., and Fayer R.: Spinacia oleracea L. Leaf Stomata Harboring *Cryptosporidium parvum* Oocysts: a Potential Threat to Food Safety. *Appl. Environ. Microbiol.*, 555–559, 2010.
100. MacKenzie W., Hoxie N., Proctor M., Gradus M., Blari K., Peterson D., Kazmierczak J. and Davis, J.: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Eng. J. Med.*, 331,161-167, 1994.
101. Majewska A.C., Kasprzak W., Werner A. Prevalence of intestinal amoebae and flagellates in animals of the Zoological Garden in Poznań. *Wiad. Parazytol.* 44, 469, 1998.
102. Majewska A, Kasprzak W., Werner A., Kozakiewicz B.: Investigations on cryptosporidiosis in humans and live– stock from the same localites. *Acta Parasitol.*, 44, 211–214, 1999.
103. Majewska A.C., Kasprzak W.: New axenic isolates of *Giardia* from primates. *Acta Parasitol.*, 45,55–56, 2000.
104. Majewska A. C., Graczyk T. K., Słodkowicz-Kowalska A., Tamang L., Jędrzejewski Sz., Zduniak P., Solarczyk P., Nowosad A., Nowosad P.: The role of free-ranging, captive, and domestic birds of Western Poland in environmental contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Parasitol. Res.*, 104, 1093-1099, 2009.
105. Mansfield K. G., Carville A., Shvetz D., MacKey J., Tzipori S., Lackner A. A.: Identification of an *Enterocytozoon bieneusi*-like microsporidian parasite in simian-immunodeficiency-virus-inoculated macaques with hepatobiliary disease. *Am. J. Pathol.*, 150, 1395–1405, 1997.
106. Maruyama H, Nawa Y, Noda S, Mimori T. An outbreak of ascariasis with marked eosinophilia in the southern part of Kyushu District, Japan, caused by infection with swine ascaris. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 28, 194-196, 1997.
107. Mathis A., Michel M., Kuster H., Muller C., R. Weber, Deplazes P.: Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology*, 114, 29-35, 1997.
108. Mathis A., Weber R., Deplazes P.: Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18, 423–445, 2005.

109. Matsubayashi H, Koike T., Mikata T., Takei H., Hagiwaras S.: A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Arch. Pathol.*, 67, 181-187, 1959.
110. Meisel, J.L., D.R. Perera, C. Meligro and C.E. Robin. Overwhelming watery diarrhoea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterol.*, 70, 1156-1160, 1976.
111. Meyer E. A.: *Giardia* as an organism. W: *Giardia: from molecules to diseases*. Ed. Thompson R. C. A., Reynoldson J. A., Lymbery A. J., CAB International, Walingford. UK, 3-14, 1994.
112. Millard P.S., Gensheimer K.F., Addiss D.G., Sosin D.M., Beckett G.A., Houck-Janoski A., Hudson A.: An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *J. Am. Med. Associat.*, 272, 592– 1596, 1994.
113. Mintz E.D., Hudson-Wragg M., Mshar P., Cartter M.L., Hadler J.L.: Foodborne giardiasis in a corporate office setting. *J. Infect. Dis.*, 167 , 250- 253, 1993.
114. Mizgajska H.: The distribution and survival of eggs of *Ascaris suum* in six different natural soil profiles. *Acta Parasitol.*, 4, 170-174, 1993.
115. Mohindra A., Lee M.W., Visvesvara G., Moura H., Parasuraman R, Leitch G.J., Xiao L., Yee J., Del Busto R.: Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. *Trans. Inf Dis.*, 4, 102–107, 2002.
116. Monge R., Chinchilla M.: Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. *J. Food. Prot.*, 59, 202– 203, 1996.
117. Mungthin M., Suwannasaeng R., Naaglor T., Areekul W., Leelayoova S.: Asymptomatic intestinal microsporidiosis in Thai orphans and child-care workers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 95, 304-306, 2001.
118. Müller M.G., Kinne J., Schuster R. K., Walochnik J.: Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bieneusi* in falcons. *Vet. Parasitology*, w druku, dostępna online, 2008.
119. Nägeli K.: Über die neue Krankheit die Seidenraupe unde verwandet Organismen. *Bot. Zeitung*, 15, 760-761, 1857.
120. Neil M. A., Rice S. K., Ahmad N. V., Flanigan T. P.: Cryptosporidiosis: an unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients. *Clin. Infect. Dis.*, 22, 168-170, 1996.
121. Nejsum P., Parker Jr. E. D., Frydenberg J., Roepstorff A., Boes J., Haque R., Astrup I., Prag A. J. and Skov Sørensen U. B.: Ascariasis Is a Zoonosis in Denmark *J. Clin. Microbiol.*, 43(3), 2005.
122. Nichols R.A.B., Campbell B., Smith H. V.: Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* species oocysts isolated during water monitoring. *App. Environ. Microbiol.*, 72, 5428–5435, 2006.
123. Nime F. A., Burek J. D., Page D. L., Holscher M. A. and Yardley, J. H.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 592–598, 1976.
124. Nimmo J. S., Snowden K., Donoghue P.: Fatal encephalitozoonosis in two koalas. *Aust. Vet. J.*, 85, 428-432, 2007.
125. O'Connor R.M., Mackay M.R., Ward H.D.: Molecular approaches for detection, species identification, and genotyping of *Cryptosporidium*. In: Persing DH (ed) *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice*. ASM Press, Washington, USA O'Donoghue PJ: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.*, 25, 139–195, 1995, 2004.
126. Okhuysen P.C., Chappell C.L., Crab J.H., Sterling S.R., Du Pont H.L., Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.*, 180, 1275–1281, 1999.

127. Omura M., Furuya K., Kudo S., Sugiura W., Azuma H.: Detecting immunoglobulin M antibodies against microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tubes in sera from healthy and human immunodeficiency virus-infected persons in Japan. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14, 168-172, 2007.
128. Orlandi P.A., Chu D. T., Bier J. W., Jackson G. J.: Parasites and the food supply. *Food Technol.*, 56, 72-81, 2002.
129. Ortega Y.R., Roxas C.R., Gilman R.H., Miller N.J., Cabrera L., Taquiri C., Sterling C.R.: Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 57, 683-686, 1997.
130. Osterholm M.T., Forfang J.C., Ristinen T.L., Dean A.G., Washburn J.W., Godes, J.R., Rude, R.A., McCullough, J.G.: An outbreak of foodborne giardiasis. *N. Engl. J. Med.*, 304, 24-28, 1981.
131. Quick, R., Paugh, K., Addiss, D., Kobayashi, J., Baron, R.: Restaurant associated outbreak of giardiasis. *J. Infect. Dis.* 166, 673-676, 1992.
132. Quiroz E., Bern C., MacArthur J.R., Xiao L., Fletcher M., Arrowood M.J., Shay D.K., Levy M.E., Glass R.I., Lal A.: An Outbreak of Cryptosporidiosis Linked to a Foodhandler. *J. Infect. Dis.*, 181, 695-700, 2000.
133. Panciera R. J., Thomassen R. W., Garner F. M.: Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.*, 8, 479-484, 1971.
134. Paton C.A., Kelsey D.E., Reeve E.A., Punter K., Crabb J.H., Smith H.V., Immunomagnetsable separation for the recovery of *Cryptosporidium* sp. oocysts. In: Clark, S.A., Thompson, K.C., Keevil, C.W., Smith, M.S. (Eds.), Rapid detection assays for food and water. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 38-43, 2001.
135. Petersen L.R., Cartter M.L., Hadler J.L., A food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.*, 157, 846-848, 1988.
136. Phills J.A., Harrold A.J., Whiteman G.V., Perelmutter L.: Pulmonary infiltrates, asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. *N Engl J Med.*; 286, 965-970, 1972.
137. Plutzer J., Ongreth J., karanis P.: *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 213, 321-333, 2010.
138. Pol S., Romana C., Richard S., Carnot F., Dumont J. L., Bouche H., Pialox G., Stern M., Pays J. F., Bertelot P.: *Enterocytozoon bienersi* in aquired immunodeficiency syndrome related-sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 102, 1778-1781, 1992.
139. Porter J.D., Gaffney C., Heymann D., Parkin W.: Foodborne outbreak of *Giardia lamblia*. *Am. J. Pub. Health.*, 80, 1259- 1260, 1990.
140. Rai A. K., Chakravorty C. R., Jaishree P.: Detection of *Giardia*, *Entamoeba*, and *Cryptosporidium* in unprocessed food items from northern India. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 2879-2887, 2008.
141. Räisänen S., Ruuskanen L., Nyman S.: Epidemic ascariasis – evidence of transmission by imported vegetables. *Scand. J. Prim. Health Care*, 3, 189-191, 1985.
142. Roberts L. S., Janovy J.: Foundations of parasitology. Ed. Kemp M. J., WCB Publisher, Dubuque, IA, USA, 419-423, 1996.
143. Robertson L.J, Gjerde B.: Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. *J. Food Prot.*, 63, 775-778, 2000.
144. Robertson L.J., Gjerde B., Occurence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *J. Food Prot.*, 64, 1793-1798, 2001a.

145. Robertson L.J., Gjerde B.: Factors affecting recovery efficiency in isolation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from vegetables for standard method development. *J. Food Prot.*, 64, pp. 1799–1805, 2001b.
146. Rzeżutka A., Nichols R.A.B., Connelly L., Kaupke A., Kozyra I., Cook N., Birrell S., Smit H.V.: *Cryptosporidium* oocysts on fresh produce from areas of high livestock production in Poland. *Int. J. Food Microbiol.*, 139, 96–101, 2010.
147. Sakakibara A., Baba K., Niwa S., Yagi T., Wakayama H., Yoshida K., Kobayashi T., Yokoi T., Hara K., Itoh M., Kimura E.: Visceral larva migrans due to *Ascaris suum* which presented with eosinophilic pneumonia and multiple intra-hepatic lesions with severe eosinophil infiltration-outbreak in a Japanese area other than Kyushu. *Intern. Med.*; 41, 574-579, 2002.
148. Sarfati C., Bourgeois A., Menotti J., Liegeois F., Moyou-Somo R., Delaporte E., Derouin F., Ngole E. M., Molina J.: Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74, 162-164, 2006.
149. Scaglia M., Bandi C., Novati S., Gatti S., Bernuzzi A. M., Corona S., Sacchi L.: Respiratory microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: the first case report in an immunocompetent subject. *Parasitol. Int.*, 47, 203, 1998.
150. Schwartz D. A., Sobottka I., Leitch G. J., Cali A., Visvesvara G. S.: Pathology of microsporidiosis. Emerging parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 120, 173-188, 1996.
151. Shields J.M., Lee M.M., Murphy H.R.: Use of a common laboratory glassware detergent improves recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis* from lettuce, herbs and raspberries. *Int. J. Food Microbiol.*, 1, 123-128, 2012.
152. Sia Su G. L., Mariano C. M. R., Matti N. S. A., Ramos G. B.: Assessing parasitic infestation of vegetables in selected markets in Metro Manila, Philippines. *Asian Pacific J. Tropic Disease*, 51–54, 2012.
153. Slavin D.: *Cryptosporidium meleagridis* (sp. novum). *J. Comp. Pathol.*, 65, 262-266, 1955.
154. Slifko T. R., Smith H. V., Rose J. B.: Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol*, 30, 1379-1393, 2000.
155. Słodkiewicz-Kowalska A., Graczyk T. K., Tamang L., Jędrzejewski Sz., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A. S., Majewska A. C. Microsporidia species known to infect humans are present in aquatic birds; implications for transmission via water? *Appl. Environ. Microbiol* 72, 4540-4544, 2006.
156. Słodkiewicz-Kowalska A., Graczyk T. K., Tamang L., Girouard A. S., Majewska A. C.: Asymptomatic *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in captive mammals. *Parasitol. Res.*, 100, 503-509, 2007.
157. Słodkiewicz-Kowalska A., Majewska A. C., Trzęsowska E., Skrzypczak Ł.: Occurrence of *Encephalitozoon intestinalis* in the Red ruffed lemur (*Varecia rubra*) and the Ring-tailed lemur (*Lemur catta*) housed in the Poznan Zoological Garden, Poland. *Annal. Parasitol.*, 1, 49-52, 2012.
158. Smith H.V., Brown J., Coulson J.C., Morris G.P., Girdwood R.W.A., 1993. Occurrence of *Cryptosporidium* sp. oocysts in *Larus* spp. gulls. *Epidemiol. Infect.*, 110, 135–143, 1993.
159. Smith J.L., *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. *J. Food Protect.*, 56, 451– 461, 1993.
160. Smith, H.V., Robertson, L.J., Ongerth, J.E.: Cryptosporidiosis and giardiasis: the impact of waterborne transmission. *J. Water SRT Aqua.*, 44, 258–274, 1995.

161. Smith H.V., Caccio S.M., Cook N., Nichols R.A.B., Tait A.: *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol.*, 149 29–40, 2007.
162. Smith H.V.: Diagnostics (Chapter 6) In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2nd Edition (eds. R. Fayer and L. Xiao), IWA Publishing, 2008.
163. Smith H.V., Nichols R.A.: *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Exp. Parasitol.*; 124:61-79, 2009.
164. Spano F, Crisanti A.: *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *Int. J. Parasitol.*, 30,533–565, 2000.
165. Sprong H., Cacciò S. M., van der Giessen J. W. B., on behalf of the ZOOPNET network and partners: Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *Plos Negl. Trop. Dis.*, 3, 2009.
166. Suankratay C, Thiansukhon E, Nilaratanakul V, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Disseminated infection caused by novel species of *Microsporidium*, Thailand. *Emerg Infect. Dis.*, 18:302-4. doi: 10.3201/eid1802.111319. Feb, 2012.
167. Svedhem V., Lebbad M., Hedkvist B., del Aguila C., Hedman P., Larsson R., Navajas R., Aust-Kettis A.: Disseminated infection with *Encephalitozoon intestinalis* in AIDS patients: report of 2 cases. *Scand. J. Infect. Dis.*, 34, 703-705, 2002.
168. Szlągiewicz M., Tarczyński S.: Truskawka (*Fragaria grandiflora* Duch.) Źródłem inwazji pasożytniczych u ludzi. *Wiad Parazytol.*, 15(1):63-66, 1969.
169. Tangermann R.H., Gordon S., Wiesner P., Kreckman L.: An outbreak of cryptosporidiosis in a day-care center in Georgia. *Am J Epidem* 133 (5), 471– 476, 1991.
170. Terada S., Reddy K. R., Jeffers L. J., Cali A., Schiff E. R.: Microsporidian hepatitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 107, 61-67, 1987.
171. Tyzzer E. E.: A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.*, 5, 12–13, 1907.
172. Tyzzer E. E.: An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.*, 18, 487–509, 1910.
173. Tyzzer E. E.: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkunde*, 26, 394–412, 1912.
174. Van Duyn M.A, Pivonka E.: Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. *J Am Diet Assoc.*: 100, 1511-1521, 2000.
175. Vavra J., Chalupsky J.: Fluorescence staining of microsporidian spores with the brightener Calcofluor White M2R. *J. Protozool.*, 29, 503, 1982.
176. Visvesvara G. S., Belloso M., Moura H., Da Silva A. J., Moura I. N., Leitch G. J., Schwartz A. A., Chevez-Barrios P., Wallace S., Pieniazek N. J., Goosey J. D.: Isolation of *Nosema algerae* from the cornea of an immunocompetent patient. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46, 10, 1999.
177. Vossbrinck C. R., Maddox J. V., Friedman S., Debrunner-Vossbrinck B. A., Woese C. R.: Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, 326, 411-414, 1987.
178. Weber R., Bryan R. T., Owen R. L., Wilcox C. M., Gorelkin L., Visvesvara G. S., The enteric opportunistic infections group: Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.*, 326, 161-166, 1992.
179. Weidner E., Canning E. U., Rutledge C. R., Meek C. L.: Mosquito (Diptera: Culicidae) host compatibility and vector competency for the human myositis parasite *Trachipleistophora hominis* (phylum microspora). *J. Med. Entomol.*, 36, 522-525, 1999.
180. Weiss L. M.: Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop.*, 78, 89-102, 2001.

181. White K.E., Hedberg C.W., Edmonson L.M., Jones D.B.W., Osterholme, M.T., MacDonald, K.L.: An outbreak of giardiasis in a nursing home with evidence for multiple modes of transmission. *J. Infect. Dis.*, 160, 298–304, 1989.
182. World Health Organization. Control of ascariasis, Report of WHO Committee, *Technical Report Series*, 379, 1-39, 1967.
183. World Health Organization. Foodborne Diseases, Emerging.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/print.html>. 2002.
184. Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J.: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 72–97, 2004.

8. STRESZCZENIE

Znaczne skażenie środowiska odchodami ludzi i zwierząt, zawierającymi stadia dyspersyjne pasożytów, stwarza realne zagrożenie zanieczyszczenia żywności. Tym bardziej, że stadia te są wydalane w olbrzymiej liczbie i są odporne na działanie wielu czynników środowiska zewnętrznego. Istnieje wiele czynników prowadzących do zanieczyszczenia produktów spożywczych, które mogą występować praktycznie na każdym etapie – od produkcji żywności aż do naszego stołu. Dotyczy to głównie produktów spożywanych na surowo i słabo przetworzonych. Produkty roślinne, ze względu na swoją strukturę i różnorodność, stanowią bardzo trudny materiał do badań, toteż stosunkowo niewiele jest prac dotyczących występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów w próbach żywności pochodzenia roślinnego oraz żywnościopochodnych epidemii.

Głównym celem tej pracy była identyfikacja pasożytów oraz określenie częstości ich występowania w próbach żywności pochodzenia roślinnego i nasionach przeznaczonych do hydroponicznej uprawy kiełków. Ponadto, dodatkowymi celami było określenie różnic: (1) w zanieczyszczeniu stadiami dyspersyjnymi pasożytów poszczególnych kategorii żywności pochodzenia roślinnego; (2) w częstości występowania stadiów dyspersyjnych poszczególnych pasożytów w badanych kategoriach żywności oraz określenie (3) korelacji między częstością występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów na żywności pochodzenia roślinnego a miejscem jej zakupu a także (4) różnic między częstością występowania stadiów dyspersyjnych pasożytów na żywności wyprodukowanej przez polskich producentów i pochodzącej z importu.

Materiał badań stanowiło 300 prób świeżej żywności pochodzenia roślinnego oraz 30 prób nasion przeznaczonych do uprawy hydroponicznej kiełków. Zakupione produkty roślinne podzielono na sześć odrębnych kategorii (sałaty, warzywa, kiełki, zioła, sałatki warzywne

i owoce). Żywność pochodzenia roślinnego zakupiono na terenie miasta Poznania; większość kupiono w 6 dużych marketach (n=183), a pozostałe w pięciu małych sklepach warzywniczych (n=72) i na dwóch miejskich targowiskach (n=45). Zdecydowana większość prób świeżej żywności pochodzenia roślinnego (n=259) została wyprodukowana przez polskich producentów. Natomiast 41 prób pochodziło z importu. Wszystkie nasiona kupiono w sklepie ze zdrową żywnością.

Do badań wykorzystywano 100 g próby żywności pochodzenia roślinnego, które po rozdrobnieniu intensywnie płukano przez 30 minut, w jednym litrze jałowego, 0.95 % roztworu soli fizjologicznej z dodatkiem 50 ml 0.01% roztworu Tween. Następnie zawiesinę przesączano przez gazę i wirowano w temperaturze 4 °C przez 30 minut przy 2000 x g. Uzyskany osad badano stosując metody mikroskopowe (świeże rozmazy w 0,6% roztworze soli fizjologicznej oraz podbarwione płynem Lugola, preparaty trwałe barwione trichromem, preparaty barwione metodą Ziehl-Neelsena i preparaty barwione chromotropem), immunologiczne (komercyjny test immunofluorescencji bezpośredniej MERIFLUOR *Cryptosporidium/Giardia*) i molekularne (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH i multiplex FISH). Do analizy statystycznej uzyskanych wyników korzystano z programu StatSoft, Inc. (2011),. STATISTICA, version 10. W celu wykazania statystycznie istotnych różnic zastosowano test zgodności chi–kwadrat (χ^2) Pearsona.

Spośród 300 zbadanych prób żywności pochodzenia roślinnego oraz 30 prób nasion, 45 prób żywności (15%) oraz dwie próby nasion (6.7%) były pozytywne na obecność stadiów dyspersyjnych pasożytów, co wskazuje, że te produkty roślinne były zanieczyszczone odchodami. Analizując występowanie stadiów dyspersyjnych pasożytów w różnych kategoriach żywności stwierdzono znaczne różnice w ich zanieczyszczeniu. Najczęściej, spory, cysty, oocysty i jaja pasożytów wykrywano na kiełkach (23.2%), sałatach (21.5%) i owocach (20%), a najrzadziej w ziołach (8.4%), sałatkach warzywnych (8.3% i warzywach (7.5%). W próbach

nasion stwierdzono obecność tylko oocyst *Cryptosporidium*. Spośród 45 prób żywności pochodzenia roślinnego, w których wykryto stadia dyspersyjne pasożytów, aż w 25 próbach (55.6%) zidentyfikowano oocysty *Cryptosporidium*, w 16 próbach (35.6%) spory mikrosporydiów, w 8 próbach (17.8%) cysty *Giardia* i w dwóch próbach jaja *Ascaris* (4.4%). Obecność stadiów dyspersyjnych dwóch pasożytów stwierdzono w sześciu próbach (13,3%).

Stwierdzono statystycznie istotne różnice w częstości występowania *Giardia*, *Cryptosporidium* i mikrosporydiów w poszczególnych kategoriach żywności.

Statystycznie istotną korelację wykazano tylko między częstością występowania spor mikrosporydiów na żywności pochodzenia roślinnego, a miejscem jej zakupu. Mikrosporydia częściej wykrywano w produktach zakupionych w sklepach warzywniczych i na targowiskach niż w marketach. W tych badaniach nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zanieczyszczeniu pasożytami żywności pochodzenia roślinnego wyprodukowanej w kraju i pochodzącej z importu.

W zbadanych łącznie 330 próbach żywności i nasion, oocysty *Cryptosporidium* stwierdzono w 27 próbach, w tym w 25 próbach żywności (8,3%) i w dwóch próbach nasion (6,7%). Oocysty wykryto w próbach kiełków (21.4%), sałat (10.7%), ziół (6%), owoców (2.5%) i warzyw (1.9%).

W preparatach barwionych chromotropem obecność spor mikrosporydiów stwierdzono w 16 próbach (5,3%). Przy wykorzystaniu techniki FISH i multiplex FISH zidentyfikowano spory czterech gatunków mikrosporydiów inwazyjnych dla człowieka; w 10 próbach stwierdzono spory *E. bienersi* (3,3%), w trzech próbach spory *E. intestinalis* (1%), w dwóch spory *E. cuniculi* (0.7 %), a spory *E. hellem* zidentyfikowano tylko w jednej próbce sałatki wielowarzywnej (0,3%). Po raz pierwszy wykryto spory *E. bienersi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* i *E. hellem* w próbach żywności pochodzenia roślinnego, co świadczy o tym, że żywność może być źródłem zarażenia i stanowić zagrożenie zdrowia publicznego.

Cysty *Giardia* stwierdzono w ośmiu badanych próbach (2,7%) żywności pochodzenia roślinnego. Zazwyczaj wykrywano pojedyncze cysty pasożyta w czterech próbach sałat, trzech próbach owoców oraz jednej próbie oregano.

Obecność pojedynczych jaj *Ascaris* stwierdzono tylko w dwóch próbach ziół - w oregano i w rozmarynie. Wielkość jaj odpowiadała wielkości zapłodnionych jaj *Ascaris*. W tych badaniach nie zidentyfikowano gatunku *Ascaris*, ponieważ jaja obu gatunków tego nicienia są morfologicznie identyczne. Jednakże, że nie tylko *A. lumbricoides* wywołuje inwazję u ludzi, ale znane są także przypadki zarażenia ludzi *A. suum*, a nawet wykazano, że glistnica u ludzi w Danii ma charakter zoonotyczny.

Chociaż w ostatnich latach dokonano znacznego postępu w wykrywaniu i identyfikowaniu pasożytów zanieczyszczających żywność, to jednak znamy tylko wierzchołek góry lodowej, który nie odzwierciedla rzeczywistości. Uważa się również, że opisywane żywnościopochodne epidemie stanowią tylko niewielką część faktycznych przypadków. Zatem jeszcze wiele pozostaje do zrobienia zanim dogłębnie poznamy rolę wody i żywności w transmisji pasożytów.