

Pastörizasyonun İnek Sütündeki *Cryptosporidium parvum* Canlılığı Üzerine Etkisinin Propidium Monoazide qPCR ile Araştırılması

Investigation of the Effect of Pasteurization on the Viability of *Cryptosporidium parvum* in Cow's Milk by Propidium Monoazide qPCR

Selahattin AYDEMİR¹(ID), Hisametdin DURMAZ²(ID), Mehmet Emin AYDEMİR²(ID), Serap KILIÇ ALTUN²(ID), Abdülbaki DEMİR³(ID), Ahmet Galip HALİDİ³(ID), Ali ARSLAN²(ID)

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Van.

¹ Van Yüzüncü Yıl University Faculty of Medicine, Department of Basic Medical Sciences, Department of Medical Parasitology, Van, Türkiye.

² Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

² Harran University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Şanlıurfa, Türkiye.

³ Muş Alparslan Üniversitesi, Bulanık Meslek Yüksekokulu, Muş.

³ Muş Alparslan University, Bulanık Vocational School, Muş, Türkiye.

*Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 20099).

Makale Atfı: Aydemir S, Durmaz H, Aydemir ME, Kılıç Altun S, Demir A, Halidi AG ve ark. Pastörizasyonun inek sütündeki *Cryptosporidium parvum* canlılığı üzerine etkisinin propidium monoazide qPCR ile araştırılması. Mikrobiyol Bul 2023;57(4):660-666.

ÖZ

Günümüzün en önemli besin kaynaklarından biri olan inek sütü, halk sağlığı açısından risk oluşturan birçok patojene rezervuar olabilir. Bu patojenlerden biri *Cryptosporidium parvum*'dur. Zorunlu intraselüler bir parazit olan *C.parvum*'un oookistleri, oral yolla alındığında enfeksiyona neden olmaktadır. Enfekte inek ya da buzağı dışkı ile etrafa saçılan oookistler çiğ süte bulaşabilmekte ve bu durum süt çiftliklerinde sıkça görülmektedir. Bu çalışmada, kontamine çiğ inek sütüne ısı işlem uygulanması sonucu *C.parvum* oookistlerinin canlılığını propidium monoazide (PMA)-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative polymerase chain reaction (qPCR)] yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada önce pastörize edilmiş 50 ml inek sütüne 5×10^5 *C.parvum* oookisti eklenerek, örnekler 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtılmıştır. Çalışmada; kontrol grubu, pastörizasyon grubu ve kaynatma grubu olmak üzere üç grup oluşturulmuştur. Kontrol grubuna herhangi bir ısıtma işlemi uygulanmamıştır. Pastörizasyon grubunda, mikrosantrifüj tüplerindeki sütler 71.7 °C'ye ayarlanmış kuru ısı bloğu kuyucuklarına dökülmüş ve beş sn inkübe edilmiştir. Süre sonunda sütler mikropipet yardımıyla -20 °C'den çıkarılan soğuk metal tüplüğün kuyucuklarına aktarılmış ve beş sn inkübe edilmiştir. Kaynatma grubundaki sütler 95 °C'ye ayarlanmış kuru ısı bloğunda iki dk inkübe edilmiştir. Isıl işlem sonrasında mikrosantrifüj tüplerinde bulunan sütler 10 ml'lik santrifüj tüplere aktarılarak son hacim 10 ml olacak şekilde üzerlerine fosfat tampon çözeltisi [phosphate buffer saline (PBS)] eklenmiş ve 4000 rpm'de 20 dk santrifüj yapılmıştır. Bu işlem iki defa tekrarlandıktan sonra dipte kalan çökeltiye 400 µl PBS eklenerek çökelti homojen hale getirilmiştir. Her

grubun bir örneğine PMA uygulanırken diğer örneğine PMA uygulanmamıştır. PMA uygulanan örnekler oda sıcaklığı ve karanlıkta beş dk inkübe edildikten sonra soğutma özelliği olan cihazda beş dk UV ışığına maruz bırakılmıştır. 5000 g'de beş dk santrifüj edilerek oostikler toplanmıştır. Oostiklerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, COWP gen bölgesini amplifiye eden primerler kullanılarak SYBR Green gerçek zamanlı PCR [real-time PCR (Rt-PCR)] yapılmıştır. SYBR Green Rt-PCR sonucunda PMA uygulanmamış kontrol, pastörizasyon ve kaynatma gruplarının ortalama Ct değerleri sırasıyla 25 ± 1.24 , 23 ± 0.98 ve 26 ± 1.03 olarak belirlenmiştir. PMA uygulandıktan sonra kaynatma grubunda pik elde edilmezken, kontrol ve pastörizasyon gruplarında ortalama Ct değerleri sırasıyla 28 ± 1.38 ve 31 ± 1.46 olan pikler elde edilmiştir. Sonuç olarak, PMA-qPCR yöntemiyle sütlerdeki canlı *C.parvum* kistlerinin saptanabileceği ve pastörize sütlerde canlı oostiklerin olabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Pastörizasyon; PMA-qPCR; canlılık; süt.

ABSTRACT

Cow's milk, which is one of today's most important food sources, can be a reservoir for many pathogens that create a risk to public health. One of these pathogens is *Cryptosporidium parvum*. The oocysts of *C.parvum*, an obligate intracellular parasite, cause infection when ingested orally. The oocysts scattered around with the feces of infected cows or calves can contaminate raw milk and this is frequently seen in dairy farms. The aim of this study was to investigate the viability of *C.parvum* by propidium monoazide (PMA)-quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method after heat treatment applied to contaminated raw cow's milk. For the study, 50 ml of unpasteurized cow's milk was contaminated with 5×10^5 *C.parvum* oocysts and portioned into 1.5 ml microcentrifuge tubes. Three groups, namely the control group, pasteurization group and boiling group were formed. No warming procedure was applied to the control group. In the pasteurization group, the milks in microcentrifuge tubes were poured into the wells of the dry block heater set to 71.7 °C and incubated for five seconds. At the end of the period, the milks were transferred to the wells of the cold metal tube, which was removed at -20 °C with the help of a micropipette, and incubated for five seconds. The milks in the boiling group were incubated for two minutes in a dry block heater set to 95 °C. After the heat treatment, the milks in microcentrifuge tubes were transferred to 10 ml centrifuge tubes, PBS was added to make the final volume 10 ml, and centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes. After this process was repeated twice, 400 µl of PBS was added to the precipitate remaining at the bottom, and the precipitate was homogenized. One sample of each group was applied with PMA, while PMA was not applied to the other sample. PMA-applied samples were incubated for five minutes at room temperature and in the dark, and then exposed to UV light for five minutes in the device with cooling feature. The oocysts were collected by centrifugation at 5000 g for five minutes. After DNA isolation from oocysts, SYBR Green real time PCR (Rt-PCR) was performed using primers amplifying the COWP gene region. As a result of SYBR Green Rt-PCR, the mean Ct values of the control without PMA, pasteurization and boiling groups were determined as 25 ± 1.24 , 23 ± 0.98 and 26 ± 1.03 , respectively. While no peak was obtained in the boiling group after PMA application, the mean Ct values of the control and pasteurization groups were 28 ± 1.38 and 31 ± 1.46 , respectively. As a result, it was concluded that live *C.parvum* cysts in milk could be detected by PMA-qPCR method and live oocysts could be found in pasteurized milk.

Keywords: Pasteurization; PMA-qPCR; viability; milk.

GİRİŞ

Süt içerdiği protein, yağ, vitamin ve minerallerden dolayı en önemli besinlerden biridir. İnek sütü, insanların büyümesi ve sağlığı üzerindeki etkisi nedeniyle tüketilmesi en çok önerilen süttür. Ancak, çiğ inek sütü tüketimiyle ilişkili gıda kaynaklı hastalıklar önemli bir halk sağlığı sorunudur. Çiğ ve hatta pastörize süt tüketimi, özellikle Cryptosporidiosis başta olmak üzere protozoon gıda kaynaklı hastalık salgınları için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir¹.

Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium parvum* ve diğer *Cryptosporidium* türlerinin neden olduğu bir hastalıktır. *C.parvum*, insan ve değişik hayvan konakların sindirim sistemini enfekte eden zorunlu intraselüler bir parazittir². İnsanlarda karın ağrısı, sulu ishal, kilo kaybı, iştahsızlık ve anoreksiyaya neden olur. Enfeksiyon bağıışıklık sistemi sağlam kişilerde genellikle kendi kendini sınırlar ve birkaç hafta içinde düzelir. Bağıışıklığı baskılanmış kişiler için ise enfeksiyon tehlikelidir; kronikleşebilir ve bazen ölümcül olabilir^{2,3}.

C.parvum, fekal-oral yolla bulaşır ve insanlara bulaşta evcil hayvanların; özellikle buzağı dışkısının rolü büyüktür. Dışkı ile etrafa saçılan ookistler sütü kontamine edebilir. Kontamine çiğ süt ve süt ürünleri yoluyla *C.parvum* ookistleri insanlara bulaşabilir. Bu da özellikle immüsuprese kişiler için bir risk oluşturur⁴.

Cryptosporidium spp.'nin canlılığını değerlendirmek için geçmişte farklı yöntemler kullanılmıştır⁵. Propidium monoazid (PMA)-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative polymerase chain reaction (qPCR)] yöntemi *Cryptosporidium* oositlerinin canlılığını saptamak için kullanılacak yöntemlerden biridir. PMA ölü hücrelerin zarlarından geçerek DNA'ya bağlanır ve UV ışığı ile aktifleşerek DNA'yı parçalar. Böylelikle hedeflenen gen bölgesi PCR ile amplifiye edilemez. Canlı hücrelerde ise PMA hücre zarını geçemediğinden DNA'ya zarar veremez. Bu bağlamda qPCR sonucunda pik elde edilmesi hücrenin canlılığını gösterir⁶.

Bu çalışmada, kontamine çiğ inek sütüne ısı işlem uygulanması sonrasında *C.parvum* ookistlerinin canlılığının PMA-qPCR yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Parazit Ookistleri

C.parvum ookistleri satın alma yoluyla temin edildi. Ookistler 100 µg streptomisin/mL ve 100 U penisilin/mL içeren steril ve filtre edilmiş fosfat tampon çözeltisi [phosphate buffer saline (PBS)] içinde 4 °C'de muhafaza edilerek iki ay içerisinde kullanıldı.

Örneklerin Hazırlanması

Pastörize edilmemiş 50 ml inek sütüne 5 X 10⁵ *C.parvum* ookisti karıştırılarak vortekslendi. Homojen süt 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine bölündü. Çalışmada; kontrol grubu, pastörizasyon grubu ve kaynatma grubu olmak üzere üç grup oluşturuldu. Kontrol grubuna herhangi bir ısıtma işlemi uygulanmadı. Pastörizasyon grubunda, mikrosantrifüj tüpteki sütler 71.7 °C'ye ayarlanmış kuru ısı bloğunun (Biosan Bio TDB-100) kuyucuklarına döküldü ve beş sn inkübe edildi. Süre sonunda sütler mikropipet yardımıyla -20 °C'den çıkarılan soğuk metal tüplüğün kuyucuklarına aktarıldı ve beş sn inkübe edildi. Kaynatma grubundaki sütler 95 °C'ye ayarlanmış kuru ısı bloğunda iki dk inkübe edildi.

Mikrosantrifüj tüpünde bulunan sütler 10 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve son hacim 10 ml olacak şekilde fosfat tampon çözeltisi eklendi. Karışım homojen hale getirildikten sonra 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı

ve tekrar 10 ml PBS eklenerek yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra dipte kalan çökeltiyeye 400 µl PBS eklenerek çökelti homojen hale getirildi. Her grubun bir örneğine PMA uygulanırken diğer örneğine PMA uygulanmadı. Her aşama için üç tekrar yapıldı.

Propidyum Monoazid ile Muamele

Liyofilize formda (Biotium, ABD) satın alınan PMA, %20 dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich) ile çözülerek 20 mM'lik bir stok çözeltisi oluşturuldu. Stok çözelti, 5 µl'lik hacimlere bölündü ve -20 °C'de karanlıkta saklandı. Şeffaf (1.5 ml hacim) mikrosantrifüj tüplerinde 400 µl ookist içeren PBS çözeltisine 20 mM PMA stok çözeltisinden 1 µl eklendi ve karışım vortekslendi⁵. Oda sıcaklığı ve karanlıkta beş dk inkübasyondan sonra numune soğutma özelliği olan cihazda (PMA-Lite, PT-HISA, Çin) beş dk UV ışığına maruz bırakıldı. 5000 g'de beş dk santrifüj edilerek ookistler toplandı.

DNA İzolasyonu

DNA ekstraksiyon kiti (QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit, Almanya) kullanılarak ookistlerden DNA izolasyonu yapıldı. Yöntem, üreticinin talimatlarında bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Kit prosedüründen önce kuru ısı bloğunda 95 °C'de 45 dk inkübasyon gerçekleştirildi. Inkübasyon sırasında tüpler beş dk aralıklarla vortekslendi. Inkübasyondan sonra tüpler yatay vorteks içine yerleştirildi ve maksimum hızda 30 dk vortekslendi. Daha sonra üreticinin talimatları uygulandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Sütte bulunabilecek diğer organizmaları ekarte etmek ve yanlış bağlanmaları önlemek için önce konvansiyonel PCR ve daha sonra PCR amplikonları kullanılarak SYBR Green real time PCR (Rt-PCR) yöntemi uygulandı.

Konvansiyonel PCR BCOWPF: 5'-ACC GCT TCT CAA CAA CCA TCT TGT CCT C-3' ve BCOWPR: 5'-CGC ACC TGT TCC CCA CTC AAT GTA AAC CC-3' primerleri kullanılarak daha önce Sadek ve arkadaşları⁷ tarafından tarif edildiği gibi gerçekleştirildi.

PCR amplikonları ile Rt-PCR yapıldı. Rt-PCR prosedüründe, 553 baz çifti (bp) uzunluğundaki COWP gen bölgesini amplifiye eden Cry-15: 5'-GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G-3' ve Cry-9: 5'-GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G-3' primerleri kullanıldı⁷. Reaksiyon, 10 ul 2X SYBR Green karışımı (12.5 mM MgCl₂), her primerden 0.2 µM ve 3 µl birinci PCR amplikonu içeren toplam hacim 20 µl olacak şekilde ayarlandı. PCR ısı döngüsü, 95 °C'de dört dk denatürasyon aşamasından sonra ve 95 °C'de 45 saniye, 45 °C'de 45 saniye, 72 °C'de bir dk olacak şekilde 40 döngü olarak programlandı. Yanlış bağlanmaları saptamak amacıyla saniyede 0.2 °C artışla sıcaklık 50 °C'den 95 °C'ye çıkartılarak erime eğrisi analizi gerçekleştirildi.

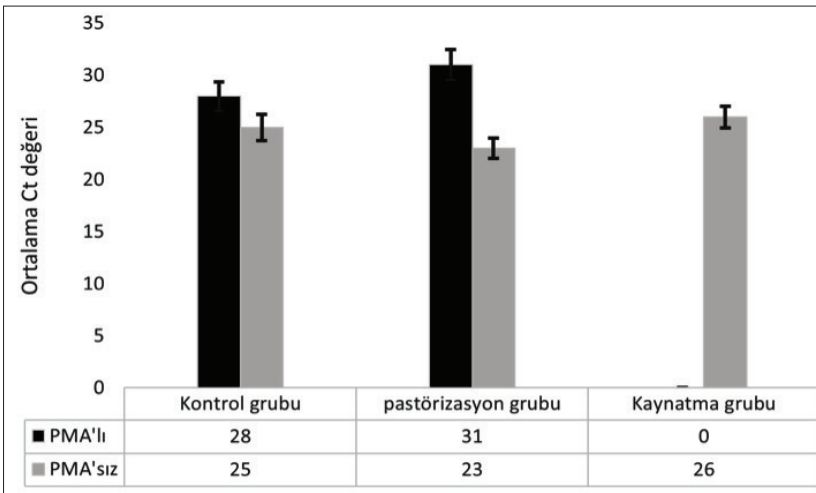
BULGULAR

SYBR Green Rt-PCR sonucunda PMA uygulanmamış tüm gruplarda pik elde edilmiştir. PMA uygulanmamış kontrol, pastörizasyon ve kaynatma gruplarının ortalama Ct değerleri sırasıyla 25 ± 1.24 , 23 ± 0.98 ve 26 ± 1.03 olarak belirlenmiştir. PMA uygulandıktan sonra kaynatma grubunda pik elde edilmezken kontrol ve pastörizasyon gruplarında ortalama Ct değerleri sırasıyla 28 ± 1.38 ve 31 ± 1.46 olan pikler elde edilmiştir (Şekil 1).

Yapılan analiz ve hesaplamalar sonucunda pastörizasyon işlemi uygulanmış süt grubunda canlı *C.parvum* ookistlerinin kaldığı, pastörizasyon derecesi sütün kaynatma derecesine yaklaştığında tüm *C.parvum* ookistlerinin öldüğü tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, ısının inek sütüne bulaştırılmış *C.parvum* ookistlerinin canlılığı üzerindeki etkisi PMA-PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. *Cryptosporidium* spp.'nin canlılığını değerlendirmek için tarihsel olarak farklı yöntemler kullanılmıştır. Ekskistasyon, ookistlerin canlı olup olmadığını belirlemek için geliştirilen ilk yöntemlerden biridir. Daha sonra DNA bağlayıcı boyaların çeşitli zar geçirgenliğinden yararlandığı protokoller geliştirilmiştir. Bu protokollerde, canlı organizmalar sadece zar geçirgen boyaların alınmasına izin verirken lipid çift katmanlarına sahip canlı olmayan organizmalar tüm boyaların DNA'ya bağlanmasına izin vermektedir. Yapılan bir çalışmada, *Cryptosporidium* ookist canlılığını değerlendirmeye yönelik PMA-qPCR dahil in vitro yöntemlerin genellikle birbiriyle iyi korelasyon gösterdiği ve canlı ookistleri ısıyla öldürülmüş ookistlerden ayırt etmek için kullanılabileceği bildirilmiştir⁵. Ayrıca birçok çalışmada, PMA-qPCR yöntemiyle su örneklerinde *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin canlılığı değerlendirilmiştir^{6,8,9}. Bu çalışmada ise ilk defa PMA-qPCR yöntemiyle süt örneğinde *C.parvum* ookistlerinin canlılığı değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Isıtılmış sütteki *C.parvum* ookistlerinin COWP PMA-qPCR testi sonuçları.

Pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonları için risk taşıyan gıdalar olarak bilinmektedir. Birçok ülkede pastörize edilmemiş sütler ile bulaşan *Cryptosporidium* spp. salgını bildirilmiştir. Öte yandan, Gobfert ve arkadaşları¹⁰ İngiltere’de üç kişiye pastörize edilmiş süttten *Cryptosporidium* spp. bulaştığını ve süt kontaminasyonunun pastörizasyondan sonra olabileceğini bildirmiştir. Abdollahzadeh ve arkadaşları¹, 400 pastörize edilmiş süt örneğinin 17 (%4.25)’sinde *Cryptosporidium* spp. saptamıştır. Bu iki çalışma pastörize sütlerdeki ookistlerin canlılığının araştırılmasını önemli hale getirmiştir.

Isıl işlemin *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin etkinliği üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Harp ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmada¹¹, yüksek sıcaklık-kısa zaman pastörizasyonu (HTST) uygulanan sütlerde *C.parvum* ookistlerinin 71.7 °C’de beş saniyede enfektif özelliklerini kaybettiklerini belirtmişlerdir. Enfektif özelliğini kaybeden ookistlerin canlı olup olmadığı bu çalışmalardan anlaşılmamaktadır. Burg ve Zintl⁵, su banyosunun sıcaklığını 30 dakikada 50 °C’den 100 °C’ye çıkartarak suya bulaştırılmış *C.parvum* ookistlerine canlılık testi yapmıştır. Çalışmada DAPI/PI boyama, RNA FISH, PMA-qPCR ve polimer slayt adezyon yöntemlerinin sonuçları 60-70 °C civarında ookistlerin canlılığında önemli düşüşler olduğunu göstermiştir, ancak 100 °C’de dahi canlı ookistlerin olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada da pastörizasyon işlemi sonucunda canlı ookistlerin kaldığı, ancak kaynatma işlemiyle tüm ookistlerin öldüğü saptanmıştır.

C.parvum için enfektif doz değerinin (ID50) dokuz ile 1042 ookist arasında değiştiği bildirilmiştir³. Özellikle immünsuprese bireylerde düşük dozlu bulaşmalar enfeksiyon oluşturabilir. Bu nedenle pastörizasyon işlemiyle enfektif özelliğini kaybettiği söylenen ancak canlı olarak kalan ookistlerin immünsuprese bireylerde risk oluşturabileceği düşünülmektedir¹¹.

Sonuç olarak, PMA-PCR yöntemiyle sütlerdeki canlı *Cryptosporidium* spp. kistlerinin saptanabileceği ve pastörize sütlerde canlı ookistlerin olabileceği kanaatine varılmıştır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, etik komite onayı gerektirmeyen özgün bir çalışmadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Abdollahzadeh F, Firouzabadi MSS, Shomali RR. Molecular incidence of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Cryptosporidium parvum* in dissimilar kinds of raw and pasteurized milk samples of naturally infected animal species. *Sains Malaysiana* 2022; 51(7): 2061-71. <https://doi.org/10.17576/jsm-2022-5107-10>
2. Ekici A, Unlu A, Aydemir S, Barlık F, Yılmaz H. Subtyping of *Cryptosporidium parvum* obtained from humans and calves in Van, Turkey. *Iran J Parasitol* 2022; 17(3): 366-74. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v17i3.10627>

3. Şahin S, Ağaoğlu S, Alemdar S. *Cryptosporidium* ve Cryptosporidiosis. Türkiye Klinikleri 2018; 35-41.
4. Di Pinto A, Tantillo M. Direct detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction in raw milk. J Food Prot 2002; 65(8): 1345-8. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1345>
5. Burgt NHV, Auer A, Zintl A. Comparison of in vitro viability methods for *Cryptosporidium* oocysts. Exp Parasitol 2018; 187: 30-6. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.002>
6. Ma J, Feng Y, Hu Y, Villegas EN, Xiao L. Human infective potential of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in urban wastewater treatment plant effluents. J Water Health 2016; 14(3): 411-23. <https://doi.org/10.2166/wh.2016.192>
7. Sadek GS. Use of nested PCR-RFLP for genotyping of *Cryptosporidium* parasites isolated from calves and children suffering from diarrhea. PUJ 2014; 7(2): 129. <https://doi.org/10.4103/1687-7942.149568>
8. Liang Z, Keeley A. Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. Water Res 2012; 46(18): 5941-53. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.014>
9. Alonso JL, Amorós I, Guy RA. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. Parasitol Res 2014; 113(7): 2671-8. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3922-9>
10. Gopfert A, Chalmers RM, Whittingham S, Wilson L, Van Hove M, Ferraro CF, et al. An outbreak of *Cryptosporidium parvum* linked to pasteurised milk from a vending machine in England: A descriptive study, March 2021. Epidemiol Infect 2022; 150: e185. <https://doi.org/10.1017/S0950268822001613>
11. Harp JA, Fayer R, Pesch BA, Jackson GJ. Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. Appl Environ Microbiol 1996; 62(8): 2866-8. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2866-2868.1996>