

## 크립토스포리디움 활성 및 감염성 판정을 위한 direct RT-PCR, cell culture RT-PCR 및 cell culture IFA의 비교

박상정<sup>1,3</sup> · 유재란<sup>2</sup> · 김종민<sup>1</sup> · 임연택<sup>1</sup> · 진익렬<sup>3\*\*</sup> · 정현미<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국립환경과학원, <sup>2</sup>건국대학교 의과대학 기생충학교실, <sup>3</sup>경북대학교 미생물학과

Received March 29, 2006 / Accepted May 30, 2006

**Comparison of Direct RT-PCR, Cell Culture RT-PCR and Cell Culture IFA for Viability and Infectivity Assay of *Cryptosporidium*.** Sangjung Park<sup>1,3</sup>, Jaeran Yu<sup>2</sup>, Jongmin Kim<sup>1</sup>, Yeontaek Rim<sup>1</sup>, Ingyol Jin<sup>3\*\*</sup> and Hyenmi Chung<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>National Institute of Environmental Research, <sup>2</sup>Konkuk University, <sup>3</sup>Kyungpook national University - *Cryptosporidium* is a waterborne pathogenic parasite which causes diarrhea. Immunomagnetic separation-immunofluorescent assay (IMS-IFA) has been a widely adopted for *Cryptosporidium* detection as standard method. However, this method does not provide information about viability or infectivity of *Cryptosporidium*. Therefore, many researchers have studied viability or infectivity analyses of *Cryptosporidium* with various methods such as vital staining, in vitro excystation, RT-PCR, cell culture, and mouse infection assay. In this study, two direct RT-PCR methods, cell culture RT-PCR and cell culture IFA were compared for sensitivity and other characteristics. The results showed that direct RT-PCR method with HSP70 genes had the highest sensitivity with detection up to 1 viable cell of *Cryptosporidium*. The infectious *Cryptosporidium* were detected up to 10 to 25 cells by cell culture methods in combination with RT-PCR and IFA. The infectious *Cryptosporidium* were apt to be quantified by cell culture IFA.

**Key words** - *Cryptosporidium*, direct RT-PCR, cell culture RT-PCR, cell culture IFA, viability, infectivity

### 서 론

크립토스포리디움은 사람에게 장염 등을 일으키는 수인성 병원성 기생충으로[3], 현재 환경시료에서 원생동물을 분석하는 방법으로는 EPA 1623 method[4]에 의한 면역형광분석법을 가장 널리 사용하고 있다. 그러나 이 방법은 크립토스포리디움 단일항체를 이용한 세포벽 형광염색(Fluorescein isothiocyanate, FITC), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)에 의한 핵염색, 그리고 DIC (Differential interference contrast)를 이용하여, 내부구조를 확인하는 방법으로, 활성 또는 감염성에 대한 정보는 얻을 수 없는 단점이 있다. 따라서 크립토스포리디움의 활성 또는 감염성을 분석하기 위한 다양한 방법이 제시, 연구되어 왔다[1,2,6,9]. 이러한 방법들 중 활성판별법으로는 vital dye staining, in vitro excystation, direct RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) 등이 있는데, 이들 방법으로는 세포의 생사에 대한 정보만 줄 뿐 사람에게 감염성을 가지는지는 알 수가 없다.

크립토스포리디움의 감염성 판별법으로는 세포배양법, 동물세포감염법등이 있다. 감염성 판별법의 대표적인 방법은

마우스 등에 크립토스포리디움의 난포낭을 주입하여 감염여부를 확인하는 방법으로 개별 난포낭에 대한 감염성은 알 수 없으며, 실험하는데 비용 및 노력이 굉장히 많이 든다는 단점이 있다. 이에 대한 대안으로 HCT-8과 같은 사람의 암세포를 배양하여 여기에 크립토스포리디움의 난포낭을 감염시켜 감염성 유무를 확인한다. 이 때, 감염성 유무확인 방법에는 두 가지가 있는데, 첫 번째는 PCR 또는 RT-PCR 방법을 시도하는 것이다. 여러 보고를 통해 세포배양 후 PCR 및 RT-PCR 방법으로 감염여부를 판정한 결과와 마우스 감염 실험결과와 매우 유사하다는 것이 확인된 바 있다[5,8]. 두 번째는 세포배양 후 크립토스포리디움의 생활환(Life Cycle)과정 중에 형성되는 merozoite 및 sporozoite등에 대한 polyclonal항체와 형광염색시약이 결합된 키트를 이용하여 형광염색함으로써 감염성 유무를 확인하는 것이다.

본 연구에서는 활성판별법중의 하나인 Direct RT-PCR과 감염성 판별법인 HCT-8 세포를 이용하여 크립토스포리디움을 감염시킨 후, RT-PCR 및 면역형광염색법(Immunofluorescence Assay, IFA)으로 검출하는 방법 등의 민감도 등을 비교하여 환경시료중 크립토스포리디움 난포낭의 감염성 또는 활성을 모니터링할 때 어떤 방법이 효율적인 것인가를 알아보고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 크립토스포리디움 난포낭 준비

실험에 사용된 크립토스포리디움 난포낭은 건국대학교 의

#### \*Corresponding author

Tel : +82-32-560-7311, Fax : +82-32-560-7311

E-mail : hyenmic05@hotmail.com

#### \*Co-Corresponding author

Tel : +82-53-950-5377, Fax : +82-53-955-5522

E-mail : jinin@knu.ac.kr

과대학 기생충학교실에서 실험용 마우스(C57BL)를 이용해 계대 배양한 난포낭 및 bovine 유래의 상용화된 살아있는 크립토스포리디움을 구입하여 사용하였다. 민감도 실험을 위해 먼저 준비된 크립토스포리디움을 *in vitro* excystation 방법[2]에 의해 98% 이상의 활성을 가졌음을 확인한 후, haemocytometer를 이용하여 세포수를 측정된 다음 원하는 세포 수가 되도록 인산완충용액으로 희석하여 사용하였다.

#### RT-PCR을 위한 숙주세포배양 및 크립토스포리디움 난포낭 감염

숙주세포로는 건국대학교에서 계대배양중인 HCT-8 세포를 사용하였으며, RT-PCR실험을 위해 MEM배지에 24 mM Sodium bicarbonate, 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, 10% Fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 배지에 HCT-8 세포를 배양하였고, 숙주세포가 monolayer를 형성하면 크립토스포리디움 난포낭을 감염시켰다. 난포낭은 멸균 증류수로 3회 세척 후 10% sodium hypochlorite solution에 얼음위에서 10분간 정치 후 차가운 PBS로 3회 세척하였으며, Trypsin in acidified HBSS (0.01 M HCl in HBSS-1% trypsin)를 넣어 37°C에서 1시간 정치 후, 2% FBS를 넣은 DMEM 배지로 세척하고 HCT-8 세포에 감염시켰다.

#### IFA를 위한 숙주세포배양 및 크립토스포리디움 난포낭 감염

IFA실험을 위한 HCT-8 세포는 RPMI 1640배지에 10% FBS 및 1 mM Sodium pyruvate 및 penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 일정한 습도를 유지하면서 2~3일간 배양하였다. monolayer가 형성되면 Trypsin-EDTA 용액으로 세포를 세포배양 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 뒤 원심분리하여 8개의 well을 가진 Chamber slide system (Lab-Tek chamber slide system 177445)에 적당한 농도가 되도록 각 well에 세포를 균일하게 주입한 후 배양하였다. 여기에 적당히 희석한 크립토스포리디움 난포낭에 sodium hypochlorite solution을 첨가하고 실온에서 20분간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 제거하였으며, 여과멸균한 0.5% Trypsin (pH 2.5)를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후 상등액을 제거하고 RPMI 1640배지에 2%의 여과멸균된 FBS를 첨가한 세포유지배지를 첨가하여 Chamber slide system의 상등액을 제거 후, 각 well에 감염시켰다.

#### 세포배양후 RNA 분리

세포배양 48시간 후 MEM 배지로 3회 세척하고 상등액을 제거하였다. 감염된 세포에 Trizol reagent (Invitrogen)를 각 500 µL 씩 넣고 세포를 녹여 1.5 mL 튜브에 옮긴 후 chloroform 100 µL를 첨가하여 섞은 다음 실온에 2~3분 정치하였다. 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액을 새 튜브에

취하고 나머지는 버리고, Isopropyl alcohol 200 µL를 첨가하여 잘 섞은 다음 -20°C에서 하룻밤동안 정치하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 RNA를 모은 다음 75% ethanol로 9,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세척한 후, 상등액을 버리고 RNA pellet만 남겨 공기 중에서 말렸다. DEPC-DW를 10 µL 넣어 녹인 다음 DNaseI (Ambion) 2 U를 넣어 37°C에서 15분간 반응시키고 DNaseI activity를 없애기 위해 EDTA를 최종농도가 5 mM 되도록 넣은 후 75°C에서 10분간 반응시켰다. 이중 5 µL를 취하여 reverse transcription하고 cDNA를 만들었다. 나머지 5 µL는 DNA 오염 여부를 확인하기 위해 reverse transcription을 생략하고 바로 PCR하여 확인하였다.

#### Direct RT-PCR을 위한 Oocyst mRNA 분리

크립토스포리디움 난포낭을 InstaGene (Biorad) 50 µL에 넣고 42°C에서 30분간 반응시켰다. Lysis-binding buffer (DynaL, Oslo, Norway) 100 µL를 더하고 액체질소와 65°C를 1분씩 반복하여 5회 반응시켰다. 12,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 다음 상등액을 5 µL의 oligodT-bead (DynaL, Oslo, Norway)에 넣고 30°C에서 30분간 반응시켰다. Magnetic particle concentrator (MPC, Dynal)에 끼워 bead만 분리한 후 상등액을 버렸다. Wash buffer로 세척후 DEPC-DW 10 µL를 넣고 65°C에서 2분간 반응시켜 mRNA를 bead로부터 분리하였다. DNaseI을 앞에서 언급한 바와 같이 처리한 다음 reverse transcription하였다.

#### RT-PCR 수행

Qiagen Sensiscript RTkit를 사용하여 reverse transcription하였다. 10× RT buffer 2 µL, dNTP mix 2 µL, sensiscript reverse transcriptase 1 µL와 random hexamer 2 µL 및 RNase inhibitor 1 µL를 섞고 mRNA 5 µL를 섞은 후 RNase free water를 전체 반응용액이 20 µL가 되도록 섞고, 37°C에서 60분간 정치하였다. 만들어진 RT product를 가지고 HSP70 유전자에 대한 증폭반응을 수행하였다. HSP70의 경우 forward primer cphsp2423F 5'-AAA TGG TGA GCA ATC CTC TG-3'와 reverse primer cphsp2764R 5'-CTT GCT GCT CTT ACC AGT AC-3'를 사용하였고 361 bp의 밴드를 생성하였다[7]. β-Tubulin의 경우는 1st round PCR시 btub5 5'-GAT TGG TGC TAA ATT CTG GG-3'와 btub2 5'-GTC TGC AAA ATA CGA TCT GG-3', 2nd round PCR 시 btub3 5'-GTC ATT TCT GAT GAG CAC GG-3'와 btub6 5'-ACA GCA TCT AAG AGT TCA GCT CC-3'를 사용하였다[10]. 이때 282 bp의 밴드를 생성하였다. 1.5% agarose gel에서 ethidium bromide 염색후 생성된 밴드를 확인하였다.

PCR 반응조건은 HSP70의 경우 94°C 2분, 94°C 30초, 55°C 45초, 72°C 45초의 조건으로 40 cycle 진행한 다음 72°C 5분

동안 extension하였다. Tubulin 유전자의 경우는 nested PCR로 검출하였다. First round RT-PCR로 94°C 2분, 95°C 50초, 52°C 50초, 72°C 1분으로 30 cycle 진행한 다음 72°C 3분간 extension하였다. Second round RT-PCR에서는 annealing temperature를 57°C로 수행하였다.

음성 대조군으로 감염시키지 않은 세포, 증류수를 대상으로 한 RT product, RNA 자체 및 증류수를 사용하였으며, PCR mixture는 2.5 U of AmpliTaq, 1× PCR buffer, 0.25 μM each forward and reverse primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 200 μM dNTP를 섞어 50 μL 용량에서 실시하였다. 증폭된 산물을 agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide 염색하여 관찰하였다.

**면역형광염색**

웰슬라이드 챔버의 배양액을 파스퇴르 피펫으로 제거하고 인산완충용액을 이용, 세척 후 고순도 메탄올 챔버의 각 웰에 약 100 μL 정도 주입하여 10분간 고정시켰다. 메탄올을 제거 후, 다시 인산완충용액으로 웰을 세척하였다. 크립토스포리디움 세포분화과정중에 형성되는 merozoite 및 sporozoite 등에 대한 항체와 형광염색시약이 결합된 형광염색키트 (sporoglo×20, A600FLR, waterborne 사)로 1시간 정도 염색 후, 형광현미경으로 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

크립토스포리디움 난포낭에 열처리(heat induction)과정이 RT-PCR 민감도에 미치는 영향을 조사하기 위해 열처리한 난포낭, 열처리하지 않은 난포낭 및 열처리하여 사멸시킨 난포낭을 단계별로 희석하여 mRNA를 추출한 후, HSP70 유전자에 대한 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 열처리한 난포낭 및 열처리하지 않은 난포낭 모두 1×10<sup>0</sup> 세포수까지 361 bp의 밴드를 생성하는 것을 확인하였으나, 열처리하여 사멸시킨 난포낭에서는 밴드가 형성되지 않아 HSP70 유전자를 대상으로 한 Direct RT-PCR방법이 난포낭의 생사판별에 유용함을 알 수 있었다. 또한, 열처리한 난포낭의 경우가 열처리하지 않은 경우보다 RT-PCR 산물의 양이 훨씬 많은 것으로 나타나 민감도를 높이기 위해서는 열처리과정이 반드시 필요함을 알 수 있었다(Fig. 1).

Direct RT-PCR의 민감도 조사를 위해 크립토스포리디움 난포낭을 1×10<sup>3</sup> 세포수부터 1×10<sup>0</sup> 세포수까지 단계별 희석하여 각 개수별로 5개의 시료를 준비하고 Dynaloligo dT를 사용하여 mRNA를 추출한 다음 HSP70 gene에 대해 direct RT-PCR한 결과, 1×10<sup>3</sup>세포수의 경우 5개의 시료를 준비하여 모두 양성 DNA 밴드를 확인할 수 있었으며, 1×10<sup>2</sup>세포수의 경우에는 5개의 시료를 준비하여 4개의 양성 DNA 밴드를 확인할 수 있었다. 또 1×10<sup>1</sup>세포수의 경우에는 희미하지만

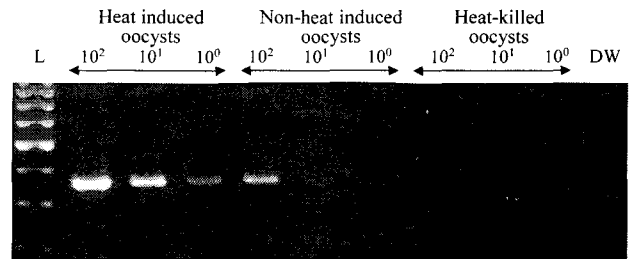


Fig. 1. Sensitivity difference between heat induced *C. parvum* oocysts and non-heat induced oocysts (L, 100 bp ladder).

3개의 양성 DNA 밴드를 확인할 수 있었으며, 1×10<sup>0</sup>세포수의 경우에도 희미하지만 2개의 양성 DNA 밴드를 확인할 수 있었다. 따라서, 난포낭 세포수가 적어질수록 재현성은 다소 감소되어지지만 1개의 난포낭까지도 검출이 가능하여 크립토스포리디움 난포낭의 활성을 조사하는데 아주 유용하게 이용될 수 있음을 보여주었다(Fig. 2). HSP70 gene에 대한 RT-PCR결과와 비교하기 위해 같은 mRNA를 가지고 β-tubulin gene에 대해 RT-nested PCR을 한 결과 1×10<sup>4</sup> 세포수 정도 되어야 검출이 되는 것으로 나타나 HSP70 gene에 대한 RT-PCR결과와 비교할 때 10,000배 이상 민감도가 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 3). 또한, nested PCR을 수행해야 함으로써 증폭시간 및 실험과정이 더 필요하게 되므로 β-tubulin gene을 대상으로 RT-nested PCR을 수행하는 것은 민감도면에서나 시간적 경제적인 면에서 효율성이 많이 떨어짐을 알 수 있었다. 따라서 RT-PCR을 수행하여 활성을 조사할 경우 HSP70 gene을 이용하는 것이 β-tubulin gene을 이용하는 것보다 훨씬 더 효과적임을 알 수 있었다.

그러나 direct RT-PCR의 경우 활성을 조사하는 데는 유용하지만 직접적으로 감염성 여부를 알 수 없는 단점이 있다. 따라서 세포배양 후 RT-PCR법과 direct RT-PCR을 비교하고자 HCT-8 세포에 크립토스포리디움 난포낭을 감염시키고 48시간 후 HSP70 gene에 대한 RT-PCR을 수행하고, 같은 batch의 난포낭을 direct RT-PCR하여 그 결과를 비교하였다.

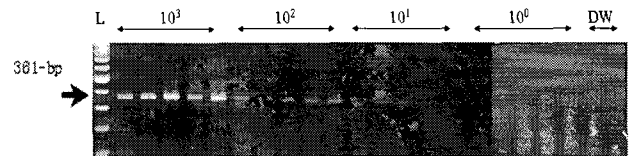


Fig. 2. Detection sensitivity of RT-PCR against HSP70 gene of *C. parvum* oocysts (L, 100 bp ladder).

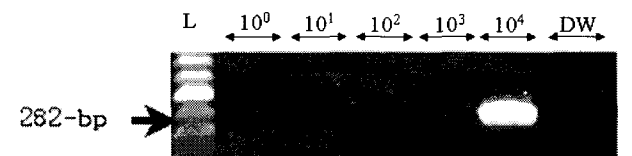


Fig. 3. RT-nested PCR result against β-tubulin gene with mRNA isolated from *C. parvum* oocysts (L, 100 bp ladder).

HCT-8 세포에서 분리한 mRNA를 각각 5 μL씩 나누어 DNaseI을 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹으로 나누었다. 그 결과, DNaseI을 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹 모두에서 1×10<sup>2</sup> 세포수 까지 양성밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4A, B). DNaseI을 처리한 그룹에서는 비특이적 밴드가 다수 감소하여 gel 확인시 보기에는 좋았으나 PCR산물의 양이 다소 줄어드는 것을 알 수 있었다(Fig. 4B). Direct RT-PCR 결과에서는 1×10개까지 검출할 수 있어 direct RT-PCR의 경우가 민감도에 있어서 10배정도 더 우수함을 나타내었다(Fig. 4C). 이는 direct RT-PCR의 경우 전처리 과정이 없어 난포낭의 손실이 없으나, 세포배양법의 경우 감염시킬 때 전처리 과정에서 난포낭의 손실이 일어나기 때문인 것으로 추정되었다.

한편, 감염성 판별법인 HCT-8 세포배양 후, RT-PCR법을 수행할 경우, 정확도가 안되는 단점이 있었다. 따라서, HCT-8 세포배양 후, 크립토스포리디움 생활환 과정 중에 형성되는 sporozoite 및 merozoite등의 항체와 형광물질을 결합시킨 형광염색시약으로 염색한 후 형광현미경으로 검정하였다. 검정시 2~6개의 형광 클러스트(cluster)를 하나의 크립토스포리디움에서 분화한 것으로 간주하여 정량하였다(Fig. 5).

이상에서 언급한 세 가지 방법인 Direct RT-PCR과 HCT-8 세포에서 난포낭을 감염시킨 후, HSP70 gene에 대한 RT-PCR 법과 면역형광염색법의 민감도를 비교하였다(Table 1). 민감도에 있어서 HSP70 gene을 대상으로 한 Direct RT-PCR의 경우 1×10<sup>0</sup>까지 검출되어 매우 민감한 방법으로 나타났으며, 세포배양 후 RT-PCR 및 면역형광염색법의 경우는 각각 1.0×10, 2.5×10의 민감도를 나타내어 유사한 결과를 나타내었다.

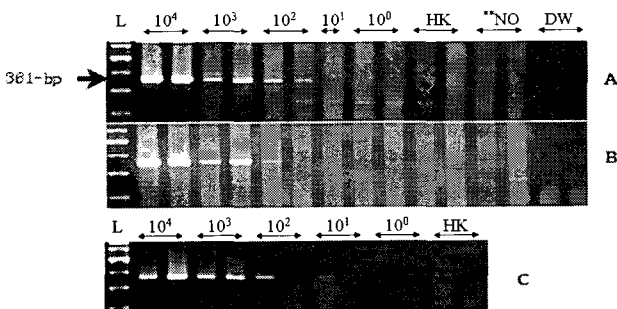


Fig. 4. RT-PCR result against HSP70 with mRNA isolated from HCT-8 cells infected with *C. parvum* oocysts (L, 100 bp ladder; \*, Heat killed oocyst; \*\*, No infection).

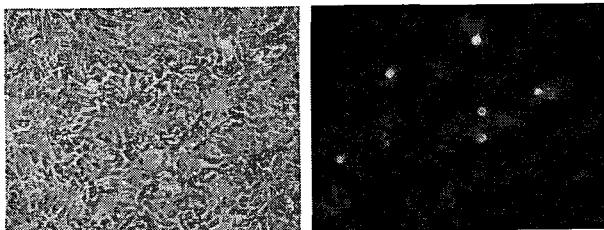


Fig. 5. HCT-8 cell as host of *Cryptosporidium* (left), cluster (right) immuno fluorescently stained.

Table 1. The comparison of the sensitivity of each method

	Direct RT-PCR against		Cell culture RT-PCR	Cell culture IFA
	HSP70 gene	β-Tubulin gene (nested)		
10,000	NT*	+	+	+
1,000	+	-	+	+
100	+	-	+	+
50	NT	NT	NT	+
25	NT	NT	NT	+
10	+	-	+	-
1	+	-	-	-

\* : not tested

Table 2. The comparison of characteristics of each method

Method	Sensitivity	Quantification	Time	Convenience	Comments
Direct RT-PCR HSP 70 gene	○	×	○	○	viability
Direct RT-PCR β-tubulin (nested)	×	×	○	○	viability
Cell culture RT-PCR	△	×	×	×	infectivity
Cell culture IFA	△	○	×	△	infectivity

○, good; △, acceptable; ×, not satisfied.

위의 결과들에서 HSP70 gene을 이용한 direct RT-PCR을 이용할 경우, 민감도가 가장 높아 저농도로 존재하는 상수원과 같은 환경시료에서 크립토스포리디움의 활성을 모니터링하는데 큰 장점이 있을 것으로 보이나, 감염성 판정에는 약하고 정량에 불리하였다. 정량화 측면에서는 Real time PCR을 사용한다면 가능해 질 수 있을 것이다. 한편, 세포배양 후 RT-PCR 또는 면역형광염색법을 이용할 경우에는 민감도가 direct RT-PCR보다 다소 떨어지는 단점이 있었으나 크립토스포리디움의 오염원이나 오염이 심한 지역의 감염성 조사에 적합할 것으로 사료된다. 단순 검출이 아닌 정량화가 필요한 경우에는 민감도도 거의 비슷하며, 정량화가 가능한 세포배양 후 면역형광염색법도 매우 효과적일 것으로 사료되었다.

## 요 약

크립토스포리디움의 활성 및 감염성 판정을 위해 Direct RT-PCR, 세포배양 후 RT-PCR 및 면역형광염색법을 비교한 결과는 다음과 같다.

1) 크립토스포리디움의 HSP70 gene에 대해 direct RT-PCR한 결과, 민감도가 매우 높아 저농도로 존재하는 환경시료에서의 크립토스포리디움 활성을 모니터링하는데 장점이 있을 것으로 보이나, 감염성의 판정은 알 수 없으며, 정량화가 안되는 단점이 있었다.

2) β-tubulin gene에 대해 RT-nested PCR을 한 결과 크립

토스포리디움의 난포낭이  $1 \times 10^4$  세포수정도 되어야 검출이 되는 것으로 나타나 HSP70 gene에 대한 RT-PCR결과와 비교할 때 10,000배 이상 민감도가 떨어지는 것으로 나타났다.

3) 세포배양 후 RT-PCR 또는 면역형광염색법을 이용할 경우에는 민감도가 direct RT-PCR보다 다소 떨어지는 단점이 있었으나 크립토스포리디움의 오염원이나 오염이 심한 지역의 감염성 조사에 적합할 것으로 나타났으나, 정량화가 필요한 경우에는 세포배양 후 면역형광염색법이 효과적일 것으로 나타났다.

### 참 고 문 헌

1. Bukhari, Z., M. M. Marshall, D. G. Korich, C. R. Fricker, H. V. Smith, J. Rosen and J. L. Clancy. 2000. Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. *Appl. Env. Microbiol.* **66**, 2972-2980.
2. Campbell, A. T., L. J. Robertson and H. V. Smith. 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: Correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl. Env. Microbiol.* **58**, 3488-3493.
3. Carey, C. M., H. Lee, J. T. Trevors. 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research* **38**, 818-862.
4. EPA. 2001. EPA 1623 Method : *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA
5. Jenkins, M., J. M. Trout, J. Higgins, M. Dorsch, D. Veal, R. Fayer. 2003. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol Res.* **89**, 1-5.
6. Michael, B. J., J. A. Lynne, D. B. Dwight, J. W. Mark and C. G. William. 1997. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Env. Microbiol.* **63**, 3844-3850.
7. Rochelle, P. A., D. M. Ferguson, T. J. Handoyo, R. D. Leon, M. H. Stewart and R. L. Wolfe. 1997. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Env. Microbiol.* **63**, 2029-2037.
8. Rochelle, P. A., M. M. Marshall, J. R. Mead, A. M. Johnson, D. G. Korich, J. S. Rosen, R. D. Leon. 2002. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Env. Microbiol.* **68**, 3809-3817.
9. Slifko, T. R., D. Friedman, J. B. Rose. 1997. An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl. Env. Microbiol.* **63**, 3669-3675.
10. Widmer, G., E. A. Orbach and S. Tzipori. 1999.  $\beta$ -Tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl. Env. Microbiol.* **65**, 1584-1588.