

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Osud oocyst kryptosporidií v prostředí, při kontaktu s různými skupinami bezobratlých

Bakalářská práce
(literární rešerše)

Vypracovala: Jitka Kociánová

Vedoucí práce: RNDr. Oleg Ditrich, Csc.

České Budějovice 2009

Bakalářská diplomová práce

Kociánová J. (2009): Osud oocyst kryptosporidií v prostředí, při kontaktu s různými skupinami bezobratlých [The destiny of oocysts of *Cryptosporidium* spp. in the environment in contact with different kinds of invertebrates]. Faculty of Biological Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This study deals with occurrence, dispersion and destruction of *Cryptosporidium* oocysts in a particular environment. It therefore focuses on the contact with different kinds of invertebrates. It reveals, how oocysts get to contact with the invertebrates and what happens to them, whether they pass through their body and digestive tract. Next, the study describes, what happens, if the oocysts are excreted because some of the invertebrates could digest and destruct the oocysts and the other invertebrates could act the role of transmitters. The other information is about different methods, which can be used for detecting the oocysts in the environment or in the bodies of different kinds of invertebrates.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

České Budějovice 6. 1. 2009 _____

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/ 1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě- v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Olegu Ditrichovi CSc. za trpělivost, drahocenné rady a připomínky a také celému oddělení Lékařské a veterinární parazitologie za jejich pomoc a podporu. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Daně Květoňové za její užitečné rady, pomoc a čas, který mi věnovala v laboratoři. Také děkuji své rodině za trpělivost a podporu při studiu.

1. Obsah	4
1. 1. Rod <i>Cryptosporidium</i>	5
1.1.1. Charakteristika	5
1.1.2. Taxonomie	5
1.1.3. Životní cyklus	11
1.1.4. Patogeneze, symptomatika, léčba	13
1.1.5. Epidemiologie	15
2. 1. Kryptosporidie jako patogen šířený vodou.	18
2.1.1. Patogenní eukaryota ve vodách.	18
2.1.2. Metody využívané k detekci oocyst	19
2. 2. Přehled různých skupin bezobratlých a jejich kontakt s oocystami kryptosporidií.	22
2.2.1. Nálevníci (Ciliophora)	22
2.2.2. Interakce mezi nálevníky a oocystami kryptosporidií	22
2.2.3. Měňavky (Amoebozoa)	24
2.2.4. Interakce mezi měňavkami a oocystami kryptosporidií	24
2.2.5. Vířníci (Rotifera)	25
2.2.6. Interakce mezi vířníky a oocystami kryptosporidií.	26
2.2.7. Hlístice (Nematoda)	28
2.2.8. Interakce mezi hlísticemi a oocystami kryptosporidií.	28
2.2.9. Perloočky (Cladocera).	29
2.2.10. Interakce mezi perloočkami a oocystami kryptosporidií.	30
2.2.11. Žábronožky (Anostraca)	32
2.2.12. Interakce mezi žábronožkami a oocystami kryptosporidií.	32
2.2.13. Mlži (Bivalvia)	33
2.2.14. Interakce mezi mlži a oocystami kryptosporidií.	34
2.2.15. Plži (Gastropoda)	39
2.2.16. Interakce mezi plži a oocystami kryptosporidií.	40
2.2.17. Hmyz (Insecta)	41
2.2.18. Interakce mezi hmyzem a oocystami kryptosporidií	42
3. Diskuze	48
4. Závěry	52
5. Literatura	53

1.1. Rod *Cryptosporidium*

1.1.1. Charakteristika

Kryptosporidie jsou jednobuněční paraziti, řazení do kmene Apikomplexa. Mají specifickou tkáňovou lokalizaci, a to v zóně mikroklků epitelu trávicího traktu a epitelu dýchacích cest. Některé druhy parazitují v epitelu vystýlajícím žaludeční žlázy. Atypicky se mohou vyskytovat i v jiných orgánech zvířat i lidí. Infekce se tedy může šířit jak zažívacím traktem, tak také jinými mukózními povrchy, zahrnujícími žaludek, žlučník, močové nebo dýchací ústrojí (Clemente et al. 2000, Megremis et al. 2004).

Kryptosporidie mohou napadat ryby, obojživelníky, plazy, ptáky a savce, včetně člověka (Fayer 1997). Parazitují uvnitř buněk, mimo cytoplazmu (intracelulárně extracytoplazmaticky). U určitých druhů živočichů (krysy, myši, morčata) se proti oocystám vyvinula přirozená rezistence (Tzipori 1983).

Rod *Cryptosporidium* byl popsán Ernestem Edwardem Tyzzerem. Ten roku 1910 popsal organismus parazitující v buňkách žaludečního epitelu u laboratorních myší a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris*. O dva roky později Tyzzer popsal a pojmenoval další druh kryptosporidií (*Cryptosporidium parvum*) infikující střevní buňky hostitele (Fayer 1997). V rámci rodu *Cryptosporidium* lze rozlišit dvě výrazné skupiny druhů, první s menšími, kulatými oocystami a s afinitou ke střevu (k enterocytům) a druhou s většími, oválnými oocystami a s afinitou k žaludečním žlázám (Fayer 1997).

Vzhledem k zoonotickému potenciálu, závažným klinickým příznakům u pacientů se sníženou imunitou a absencí účinné chemoterapie, patří zástupci rodu *Cryptosporidium* k intenzivně studovaným parazitům (Arrowood et Sterling 1997).

1.1.2. Taxonomie

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou paraziti řazení spolu s kokcidiemi a také s např. malarickými plasmodii do kmene Apikomplexa, který je příbuzný obrněnkám a nálevníkům (Carreno et al. 1999). Na rozdíl od ostatních Apikomplex ale nemají apikoplast (zbytek plastidu získaného během fylogeneze od endosymbionta). Zato mají silně redukovaný zbytek mitochondrie (Fayer 1997).

Tito paraziti gastrointestinálního traktu a někdy též dýchacího systému, byli dříve řazení do blízkosti eimerií mezi *Coccidia*, dnes se ale ví, že jsou více příbuzné gregarinám. Oproti gregarinám, které mají velikost stovek mikrometrů, jsou kryptosporidie drobné organismy, měřící jen několik μm (Carreno et al. 1999).

Zařazení kryptosporidií do systému (Volf et al. 2007)

Empire	Eukaryota Whittaker et Margulis, 1978
Kingdom	Chromalveolata Adl et al., 2005
Phylum	Apicomplexa Levine, 1970
Class	Cryptosporidea Šlapeta, 2007
Genus	<i>Cryptosporidium</i> Tyzzer, 1910
Species	<i>Cryptosporidium parvum</i> Tyzzer, 1912

Kryptosporidie lze rozdělit do 2 skupin podle jejich výskytu v hostiteli. První skupina obývá žaludek. Jsou to: *C. muris*, *C. andersoni* u savců, *C. molnari* u ryb, *C. galli* u ptáků a *C. serpentis* u plazů. Do druhé skupiny se řadí kryptosporidie infikující střevní epitel, sem patří:

C. saurophilum u plazů, *C. meleagridis*, *C. baileyi* u ptáků a např: *C. hominis*, *C. parvum* nebo *C. canis* u savců (Xiao et al. 2004). Do dnešní doby bylo popsáno osm druhů kryptosporidií, které mohou infikovat člověka: *C. andersoni*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. suis* (Xiao et al. 2001). V současné době je celosvětově uznáváno 23 druhů rodu *Cryptosporidium*. Dále je popsáno několik genotypů, u kterých lze předpokládat, že budou v budoucnu popsány jako samostatné druhy (Fayer et Xiao 2008).

Tab. 1.: 23 platných druhů kryptosporidií (Fayer et Xiao 2008, Šlapeta 2008)

Druh	Autor, Rok popisu	Typový hostitel
<i>C. muris</i>	Tyzzer, 1910	<i>Mus musculus</i>
<i>C. parvum</i>	Tyzzer, 1912	<i>Mus musculus</i>
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	<i>Meleagris gallopavo</i>
<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al., 1971	<i>Cavia porcellus</i>
<i>C. cuniculus</i>	Inman et Takeuchi, 1979	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979	<i>Felis catus</i>
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1980	<i>Elaphe guttata</i>
<i>C. nasoris</i>	Hoover et al., 1981	<i>Naso liturus</i>
<i>C. baileyi</i>	Current et al., 1986	<i>Gallus Gallus</i>
<i>C. varanii</i>	Pavlásek et al., 1995	<i>Varanus prasinus</i>
<i>C. cichlidis</i>	Paperna et Vilenkin, 1996	<i>Oreochromis aureus</i>
<i>C. reichenbachklinkei</i>	Paperna et Vilenkin, 1996	<i>Trichogaster leeri</i>
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al., 2000	<i>Bos taurus</i>
<i>C. canis</i>	Fayer et al., 2001	<i>Canis familiaris</i>
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan et al., 2002	<i>Homo sapiens</i>
<i>C. molnari</i>	Alvarez- Pellitero et al., 2002	<i>Sparus aurata</i>
<i>C. galli</i>	Ryan et al., 2003	<i>Gallus gallus</i>
<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez- Pellitero et al., 2004	<i>Scophthalmus maximus</i>

<i>C. suis</i>	Ryan et al., 2004	<i>Sus scrofa</i>
<i>C. bovis</i>	Fayer et al., 2005	<i>Bos taurus</i>
<i>C. fayeri</i>	Ryan et al., 2008	<i>Macropus rufus</i>
<i>C. fragile</i>	Jirků et al., 2008	<i>Duttaphrynus melanostictus</i>
<i>C. ryanae</i>	Fayer et al., 2008	<i>Bos taurus</i>

C. muris Tyzzer, 1910

Jedná se o žaludeční kryptosporidie hlodavců (myši, potkanů, zemních veverek atd.), které jsou velké 8, 4 x 6, 2 µm a napadají epitel žaludku. Nalezeni byli také u velbloudů, damanů, imunodeficientních a imunokompetentních jedinců. Riziko lidských infekcí není závažné, díky nízké patogenitě. Experimentálně byl druh přenesen na různé druhy myšovitých, na morčata, králíky, kočky a psy.

C. parvum Tyzzer, 1912

Je to druh s nejširším hostitelským spektrem. Infikuje člověka, kopytníky, mladý skot, hlodavce, zajíce, šelmy, primáty a zřejmě i další řády teplokrevných obratlovců. Oocysty jsou přítomny ve většině povrchových i hlubinných zdrojů vody a jsou velmi odolné. Při infekci napadá zažívací trakt a může infikovat i dýchací systém. Experimentálně byl přenesen na ptáky. Tento druh je poměrně běžný na našem území, rozšířen je zejména v chovech hospodářských zvířat. Nacházejí se také v izolátech získaných od člověka, častý je i u dětí. Riziko představuje pro imunokompetentní pacienty, které mohou postihnout průjmy a nevolnosti, u imunodeficientních pacientů může způsobit i smrt. Velikost oocyst je 5, 2 x 4, 6 µm.

U tohoto druhu byly zjištěny dva odlišné genotypy: tzv. lidský G1 nalezený u člověka a později popsáný jako *C. hominis* a tzv. bovinní G2 izolovaný kromě člověka běžně z telat, kůzlat, jehňat a hříbat (Awad- El Kariem et al. 1995, Morgan et al. 1997). G2 je lehce přenosný z jednoho hostitele na druhý, kdežto G1 se nepodařilo infikovat žádný z osvědčených modelů (sající myši, kůzlata atd.). Oocysty *C. parvum* nemají schopnost způsobovat gastrointestinální infekce u nižších obratlovců (Graczyk et al. 1996).

V roce 2007 navrhl Šlapeta nový název *C. pestis*, pro oocysty, které byly izolovány z telat a které infikují převážně mladé jedince. Název *C. parvum* zůstal oocystám infikujícím hlodavce a je v dnešní době znám jako myší genotyp. Tato změna, odpovídající Mezinárodnímu kódu zoologické nomenklatury, dosud nebyla odbornou veřejností všeobecně přijata.

C. meleagridis Slavin, 1955

Jde o ptačí druh, napadající zažívací trakt. Původně byl popsán u krocana. Byl získán z vody při menších epidemiích ve Velké Británii. Experimentálně ho lze přenést na laboratorní hlodavce, králíky a telata. Představuje riziko pro imunokompetentní a imunodeficientní pacienty. Oocysty jsou velké 5, 2 x 4, 6 μm .

C. wrairi Vetterling, Jervis, Merrill et Sprinz, 1971

Tento druh kryptosporidií se specializuje na morčata. Byly provedeny experimentální přenosy na myši, kuřata, krocany a králíky, ale bez úspěchu. Velikost oocyst je 5, 4 x 4, 6 μm .

C. cuniculus Inman et Takeuchi, 1979

Jedná se o druh identifikovaný v králících, konkrétně u druhu *Oryctolagus cuniculus*. Oocysty jsou téměř nerozeznatelné od oocyst *C. parvum* a byly nalezeny v ileu a jejunu na okrajích epiteliálních buněk.

C. felis Iseki, 1979

Mezi typické hostitele tohoto druhu patří kočky. Byl mimo jiné také nalezen u hovězího dobytka, myšice a imunodeficientních a imunokompetentních pacientů. Podobá se druhu *C. parvum*, ale liší se od něj menšími oocystami, které dosahují velikosti 4, 6 x 4, 0 μm .

C. serpentis Levine, 1980

Tento druh je specializovaný na plazy. Napadá především hady, ale i ještěrky. Přežívá v jejich žaludeční sliznici. Infekce je provázena anorexií, letargií, otokem ve střední části těla, úbytkem váhy a smrtí. Oocysty jsou z těla vylučovány výkaly, někdy mohou být vylučovány po několik let bez klinických příznaků. Oocysty dosahují velikosti 6, 2 x 5, 3 μm .

C. nasoris Hoover, Hoerr, Carlton, Hinsman et Ferguson, 1981

Tento druh je zástupcem rybích kryptosporidií. Oocysty, které napadají střevní sliznici, byly nalezeny u ryby *Naso lituratus*. Nakažené ryby nepřijímají potravu, často zvrací a ztrácí na váze.

C. baileyi Current, Upton et Haynes, 1986

Tyto kryptosporidie jsou další z řady parazitů, napadající ptáky. *Cryptosporidium baileyi* způsobuje infekci především u drůbeže. Oocysty dorůstají do velikosti 6, 6 x 5, 5 μm a nachází se v bursa fabricii a epitelu dýchacích cest.

C. varanii Pavlásek, Lávičková, Horák, Král et Král, 1995

Cryptosporidium varanii je další z řady plazích parazitů napadajících zejména ještěrky, výjimkou ale nejsou také hadi. Při infekci je lze nalézt ve střevním epitelu. Jejich oocysty mají velikost 5,0 x 4,7 μm. Roku 1997 popsali Koudela et Modrý další druh kryptosporidie, který popsali *C. saurophilum*. Později se však ukázalo, že se jedná opět o druh *C. varanii*. Název *C. saurophilum* je tedy synonymem *C. varanii*.

C. cichlidis Paperna et Vilenkin, 1996

Hostitelským organismem tohoto druhu jsou ryby, konkrétně *Oreochromis aureus* a *O. niloticus*. Oválné oocysty dosahující velikosti 4,3- 3,3 μm, napadají především žaludeční sliznici.

C. reichenbachklinkei Paperna et Vilenkin, 1996

Tento druh byl identifikován u ryby *Trichogaster leeri*. Kulovité oocysty se nachází v žaludku a jejich velikost v průměru dosahuje 2,86 μm.

C. andersoni Lindsay, Upton, Owens, Morgan, Mead et Blagburn, 2000

Typickým hostitelem *C. andersoni* je skot, vyskytuje se také u velbloudů, svišťů, zubrů, horských gazel, nebo myši. Oocysty byly nalezeny i u pacientů trpících AIDS. Experimentálně lze infikovat pískomily. Při nákaze přežívá ve žláznatém žaludku.

Velikost oocyst je 7,4 x 5,5 μm.

C. canis Fayer, Trout, Xiao, Morgan, Lal et Dubey, 2001

Tento druh je typickým parazitem psů. Oocysty byly nalezeny také u medvědů, imunosuprimovaných pacientů a imukompetentních dětí. Experimentálně byl přenesen na skot. Infekční není pro myši. Výskyt ve vodě nebyl zatím prokázán. Při infekci obývá střevní epitel. Velikost oocyst činí 4,9 x 4,7 μm. U tohoto druhu existuje vnitrodruhová variabilita: genotyp z lidí se liší od liščího a psího genotypu.

C. hominis Morgan- Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson et Xiao, 2002

Mezi typické hostitele tohoto druhu, který napadá střevní epitel, patří člověk. Oocysty o velikosti 5,2 x 4,7 μm byly vzácně nalezeny i u primátů, ježnat a dugongů. Experimentálně byl *C. hominis* přenesen na opice, ježnata a gnotobiotická prasata. Experimentální přenos na laboratorní hlodavce, šelmy a kůzlata se nezdařil. Infekční zřejmě nejsou pro myši, kočky a další

savce. Pro člověka je velmi virulentní, s vysokým potenciálem interhumánního přenosu. Velké riziko představuje pro imunokompetentní a imonodeficientní pacienty.

Tento druh byl identifikován jako původce rozsáhlých epidemií z vody včetně velké epidemie roku 1993 v Millwaukee (Mackenzie et al. 1994). Na našem území je poměrně vzácný, častěji ho lze nalézt v západní Evropě nebo USA. O rozšíření v tropech zatím chybějí přesnější informace.

C. molnari Alvarez- Pellitero et Sitjà-Bobadilla, 2002

Rybí kryptosporidie. Jejím typickým hostitelem je ryba *Sparus aurata*, dalším hostitelem je *Dicentrarchus labrax*. Při nákaze lze oocysty nalézt ve sliznici žaludku a zřídka i ve střevním epitelu. Není infekční pro člověka. Oocysty dosahují velikosti 4, 7 x 4, 5 µm.

C. galli Ryan, Xiao, Read, Sulaiman, Monis, Lal et Fayer, Pavlásek, 2003

Hostitelským organismem tohoto druhu jsou exotičtí a volně žijící ptáci, převážně slepice, tetřevi, hýli. U člověka zatím nebyly zjištěny případy infekce. *C. galli* infikuje především epitel proventriculu. Výskyt ve vodě nebyl zatím prokázán. Jejich oocysty jsou veliké 8, 3 x 6, 3 µm.

C. scophthalmi Alvarez- Pellitero, Quiroga, Sitjà- Bobadilla, Redondo, Palenzuela, Pardós, Vázquez et Nieto, 2004

Tento druh kryptosporidií je opět specializován na ryby. Byl popsán z ryby *Scophthalmus maximus*. Napadá především epitel zažívacího traktu. Velmi zřídka byl pozorován i v žaludku. Velikost oocyst dosahuje 4, 5 x 3, 9 µm.

C. suis Ryan, Monis, Enemark, Sulaiman, Samarasinghe, Read, Buddle, Robertson, Zhou, Thompson et Xiao, 2004

Prasečí kryptosporidie. Další hostitelé, kromě imunodeficientních pacientů, pro které představuje určité riziko, nejsou známi. Experimentálně není infekční pro hlodavce. Výskyt ve vodě nebyl zatím prokázán. Při nákaze obývá střevní epitel. Velikost jeho oocyst je 4, 6 x 4, 2 µm.

C. bovis Fayer, Santin et Xiao, 2005

Tento druh je infekční především pro dospělý a starší skot, na rozdíl od druhu *C. parvum*, který infikuje především mladý skot. Při experimentálních přenosech se podařilo oocystami nakazit jehňata. *Cryptosporidium bovis* není infekční pro neonatální myši. Velikost oocyst se pohybuje okolo 4, 9 x 4, 6 µm

C. fayeri Ryan, Power et Xiao, 2008

Kryptosporidie tohoto druhu infikují vačnatce. Oocysty byly nalezeny u klokanů *Macropus rufus*. Tento druh kryptosporidií není infekční pro ARC Swiss myši. Oocysty o velikosti 4, 3- 4, 9 µm jsou téměř nerozeznatelné od oocyst *C. parvum*.

C. fragile Jirků, Valigurová, Koudela, Křížek, Modrý et Šlapeta, 2008

Jedná se o první popsany a pojmenovaný druh kryptosporidií infikující obojživelníky. Oocysty tohoto druhu byly nalezeny na žaludečních epitelárních buňkách malajské ropuchy *Duttaphrynus melanostictus*. Oocysty dosahují velikosti 5, 5- 6, 2 µm, mají kulovitý až eliptický tvar, nepravidelný okraj a hladkou stěnu. Při experimentální nákaze bylo zjištěno, že oocysty nejsou infekční pro ryby, obojživelníky, plazy a SCID myši.

C. ryanae Fayer, Santin et Trout, 2008

Typickým hostitelem toho druhu je *Bos taurus*. Dříve byl tento druh označován jako *Cryptosporidium deer-like*. Oocysty jsou podobné oocystám *C. parvum* a *C. bovis*, jsou jen mnohem menší, dosahují velikosti 3, 7- 3, 2 µm. Prepatentní perioda u tohoto druhu trvá 11 dní, patentní perioda 15- 17 dní. Oocysty nejsou infekční pro BALB/c myši.

1.1.3. Životní cyklus

Nejlépe prozkoumaný životní cyklus je druhu *C. parvum*, u ostatních druhů jsou životní cykly stejné nebo velmi podobné. Vždy jsou v jednom hostiteli rozeznávány čtyři hlavní části cyklu: excystace, merogonie (asexuální fáze), gametogonie (sexuální fáze) a sporogonie. Parazit je přenášen z hostitele na hostitele fekálně- orální cestou. Infekčním stádiem jsou oocysty, které jsou velmi drobných rozměrů a řadí se mezi nejmenší oocysty (Smith et al. 2005).

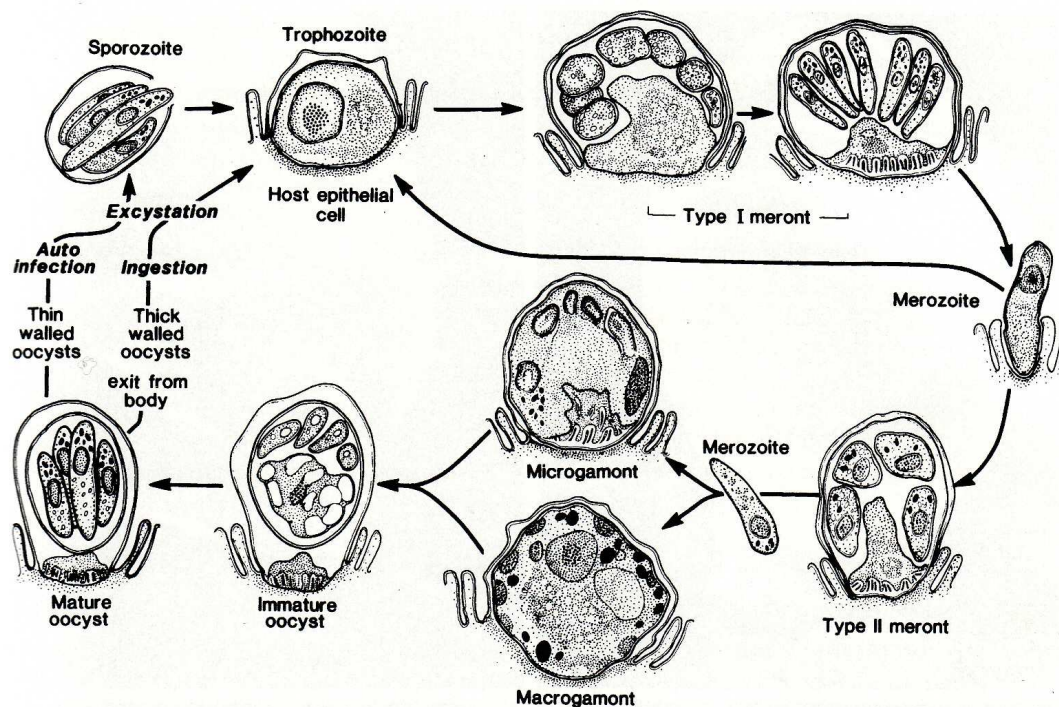
Podle tvaru a velikosti oocyst lze určit, zda jde o kryptosporidie střevního či žaludečního epitelu (Xiao et al. 2004). Oocysty napadající buňky střevního epitelu jsou menší, kulovitého tvaru (např. *C. parvum* 4,5 x 5 µm). Větší, oválné oocysty se vyvíjejí v epitelu žaludku (např. *C. andersoni* 5,5 x 7,4 µm). Žaludeční druhy mají méně odolné oocysty a jejich šíření vodou má menší význam než u střevních druhů (Fayer 1997). Velikost oocyst slouží vedle hostitelské specifity a genotypizace jako jedna z hlavních taxonomických charakteristik při identifikaci jedinců druhu kryptosporidie (Fayer 1997).

U některých druhů kryptosporidií, např. u *C. parvum*, je popisován výskyt dvou typů oocyst. Tenkostěnné oocysty, excystující v trávicím traktu hostitele, jsou zodpovědné za autoinfekci, neboť slouží k infekci dalších úseků trávicího traktu. Silnostěnné oocysty jsou velmi odolné a opouštějí tělo s exkrementy hostitele. Jsou určeny pro vnější prostředí a mezihostitelský přenos a

jsou dobře vybaveny pro přežití v nepříznivých podmínkách. V příznivých podmínkách si svoji infekčnost zachovávají déle než rok (Robertson et al. 1992, Jenkins 1997). V obou případech probíhá sporulace ještě v hostiteli. Oocysty, které se dostávají do vnějšího prostředí, jsou již plně schopné infekce (Hijjawi et al. 2001, Gookin et al. 2002).

Životní cyklus kryptosporidií začíná v okamžiku, kdy hostitel pozře či inhaluje silnostěnné oocysty. Po průchodu žaludkem dojde ve střevě k excystaci, která je ovlivněna řadou faktorů: teplota, působení žlučových solí, pankreatických enzymů, koncentrace oxidu uhličitého atd. (Kato et al. 2001). Z excystovaných oocyst začnou adherovat uvolnění sporozoiti k hostitelským buňkám (Slifko et al. 1997), vnikají do nich a mění se v trofozoity. Nezanořují se však do cytoplazmy (jako kokcidie), ale zůstávají pod buněčnou membránou v parazitoformní vakuole a prominují do lumen střeva. Způsob vniknutí do enterocytu je také odlišný od vnikání jiných parazitických protozoí do buněk. Kryptosporidie působí změny v mikrovilech enterocytů; ty se prodlužují, obklopí sporozoit a vzájemně splynou, čímž kryptosporidii uzavřou v parazitoformní vakuole. Tuto intracelulární- extracytoplasmatickou lokalizaci si kryptosporidie zachovávají s velmi krátkými přestávkami strávenými v lumen, po celou dobu endogenní fáze životního cyklu. Kryptosporidie mají tzv. „feeder“ organelu, které se dříve přisuzovala zásadní úloha pro příjem potravy (živin). Dnes se o tom pochybuje a funkce organely zůstává nejasná (Umemiya et al. 2005). Trofozoiti se nepohlavně dělí merogonií: výsledkem jsou meronti I. typu obsahující 8 merozoitů. Po uvolnění napadají meronti další buňky a tato část cyklu se buď několikanásobně opakuje, nebo vznikají meronti II. typu obsahující pouze 4 merozoity. Z nich v procesu gametogonie vznikají makrogamonty a mikrogamonty se 16 pohyblivými mikrogametami. Vzniklé makrogamety a mikrogamety po uvolnění do lumen splývají, vzniká zygota a z ní oocysta s jedinou tetrazoickou sporocystou (Fayer 1997)

Obrázek 1.: Životní cyklus rodu *Cryptosporidium*, (Fayer 1997)



1.1.4. Patogeneze, symptomatika, léčba

Při nákaze se kryptosporidie vyskytují především v zažívacím traktu, kde atrofují vily střeva a snižují počet epiteliálních buněk (Tzipori 1983). Takové střevo pak není schopné absorbovat vodu a důležité živiny z tráveniny. Obnažená střevní stěna je více náchylná na působení trávicích enzymů a žluč má za následek dráždění střeva. To vše přispívá k dehydrataci a vzniku vodnatých průjmů (Guerrant 1997).

Kryptosporidióza se kromě nekrvavých, vodnatých průjmů projevuje u imunokompetentních jedinců také bolestmi a křečemi v břiše, nechutenstvím (anorexií), zvracením, váhovým úbytkem a horečkami (Guerrant 1997).

Při kryptosporidióze můžeme rozlišit čtyři fáze vývoje této nákazy. Nejdříve nastává prepatentní perioda, trvající 4- 6 dní, při vysoké infekční dávce pouze 3 dny. Infekční dávka byla u dospělého člověka odhadnuta na 30 až 100 oocyst (Du Pont et al. 1995), není ale bohužel známa infekční dávka pro děti a imunosuprimované pacienty (tj. pacienty s rakovinou, jedince po transplantacích, pacienty po chemoterapiích atd.). Předpokládá se, že infekci může způsobit i jediná oocysta (Casemore et al. 1997). Je také známo, že i velmi malá koncentrace působící po delší dobu může představovat významné riziko nákazy (Perz et al. 1998). Po prepatentní periodě nastupuje perioda patentní, trvající 6- 18 dní. O něco kratší je perioda vodnatých průjmů, která v typických případech trvá kolem 4- 10 dní a po ní již dochází k samovolnému vyléčení. U některých jedinců může infekce proběhnout bez patentních příznaků (Fayer et Xiao 2008).

Závažnější průběh má kryptosporidióza u imonodeficientních a imunosuprimovaných jedinců a u dětí, neboť se jejich imunitní systém nedokáže účinně bránit proti nákaze kryptosporidiiemi. Komplikace mohou nastat také jedincům s nemocemi diabetes, nebo se stavy typu těhotenství či alkoholismus (Carr et al. 1998).

U imunosuprimovaných a imunodeficientních pacientů dochází k diseminaci parazita do jiných orgánů, které mají epiteliální buňky, jako např.: do dýchacího ústrojí, kde dochází k patologickým změnám, kdy se mukózní epitel stává granulárním a uzlíkovitým (Godwin 1991). Rozdíly se projevují již na buněčné úrovni: v mnohem větší míře je kolem infikovaných buněk pozorována zánětlivá infiltrace. Patentní perioda se prodlužuje na mnoho týdnů i měsíců. V tomto období se střídají průjmové fáze s relativně klidnými fázemi, kdy jsou kryptosporidie přítomny ve formované stolici. Onemocnění je chronické a nejeví tendenci k samovolnému vyléčení. Právě v tomto období často dochází k diseminaci parazita do jiných orgánů. Nejdříve se šíří do dalších úseků gastrointestinálního traktu, kraniálním (duodenum, gaster, oesophagus) nebo kaudálním (caecum, colon, rectum) směrem. Postihnout pak může sliznici žlučových, vývody pankreatu a dýchací trakt (Casemore et al. 1994).

Průběh onemocnění závisí na stupni imunodeficiency. U těžkých případů, např. u pacientů s rozvinutým AIDS dochází ke generalizaci a ke smrti následkem metabolického rozvratu (Carr et al. 1998). Je proto nutné, aby tito pacienti pečlivě dodržovali všechny zásady hygieny a vyhýbali se pití vody přímo z vodovodních kohoutků (Arrowood et Sterling 1997).

V současné době se používá několik metod k tlumení, popřípadě k léčbě kryptosporidiózy. U imunokompetentních pacientů se používá symptomatická léčba, především dehydratace organismu. Diskutuje se rovněž o specifické terapii, ale jednak dosud spolehlivá léčba neexistuje, jednak v době stanovení diagnózy již většinou příznaky onemocnění samovolně končí. Složitější je situace u imunodeficientních pacientů. I zde lze průběh ovlivňovat především symptomy (hydratace, doplňování elektrolytů). Imunoterapie sice vede k oddálení diseminace, ale vzhledem k náročnosti a ceně se nepoužívá v širokém měřítku. Nejlepších výsledků se dosahuje léčbou samotné HIV infekce, při které se dlouhodobě udržuje stav imunitního systému na přijatelné úrovni. Objevují se také informace o léčebných účincích nitrazoxanidu. Zajímavé je použití tzv. probiotických bakterií při tlumení, popřípadě léčbě kryptosporidiózy. Metabolity *Lactobacillus acidophilus* a *L. reuteri* snižují infektivitu *C. parvum* a *C. hominis in vitro*. Podávání těchto laktobacilů telatům redukuje počty oocyst v jejich trusu. Další slibná metoda tlumení kryptosporidiózy byla vyzkoušena u telat. Spočívá v perorální vakcinaci oocystami *C. parvum* ozářenými γ zářením, po které se vyvinula protektivní imunita. Jako u všech infekcí s fekálně- orálním transportem i u kryptosporidiózy spočívají způsoby jejího tlumení v hygienických opatřeních. Cílem těchto opatření je zamezit kontaminaci povrchových vod splašky obsahujícími lidské i zvířecí fekálie (Ditrich et al. 2005).

1.1.5. Epidemiologie

Kryptosporidie se šíří fekálně-orálním transportem (Smith 1993). Musí tedy být pohlcneny ústy nebo vdechnuty, aby způsobily infekci.

Prostředníkem mezi parazitem a hostitelem je v mnoha případech voda, kterou parazit využívá ke svému šíření a infekci hostitele. Hlavní podíl na kontaminaci vody oocystami kryptosporidií mají především hospodářská zvířata, splachy z polí hnojených dobytčím trusem a odpadní voda z lidských sídel (Madore 1987). Epidemie pocházející z vody způsobují paraziti, kteří mají životní stádia velmi odolná vůči působení vnějších vlivů.

Člověk se může kromě požití vody nebo potravy (např. mořští mlži jsou účinní filtrátoři, na jejichž žábrech se zachycují oocysty kryptosporidií a jejich nesprávnou tepelnou úpravou se zvyšuje riziko přenosu kryptosporidiózy na člověka) nakazit kontaktem s infikovanými lidmi či zvířaty nebo kontaktem s výkaly nakažených jedinců (O'Donoghue 1995). V menší míře byly jako zdroje infekcí zjištěny nepasterizované mléko, jogurty, tepelně neupravené masné výrobky, zelenina- hlávkové saláty do hamburgerů nebo ovoce- jablečné mošty (Smith et al. 2007). Tyto kontaminované potraviny a voda uchovávané v ledničce představují velké riziko infekce (Smith 1993, Millard et al. 1994, Laberge et al. 1996). Oocysty mohou být přeneseny rovněž při pohlavním styku, kdy se jedinci dostávají do kontaktu s okolím řitního otvoru a s výkaly nakažených jedinců. Tento způsob přenosu se uskutečňuje především u homosexuálně orientovaných jedinců. (Soave et al. 1984). Oocysty kryptosporidií se dají nalézt také na toaletách, jatkách, v odpadcích, ve zdechlinách zvířat a kanalizačních splašcích. Celkově je ale voda nejzávažnějším zdrojem nákazy (Fayer 2004).

Velmi významným epidemiologickým faktorem je schopnost klidových stádií odolávat vlivům vnějšího prostředí, neboť je jejich vnější vrstva chrání před mnoha nepříznivými podmínkami okolního prostředí. Od ní se odvíjí možnost přenosu z jednoho hostitelského druhu na jiný. Střevní druhy kryptosporidií jsou mnohem lépe přizpůsobeny k dlouhodobému přežívání v nepříznivých podmínkách vnějšího prostředí, při současném zachování infekčnosti, než druhy žaludeční. Je to tedy jeden z důvodů, proč jsou tyto druhy nejčastější příčinou kryptosporidiózy u lidí. (Ditrich et al. 2005).

První případy onemocnění zvířat kryptosporidiózou (krávy trpící průjmovým onemocněním) se vyskytly roku 1971 (Panciera et al. 1971). V roce 1976 se objevil první případ onemocnění člověka. Jednalo se o tříletou holčičku z vesnice v Tennessee, která trpěla po dva týdny gastrointestinálními potížemi (Meisel et al. 1976, Nime et al. 1976). Od té doby se začala kryptosporidióza podrobněji zkoumat. S tím je spojen počátek mapování tohoto parazita a s ním souvisejících epidemií.

Tab. 2.: Přehled epidemií kryptosporidiózy v letech 1984- 2007 (Upraveno dle Karanis et al. 2007, Fayer et Xiao 2008, Persson et al. 2007)

Rok/ Měsíc	Země	Počet případů
Květen- Červenec, 1984	Braun Station, Texas, USA	2, 000
Květen- Červen, 1986	Sheffield, UK	537
1987	Los Angeles	120
Leden- Únor, 1987	Carrolton, Georgia, USA	13, 000
Duben, 1988	Ayshire, UK	stovky lidí
Prosinec, 1988- Duben, 1989	Swindon a Oxfordshire, UK	516
Leden- Červen, 1989	Loch Lomond, UK	442
Únor- Květen, 1989	SE Thames, UK	65
Prosinec, 1989- Květen, 1990	Humberside, UK	477
Srpen, 1991	Berks Country, Pennsylvania, USA	551
Únor- Květen, 1992	Jackson Coutry, Oregon, USA	15, 000
Červen- Listopad, 1992	Torbay, UK	108
Červen- Září, 1992	Lena Coutry, Oregon, USA	500
Listopad- Prosinec, 1992	Bredford, UK	125
Listopad, 1992- Únor, 1993	Warrington, UK	1, 840
Březen, 1993	Kitchener- Waterloo, Ontario, Kanada	23, 900
Březen- Duben, 1993	Miwaukee, Wisconsin, USA	403, 000
Prosinec, 1993- Květen, 1994	Clark Coutry, Nevada, USA	103
Červenec, 1994	Motel, Missouri, USA	101
Červenec- Srpen, 1994	Lake Nummy, New Jersey, USA	2070
Pozdní Léto, 1994	Building Hiratsuka, Kanagawa, Japan	461
Srpen- Září, 1994	Walla Walla, Washington, USA	134
Srpen- Prosinec, 1994	Thames Wessex, Oxford, UK	224
Leden- Únor, 1995	Drug rehabilitation community, Itálie	294
Červenec, 1995	Water Park, Georgia, USA	5, 449
Červenec- Srpen, 1995	Torbay, UK	575
1996	British Columbia, Kanada	4, 000
1996	Clovis, California, USA	500
Leden, 1996	UK	126
Únor, 1996	Collingwood, Ontario, Kanada	189
Březen- Červen, 1996	Cranbrook, British Columbia, Kanada	> 2, 000
Červen, 1996	Saitama, Japonsko	8, 705
Srpen, 1996	California, USA	3000
Únor, 1997	Shoal Lake, Ontario, Kanada	> 100
Únor- Duben, 1997	Hertfordshire, Londýn, UK	345
Květen- Červen, 1997	UK	346
Červen- Červenec, 1997	Minnesota Zoo, Minnesota, USA	369
Prosinec, 1997- Duben, 1998	New South Wales, Austrálie	1, 060
1997- 1998	Nový Zéland	> 300
Červen, 1998	Subdivision, Texas, USA	1, 400
Duben- Květen, 1999	England, UK	347
Duben- Květen, 2000	Belfast, Irsko	129
Červen, 2000	Nebraska, USA	225
Červen, 2000	Private swim club, Ohio, USA	700
Červen, 2000	Swimming beach, Minnesota, USA	220

Srpen, 2000	Belfast, Irsko	117
Srpen, 2000	Colorado, USA	112
Březen- Květen, 2001	Battleford, Saskatchewan, Kanada	5, 800- 7, 100
Duben- Květen, 2001	Belfast, Irsko	230
Květen- Červen, 2001	Hotel Majorca, Španělsko	112
Červen, 2001	UK	152
Červenec, 2001	Illinois	358
Srpen, 2001	Baden- Wuerttemberg, Německo	200
Září, 2001	Dracy le Fort Coutry, Francie	563
Červenec, 2002	Massachusetts	767
Červen, 2003	Kansas	617
Červenec, 2003	Majorca, Španělsko	142
Červen, 2004	Ohio	160
Září, 2004	California, USA	336
2005	North West Wales	231
2006	South Carolina	123
Září, 2007	Idaho, Utah, USA	2, 000
Říjen, 2007	Oslo, Finsko	6, 000

U nás dosud k žádné velké epidemii kryptosporidiózy nedošlo, vyskytly se pouze jednotlivé případy u imonodeficientních pacientů a dětí (Chmelík et al. 1998).

Do roku 1997 bylo v ČR doloženo 42 případů kryptosporidiózy. V letech 1997–99 bylo zaznamenáno pouze 10 případů kryptosporidiózy, mezi které však bylo zahrnuto i 6 případů onemocnění způsobené parazitem *Cyclospora cayetanensis*. Pro srovnání: počet kryptosporidióz za roky 1995–96 v Anglii a Walesu přesáhl 9 tisíc. Skutečnosti, že je u nás kryptosporidióza rozšířena daleko méně, nasvědčují výsledky výzkumu z nemocnice v Českých Budějovicích, kdy bylo u dětí hospitalizovaných s průjmovým onemocněním (věk 2–36 měsíců), *Cryptosporidium* příčinou 11 % případů (Pumann 2000). Práce Gabriely Půžové z roku 1999, která byla zaměřená na riziko výskytu *Giardia intestinalis* a *Cryptosporidium parvum* v našich vodách, skutečně potvrdila, že jsou oocysty kryptosporidií v našich pitných vodách běžně k nalezení. Vzorky byly odebírány na několika místech republiky, a to nejen ze zdrojů pitných vod, ale i z čistíren odpadních vod a ze surových vod (Půžová 1999).

Je těžké odhadnout, proč je v České republice tak malý výskyt kryptosporidiózy. Absence epidemií může souviset se vzácností výskytu *C. hominis*. Pokud by se zde vyskytl druh *C. parvum*, hrozí tu riziko nákazy pro děti ve věku do tří let, u kterých tento druh způsobuje časté infekce. Běžnými oblastmi, ve kterých se můžeme s kryptosporidiemi setkat jsou proto mateřské školy, neboť děti obvykle nedostatečně dodržují hygienu (Guerrant 1997). Velmi malá množství zjištěných epidemií u nás, mohou mít souvislost také s nedostatečným proškolením lékařů a nedostatečným zájmem zjišťovat původ průjmových onemocnění pacientů, neboť je zde na tuto problematiku brán velmi malý zřetel, na rozdíl od jiných zemí, kde jsou průjmová onemocnění téměř vždy vyšetřována na přítomnost střevních patogenů.

2.1. Kryptosporidie jako patogen šířený vodou

2.1.1. Patogenní eukaryota ve vodách

Voda je zdrojem mnoha patogenních eukaryot, zvláště těch, kteří se šíří fekálně- orální cestou. Podle antigenní charakteristiky pochází mnoho infekcí od zvířat, zároveň ale existují případy pocházející velmi pravděpodobně z vody (Fayer 1997). Člověk se nejčastěji nakazí kontaktem zvíře- člověk, člověk- člověk, koupáním se v kontaminované vodě nebo vypitím či požitím kontaminované vody nebo jídla (Smith 1993, Millard et al. 1994, Laberge et al. 1996), neboť se i v dnešní době hnojí některé zemědělské plodiny výkaly hospodářských zvířat. Je-li hnojivo kontaminováno patogeny a úroda není důkladně opláchnuta desinfekcí, hrozí zde riziko nákazy (Guerrant 1997). K infekci stačí přítomnost menšího množství silně infekčních oocyst nebo cyst patogenů, jedinci se pak snadno nakazí (Casemore et al. 1997).

Tab. 3.: Významní patogenní eukaryota, bakterie a houby ve vodách (Upraveno dle Karanis 2006, Ditrich et al. 1998)

říše	kmen	třída	řád	rod	druh
Amoebozoa	Conosa			<i>Entamoeba</i>	<i>histolytica</i>
Amoebozoa	Lobosa		Acanthopodida	<i>Acanthamoeba</i>	spp.
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	<i>Salmonella</i>	spp.
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	<i>Shigella</i>	sp.
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i>
Excavata	Percolozoa	Heterolobosea	Schizopyrenida	<i>Naegleria</i>	<i>fowleri</i>
Excavata	Metamonada	Retortamonadida		<i>Chilomastix</i>	<i>mesnilli</i>
Excavata	Metamonada	Diplomonadida		<i>Giardia</i>	<i>intestinalis</i>
Chromalveolata	Apicomplexa	Coccidea	Eucoccidiorida	<i>Cyclospora</i>	<i>cayetanensis</i>
Chromalveolata	Apicomplexa	Coccidea	Eucoccidiorida	<i>Isospora</i>	<i>belli</i>
Chromalveolata	Apicomplexa	Coccidea	Eucoccidiorida	<i>Neospora</i>	
Chromalveolata	Apicomplexa	Coccidea	Eucoccidiorida	<i>Sarcocystis</i>	sp.
Chromalveolata	Apicomplexa	Coccidea	Eucoccidiorida	<i>Toxoplasma</i>	<i>gondii</i>
Chromalveolata	Apicomplexa	Cryptosporidea		<i>Cryptosporidium</i>	<i>parvum</i>
Chromalveolata	Ciliophora	Litostomatea		<i>Balantidium</i>	<i>coli</i>
Opisthokonta	Microspora	Haplophasea		<i>Enterocytozoon</i>	<i>bieneusi</i>
Opisthokonta	Microspora	Haplophasea		<i>Encephalitozoon</i>	<i>cuniculi</i>
Opisthokonta	Microspora	Haplophasea		<i>Encephalitozoon</i>	<i>intestinale</i>

K nejdůležitějším z těchto eukaryot, vzhledem k četnosti infekcí a k jejich častému výskytu v povrchových zdrojích, patří kryptosporidie a giardie (Rose et al. 1997). V současné době se v České republice v pitné vodě hojněji vyskytuje *C. parvum* než *G. intestinalis* (Dolejš et al. 1999). Výskytem oocyst ve vodě však nejsou ohroženy jen zdroje povrchové, ale i značná část zdrojů podzemních. Např. při monitorování podzemních vod v USA bylo zjištěno, že nejvíce jsou kontaminovány infiltrační galerie (výskyt oocyst v 50 %) a horizontální studny (45 %) (Pumann 2000).

Velmi častým místem výskytu oocyst kryptosporidií jsou výkaly infikovaných hostitelů, ze kterých se mohou díky půdním bezobratlým nebo koprofágnímu hmyzu šířit dále (Graczyk et al. 1999, Graczyk et al. 2004). Nejlepšími rezervoáry infekce jsou výkaly malých dětí a zvířat, zvláště hospodářských (Guerrant 1997).

Z převažujícího bovinního genotypu *C. parvum*, lze usoudit, že hlavním zdrojem kontaminace jsou zemědělské podniky a zemědělsky využívané lokality, kde se chová dobytek, hnojí pole atd. (Ditrich et al. 2005). Důležitým činitelem, který může značně zvýšit počty oocyst v těchto lokalitách je povodeň nebo zvýšení dešťových srážek, které do nádrží přináší vodu z rozsáhlých zaplavených území (Madore et al. 1987, Zuckermann et al. 1997). Množství takto odplavených oocyst je ovlivněno sklonem půdy, vegetačním krytem (jenž výrazně omezuje vyplavování oocyst) a právě intenzitou dešťových srážek (Jenkins et al. 2002).

Výskytem kryptosporidií a giardií v České republice se zabývala Gabriela Půžová. Z výsledků její bakalářské práce vyplývá, že výskyt kryptosporidií je v našich vodách běžný a neliší se od údajů z jiných zemí, podobně je to i s výskytem oocyst. Naopak výskyt giardií je u nás oproti jiným zemím podstatně nižší, počty cyst se ale příliš neliší (Půžová 1999).

V mnoha zemích je výskyt kryptosporidií ve vodách monitorován, vyšetřována je surová i pitná voda. Oocysty jsou ve vodách nacházeny poměrně často, různé prameny uvádějí jejich přítomnost až v 80 % vyšetřovaných vzorků s koncentrací až 363 tisíc oocyst na 100 litrů vody (Zuckerman et al. 1997).

2.1.2. Metody využívané k detekci oocyst

Detekce oocyst se v laboratorních podmínkách provádí několika metodami. Některé se soustřeďují na zjišťování přítomnosti oocyst, jiné na jejich životaschopnost, další dokáží určit oocysty do druhů. Nejběžněji se používají metody: barvení **DAPI** (4', 6-diamidino-2-phenylindole) a **PI** (propidium iodide), **DFA** (direct fluorescent antibody), **ELISA** (Enzyme-Linked immunosorbent assay), **FCMA** (fluorescein- conjugated monoclonal antibody), **FISH** (fluorescent *in situ* hybridization), **IFA** (immunofluorescence assay), **IFAT**

(immunofluorescence antibody technique), **IMS** (immunomagnetic separation), **metoda 1623**, **PCR** (polymerase chain reaction) a **histologická vyšetření**.

DAPI je barvivo, které se váže na úseky bohaté na adenin a thymin. Je excitováno v UV oblasti a emituje modré světlo. **PI** je barvivo kvantitativně se vmezeřující do šroubovice. Je excitováno v modrozelené oblasti světla a emituje červené záření. Fluorescenční značka je pak excitována světlem o takové vlnové délce, kterou propustí příslušný filtr zabudovaný v mikroskopu.

K vyhodnocení preparátu se používá fluorescenční mikroskop. PI je cenný indikátor membránové integrity, protože pouze přechází přes buněčné membrány (Fayer et al. 2000, Méndez- Hermida et al. 2006).

Metoda **DFA**, vynalezená roku 1977, využívá vazby mezi antigenem a protilátkou, značenou fluoresceinem. Výhodou této metody je její rychlost, nevýhodou je nižší senzitivita (Garcia et al. 1992).

ELISA (Enzyme- Linked immunosorbent assay) je jednou z nejpoužívanějších metod sloužící k detekci protilátek. Může sloužit také k detekci antigenu. Metoda je založena na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní rovněž detegovat i antigen. ELISA využívá schopnosti proteinů vázat se na povrch umělých hmot a schopnosti vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul (Tijssen 1985).

FISH je kombinací cytogenetických a molekulárních metod. Jejím podstatou je hybridizace neboli navázání DNA sondy k chromozomální DNA vyšetřovaného vzorku. Sonda představuje malý fragment DNA značený fluorescenčním barvivem, který se váže na specifické místo chromozomu. Pomocí FISH lze odhalit nebo upřesnit drobné delece, duplikace, translokace nebo diagnostikovat buněčné linie. Tato metoda umožňuje odhalit životaschopné oocysty *C. parvum* nebo cysty *G. intestinalis* od neživých, dále umožňuje identifikaci patogenů do druhů a zjištění jejich životaschopnosti (Nowosad et al. 2006).

Identifikace oocyst kryptosporidií ve vzorcích se provádí především metodou **IFA**, neboli metodou nepřímé imunofluorescentní analýzy (Xiao et al. 2004). Metoda IFA poskytuje určení do rodu *Cryptosporidium*, technika PCR pak poskytuje identifikaci přímo do druhů (Goméz-Couso et al. 2006).

IFAT je sérologická metoda nepřímé imunofluorescence sloužící k průkazu antigenu nebo specifických protilátek (Camargo 1973).

IMS- imunomagnetická separace- je založena na vzniku vazby cílových buněk na magnetické částice s imobilizovanými protilátkami. Vzniklý komplex lze separovat pomocí vnějšího magnetického pole. Doba separace se pohybuje kolem 2 až 3 hodin (Engstrand et Enroth 1995).

Metoda 1623 byla jedna z prvních metod, která dokázala identifikovat patogeny ve vodách. Byla vyvinuta pro zachycování a oddělování vodních patogenních organismů převážně *Cryptosporidium* a *Giardia*. Celý proces zahrnuje několik fází: filtraci, IMS- k oddělení oocyst a

cyst ze získaného materiálu, IFA- ke stanovení koncentrací oocyst a cyst, barvení DAPI a PI a nakonec prohlížení vzorků pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Tato metoda dokáže identifikovat patogeny do rodů, ne však do druhů. (USEPA 1999).

Histologická vyšetření umožňují přesnou lokalizaci oocyst v tkáních. Při těchto vyšetřeních byly oocysty nalezeny v sifonu, žábrech, žaludku a zažívacím traktu měkkýšů (Gómez- Couso et al. 2004).

Poslední a velmi slibnou metodou usnadňující stanovení oocyst kryptosporidií je vyšetření výplachu žaber mlžů nasbíraných na dané lokalitě. Při sledování filtrace oocyst kryptosporidií mlži bylo zjištěno, že oocysty jsou velmi účinně zachycovány na žábrech mlžů a zároveň odstraňovány z vody. Vyšetření žaber relativně malého vzorku mlžů by mohlo nahradit mnohonásobně časově i finančně náročnější zkoumání velkého objemu vod. Použití tohoto indikátoru navíc umožňuje nejen zmapování okamžitého stavu, ale vypovídá i o situaci v delším časovém úseku (Ditrich et al. 2005).

Detekce oocyst kryptosporidií pomocí světelné mikroskopie a morfologické identifikace prokázala nespolehlivost v několika případech. Oocysty může být složité detekovat, kvůli jejich malé velikosti a může být také těžké identifikovat oocysty do druhů, neboť se často vyskytují stejné morfologické znaky. Např. *C. hominis* a *C. parvum* jsou od sebe téměř nerozeznatelné a je také těžké rozlišit je od např. *C. meleagridis* či od *C. canis* (Gomez- Bautista et al. 2000, Xiao et al. 2000). Jiné barvicí metody mají nízkou senzitivitu a specifitu. Dále je obtížné rozlišit oocysty od ostatních malých částic, které mohou být přítomny ve vzorcích.

Zkoumání hemolymfy nebo tkáně měkkýšů na přítomnost oocyst, může být úspěšně provedeno také pomocí imunofluorescence (Bajer et al. 2003, Fayer et al. 2000, Fayer et al. 2002, Graczyk et al. 1998). U metod založených na protilátkách mohou nastat problémy ohledně mikroorganismů a částic materiálu, které mají různou velikost a které se mohou objevit jasně fluorescentní, stejně jako oocysty kryptosporidií. Nejspolehlivější technikou na rozlišení druhů rodu *Cryptosporidium* proto zůstává molekulární charakteristika. (Traversa et al. 2004).

Z výsledků studie vedené Millerem, která porovnávala metody DFA a IMS, které se používají k vyšetření zažívacího traktu mlžů na přítomnost oocyst *C. parvum*, vyplývá, že i tyto metody v kombinaci s PCR mohou podávat spolehlivé výsledky (Miller et al. 2005).

Při použití metod IFA a PCR bylo z několika studií jednoznačné, že spolehlivější metodou detekce přítomnosti oocyst *C. parvum* je metoda IFA (Gómez- Couso et al. 2006), což bylo potvrzeno také při výzkumu detekce oocyst z mlžů *Corbicula* spp. a *Mytilus* spp. (Miller et al. 2005).

2.2. Přehled různých skupin bezobratlých a jejich kontakt s oocystami kryptosporidií

2.2.1. Nálevníci (Ciliophora)

Nálevníci (z říše Chromalveolata) žijí převážně volně, někteří jsou mutualisti nebo komenzálové přežvýkavců, jiní žijí paraziticky. Tvoří důležitou složku potravních řetězců, jsou indikátory znečištění vody a podílejí se na samočisticích pochodech ve vodním prostředí. Mají buňky s nejsložitější stavbou mezi všemi organismy.

Nálevníci patří mezi jednobuněčné, kteří mají tělo kryté pelikulou. Vyvinuly se u nich stálé trávicí orgány. K příjmu potravy slouží nálevníkům buněčná ústa (cytostom), která jsou umístěna na povrchu těla, v prohlubni (atrium), v dutině (vestibulum) nebo v ústní dutině vybavené specializovanými skupinami brv. Existuje i příústní prohlubeň. U některých druhů je ústní dutina na předním konci rozevřena v tzv. příústním poli (infundibulum). Cytostom je umístěn terminálně, tj. na konci těla nebo na břišní (ventrální) straně. Potravou nálevníků jsou drobné mikroorganismy, které jsou do úst přiháněny vířením brv. Potrava dále pokračuje buněčným hltanem (cytopharynx) dovnitř buňky (Říhová- Ambrožová 2007).

Samotné trávení probíhá v potravních vakuolách (fagozomech), které se v cytoplasmě pohybují po určité dráze, označované jako cyklóza. V blízkosti buněčného jádra se pohyb potravní vakuoly výrazně zpomaluje. Potravní vakuola vzniká vlečením buněčné membrány do cytoplazmy, poté splývá s lysozomem, s měchýřkem naplněným trávicími enzymy, které umožňují trávení. Stěny potravní vakuoly vybíhají v podobě klků do jejího nitra, kde obklopují a posléze odškrcují produkty trávení z vakuoly do cytoplazmy. Potravní vakuola se v důsledku toho zmenšuje, až v ní nakonec zůstanou pouze nestrávené zbytky. Ty mohou být vyvrženy buď na kterémkoliv místě těla, nebo potravní vakuola praskne v blízkosti místa zvaného buněčná řiť (cytopyge) a svůj obsah vyvrhne tímto otvorem mimo tělo (Buchar 1992).

Potrava nálevníků je velmi rozmanitá, živí se sinicemi, rozsivkami, řasami, částicemi organické hmoty i jinými eukaryoty (Jelínek et Zicháček 2000).

2.2.2. Interakce mezi nálevníky a oocystami kryptosporidií

Nálevníci se řadí mezi skupinu živočichů, kteří pohlcují i jiná eukaryota, mezi něž patří také kryptosporidie. Díky přítomnosti trávicí vakuoly s enzymatickým obsahem, by nálevníci mohli být schopni oocysty také degradovat, čímž by snižovali počet životaschopných, tedy infekčních oocyst ve vodách (Stott et al. 2001).

Jak již bylo prokázáno v laboratorních podmínkách, některé druhy eukaryot skutečně oocysty kryptosporidií pohlcují (Stott et al. 2001). Nejprobádanějším je treпка *Paramecium caudatum*, která dokáže pozřít až 170 oocyst za hodinu. Kromě toho byl také prokázán vztah mezi velikostí těla predátora a průměrným množstvím pozřených oocyst (Bichai et al. 2008). Je možné, že některé oocysty jsou svými predátory stráveny a poté vyloučeny. Úspěšnou metodou, která detegovala fragmenty buněčné stěny uvnitř trávicí vakuoly, byla metoda IFA. U nálevníka *Stylonychia mytilus* bylo díky této metodě pozorováno vylučování částic, obsahujících velké množství oocyst, jejichž životaschopnost bohužel určena nebyla (Bichai et al. 2008).

Jednou z prvních prací, která se soustředila právě na volně žijící eukaryota a jejich schopnost pohlcovat oocysty, byla studie Stotta a jeho kolektivu. Soustředili se zejména na predační aktivitu nálevníků, která by mohla být vhodným mechanismem pro odstraňování oocyst kryptosporidií z volného prostředí. Při experimentu v laboratorních podmínkách, vystavili *Euplotes patella*, *S. mytilus*, *P. caudatum* a další druhy nálevníků dávkám obsahujícím 10^5 – 10^6 oocyst/ ml po dobu 5 až 60 minut. Predační aktivita pak byla zjištěna výpočtem fluorescenčně označených oocyst, za použití epifluorescenční mikroskopie. Stott et al. zjistili, že jsou oocysty pohlcovány všemi druhy nálevníků. Největší predační aktivita byla zjištěna u druhu *P. caudatum* (170 oocyst/ ml), následován byl druhem *S. mytilus* (60 oocyst/ ml). Menší hodnoty predační aktivity byly zjištěny u dalších druhů a také u druhu *E. patella* (4–10 oocyst/ ml) (Stott et al. 2001).

O dva roky později se Stott a jeho kolegové opět zabývali problematikou týkající se predace volně žijícími eukaryoty, tentokrát však jako organismů přenášejících a odstraňujících oocysty kryptosporidií z vodních ekosystémů. Pro tento průzkum byli použiti volně žijící nálevníci (*S. mytilus*, *P. caudatum*) a améby (*Acanthamoeba culbertsoni*), kteří byli vystaveni různým dávkám oocyst *C. parvum*. Z výsledků vyplynulo, že všechny zkoumané organismy oocysty opět pohlcovaly. Parazitology zajímala především predační aktivita, množství pohlcených oocyst predátory a hustota predátorů. Největší predační aktivita byla pozorována u velkého nálevníka *P. caudatum*. Tito nálevníci byli vystaveni po dobu 20 minut 90–9000 oocyst *C. parvum*. Stott et al. stanovili, že jedinec pozřel v průměru 26,7 oocyst. Po hodině vystavení vysoké hodnotě oocyst, byla hodnota pozřených oocyst trepkou *P. caudatum* vyšší, než je lidská infekční dávka (30 oocyst) (Stott et al. 2003).

Nálevníci obývající vlhké půdy a *S. mytilus* při tomto pokusu pohltili stejné množství oocyst (v průměru 0,3 oocyst/ buňku). Améby po 2 hodinách pohltily přibližně 1,8 oocyst/ buňku (Stott et al. 2003).

2.2.3. Měňavky (Amoebozoa)

Měňavky jsou poměrně četní jednobuněční živočichové obývající především sladké bahnitě vody a velmi často vlhkou půdu. Někteří jsou symbionti nebo parazité různých živočichů. Jsou to ryze heterotrofní organismy, živí se masožravě i býložravě, převážně fagocyticky. Patří mezi živočichy, jejichž tělo není kryto pevnou pelikulou, potrava má podobu pevných částic, avšak trávicí orgány u nich nejsou vyvinuty. Potrava může být přijímána kterýmkoliv místem povrchu těla. Přitom se ektoplasma v okolí potravní částice vchlipuje a poté se od vlastního povrchu odškrtní. Mohou tomu napomáhat panožky, které potravu znehybní a pak obklopí. Tento způsob příjmu potravy se nazývá fagocytóza. Speciálním případem fagocytózy je pinocytóza, kdy je potrava v podobě roztoku přijímána nikoliv osmoticky, ale vchlipováním a následným odškracením ektoplasmy s kapičkou okolního roztoku s potravní suspenzí. Tito živočichové se živí bakteriemi nebo jinými eukaryoty (Říhová- Ambrožová 2007).

2.2.4. Interakce mezi měňavkami a oocystami kryptosporidií

Nejen volně žijící nálevníci, ale také améby, často pohlcují kromě rozmanité potravy, i jiná eukaryota. Jak již bylo dříve zjištěno, jsou améby také schopny pohlcovat oocysty kryptosporidií (Stott et al. 2003). Volně žijící améby jsou častými rezervoáry a přenašeči různých druhů bakterií jako např.: *Legionella*, *Chlamydia*, *Listeria*, *Pseudomonas* nebo *Mycobacterium* (Adékambi et al. 2006, Gómez- Couso et al. 2007). Améba *Acanthamoeba*, je všudypřítomný eukaryot, žijící v půdě, sladkovodním bentosu a domácích a industriálních vodních systémech. Tým vedený Gómez- Couso si pro svůj pokus vybrali právě tuto amébu. Za použití trofozoitů rodu *Acanthamoeba* se snažili demonstrovat schopnost améb pohlcovat oocysty. Trofozoiti byli získáni z přírodních zdrojů a kultivováni v laboratoři. Při pokusu byly prozkoumány dva vzorky vod, které byly získány ze dvou pramenů v oblasti Santiago de Compostela (Španělsko). Vzorky obsahující améby a oocysty, byly prohlíženy mikroskopem s fázovým kontrastem, díky němuž byly 12 hodin po inokulaci média odhaleny oocysty uvnitř trofozoitů. V průměru byly pozorovány 2 oocysty na jedince, v některých případech i oocyst 6. Docházelo tedy k pomalé eliminaci oocyst, přičemž na oocystách nebyly pozorovány žádné zjevné morfologické změny. V této práci bohužel nebylo zjištěno, zda trofozoiti tyto oocysty také degradují. Díky těmto zjištěním, by mohly mít améby vliv na kvalitu vody a zdraví obyvatel (Gómez- Couso et al. 2007).

Všechny tyto výsledky poukazují na to, že predace volně žijícími amébami může mít pozitivní efekt jak na odpadní vody, tak na klasické vodní zdroje, neboť eukaryota z těchto vod účinně

odstraňují oocysty kryptosporidií. Díky svému kosmopolitnímu rozšíření, by pak mohli být využiti ke snižování počtu oocyst z vodních ekosystémů v různých částech světa (Stott et al. 2003).

2.2.5. Vířníci (Rotifera)

Vířníci (Animalia, Ecdysozoa) patří mezi mikroskopické, bilaterálně symetrické živočichy obývající převážně vodní biotopy. Najdou se však mezi nimi i druhy žijící v mechu, v půdě, ve vlhkém opadu tropického lesa, popřípadě žijí přisedle. Tělo vířníků se obvykle skládá z hlavy, trupu (vlastního těla) a nohy (Buchar et al. 1995).

Hlavová část je opatřena vířivým ústrojím, sloužícím jako hnací orgán při pohybu a k přihánění potravy k ústnímu otvoru. Aparát je většinou složen ze dvou vířivých věnců (cingulum a pseudotrochus). Vířivé ústrojí může být různě modifikováno (Sedlák 2005).

Trávení vířníků probíhá většinou extracelulárně. Výjimkou jsou druhy sající např. obsah řas. Tyto druhy nepotřebují nakládat s nestravitelnou hmotou a nemají proto ani trávicí žlázy. Trávicí soustavu vířníků tvoří ústní otvor, ústní dutina, hltan (mastax), jícen, žaludek, střevo, kloaka a řitní otvor (Kleinow et al. 1991). Trávicí soustava ve skutečnosti nekončí řitním otvorem, ale kloakou, do které ústí i vejcovody a protonefridie, u některých končí slepě v žaludku (např. u rodů *Asplanchna*, *Ascomorpha* nebo *Asplanchnopus*). U samců většinou trávicí soustava chybí nebo je velmi zakrnělá.

Mastax, neboli velký zbytnělý hltan, tvoří pohyblivé kutikulární destičky a tyčinky, sloužící k uchopení a rozmělnění potravy (Bartoš 1959). Je složen ze dvou částí: kladívka (maleus) a kovadlinky (incus). Kladívko se skládá z násadce (manubrium) a čelistí (unci), kovadlinka se dále dělí na stopku (fulcrum) a kusadla (rami). U vířníků se rozlišuje 9 typů mastaxu, podle stavby a využití: typ malleátní, malleoramátní, ramátní, uncinátní, kardátní, virgátní, forcipátní, inkudátní a fulkrátní. U čeledi *Collothecidae* je navíc část mastaxu zvětšena v tzv. proventriculus, zásobní orgán určený k uskladnění získané potravy (Jelínek et Zicháček 2000). S trávením jsou spojeny i trávicí hydrolytické enzymy, které jsou vylučovány ze slinných žláz do mastaxu a z žaludečních žláz do žaludku a střeva. Slinné žlázy produkují vedle trávicích enzymů také sliz, který lepí potravní částice k sobě a zároveň umožňuje snadnější pohyb potravy trávicí trubicí (Kleinow et al. 1991).

Planktonní vířníci se živí převážně fytoplanktonem, periplanktonem, řasami, organickým materiálem, nálevníky, heterotrofními bičíkovci, bakteriemi, vířníky, malými perloočkami a detritem (Gons 1979, Arndt 1993, Jürgens et al. 1994, Theil- Nielsen et Søndergaard 1999).

Obecně lze říci, že filtrující druhy přijímají potravu o velikosti zhruba od 0,5 μm do 20 μm , dravé druhy potravu větší než 15 μm (Rothhaupt 1990).

Vířníci tvoří důležitou součást potravních sítí, ve kterých se podílejí na rychlém obratu biomasy (Herzig 1987). Další nezanedbatelnou roli hrají v přirozených procesech samočištění a čištění odpadních vod. Vířníci se využívají i jako modelový organismus v ekotoxikologických biotestech (Arndt 1993).

2.2.6. Interakce mezi vířníky a oocystami kryptosporidií

Vířníci patří mezi nejběžnější populace živočichů ve vodních ekosystémech, existuje více jak 200 druhů, z nichž se velká většina vyskytuje v Evropě (Dumont 1983) a také v Polsku (Bielańska- Grajner et al. 1997). Jsou kosmopolitně rozšířeni, nacházejí se ve sladkých i slaných vodách kde se živí rozmanitou potravou. V laboratorních podmínkách jsou schopni přijímat např. červené krvinky (Lindemann et Kleinow 2000), kvasinky (Sarma et al. 2001), umělohmotné kuličky (Ooms-Wilms et al. 1995) a oocysty kryptosporidií (Fayer et al 2000). Vířníci se v poslední době stávají velmi častým modelovým organismem, používaným k detekci patogenů ve vodě. Ne všechny druhy vířníků jsou však vhodné jako indikátory, neboť velikost těla a způsob predace, souvisí s velikostí pohlcovaných částic (Brooks et Dodson 1965, Rothhaupt 1990). Draví vířníci přijímají částice o velikosti od 15 μm a zřejmě by oocysty nepohlcovali, neboť se průměrná velikost oocyst u různých druhů kryptosporidií pohybuje okolo 5- 7 μm . Filtrující vířníci mají velikost potravních částic obecně v rozmezí od 0,5 μm do 20 μm ., z čehož vyplývá, že oocysty kryptosporidií svou velikostí odpovídají částicím běžně pohlcovaným filtrujícími vířníky (Rothhaupt 1990). Rychlost a účinnost filtrace vířníků je ovlivněna několika faktory jako jsou např. velikost potravních částic, jejich hustota, množství vířníků a jejich stáří, predací tlak na vířníky, čerstvost potravy a jiné (Stott et al. 2003, Lindemann et Kleinow 2000).

Skupina vedená Nowosadem ve své práci využila vířníků jako indikátorů vodních patogenů. K detekci patogenů použili dvě metody. První metodou byla přímá detekce, kdy byla k pozorování vodního sedimentu použita filtrace (metoda 1623). Voda byla dále vyšetřena použitím metod ZN (Ziehl- Neelsen) IFA, EIA a FISH k detekci oocyst a CSA (*Cryptosporidium* specific antigen). Druhá metoda byla nepřímá, kde byli použiti vířníci a EIA ke zjištění přítomnosti CSA a metoda FISH, použitá k detekci přítomnosti oocyst. Vířníci a vodní vzorky byli nasbíráni ze tří jezer v Polsku. Většina oocyst nalezená ve vířnících byla zjištěna metodou FISH, která je velmi citlivá a také snadnější než filtrace. Během jara byl téměř u všech vířníků nalezen CSA a také oocysty kryptosporidií. V letním a podzimním období byly nalezené oocysty

životaschopné, tudíž infekční. Všechny dominantní druhy vířníků, kteří požitím odstraňují oocysty z vody, mohou hrát roli v šíření oocyst mezi částmi potravního řetězce (Nowosad et al. 2006).

Fayer a jeho kolegové prováděli pokus se šesti rody vířníků: *Philodina*, *Monostyla*, *Epiphanus*, *Euchlanis*, *Brachionus* a *Asplanchna*, kteří byli vystaveni oocystám *C. parvum*, získaných z výkalů infikovaných telat. Oocysty označené FCMA a neoznačené oocysty byly přidány do suspenze a podávány vířníkům. Oocysty byly dále pozorovány mikroskopem s fázovým kontrastem a s fluorescencí. *Philodina* sp., *Euchlanis triquetra* a *B. quadridentalis* pohltily shodně stejně velké množství oocyst. Oocysty pohlcené druhem *Philodina* sp. byly pozorovány v dlouhé stočené trubici, zřejmě ve střevě, posteriorně od žvýkacího mastaxu. U *E. triquetra* a *B. quadridentalis* bylo v žaludku pozorováno přibližně 25 oocyst. Tam se ale smíchaly s ostatním pozřeným materiálem a proto nebylo možné stanovit jejich přesné množství. Menší množství oocyst bylo také nalezeno u *Monostyla* sp., *Asplanchna* sp. a *Epiphanus brachionus*. Poměrně velké množství oocyst, vtažených pomocí brv do corony, bylo zjevně odmítnuto. Většina oocyst byla ihned po pozření vyloučena. Doba trvání od pohlcení oocyst k jejich vyloučení trvala u těchto druhů přibližně 15 minut. U ostatních druhů vířníků se tato doba pohybuje okolo 15- 20 minut (Kuhle et Kleinow 1990). Nebylo ovšem zjištěno, zda jsou oocysty degradovány již během pohlcování nebo až v zažívacím traktu, kde by se na jejich degradaci mohly podílet trávicí enzymy (Kuhle et Kleinow 1990), které jsou schopny štěpit proteiny tvořící stěnu oocyst (Fayer et al. 2000).

Zda jsou oocysty prošlé trávicím traktem vířníků schopny infekce nebo nikoli, zjistila ve své práci až Petra Brůčková, která se zabývala interakcemi mezi vířníky a kryptosporidii v České republice. Jako modelový organismus využívala vířníky druhu *Brachionus calyciflorus*. Prokázala, že vířníci jsou nejen schopní filtrátoři, ale i likvidátoři oocyst kryptosporidií. Ze závěru její práce pak vyplývá, že oocysty prošlé trávicím traktem vířníků, již nejsou schopny další infekce a potvrdila, že by vířníci mohli být používáni v metodice pro vyšetřování přítomnosti oocyst ve vodách (Brůčková 2007).

Vířníci by díky těmto výsledkům mohli být využíváni pro monitorování kvality vody a k detekci znečištění povrchových vod patogeny (Sládeček 1983, Majewska et al. 2003). Oocysty kryptosporidií pozřené některými druhy vířníků se po celou dobu pozorování drží uvnitř těla. V některých vířnících byly pozorovány malé fluorescentní granule, což mohou být části stěny oocyst. Jak je patrné z práce Kuhle et Kleinow 1990, průchod oocyst trávicím traktem vířníků trvá přibližně 15- 20 minut, proto by bylo vhodné použít vířníky jako indikátory pro zjištění aktuálního stavu oocyst ve vodě (Brůčková 2007).

2.2.7. Hlístice (Nematoda)

Hlístice (Eukaryota, Opisthokonta, Animalia, Eumetazoa, Bilateria, Prostomia) jsou mořští, sladkovodní, půdní nebo parazitičtí živočichové s dlouhým protáhlým tělem, zúženým na obou koncích. Půdní hlístice jsou neobyčejně početné a podílí se na kvalitě půdy a hrají důležitou roli při koloběhu látek v půdě (Jelínek et Zicháček 2000).

Jejich trubicovitá trávicí soustava začíná ústním otvorem na předním konci těla. Ústní aparát je často opatřen pysky, papilami, ústní kapsulou, trny nebo kutikulárními zuby. Trávicí soustava dále pokračuje hltanem, který slouží k nasávání živin, do svalnatého nebo žlaznatého jícnu.

Během ontogeneze se vytvořily 3 typy jícnu- oxyuroidní, rhabditoidní a dorylamoidní. Pozřená potrava dále pokračuje dlouhým trubicovitým střevem a tělo opouští análním otvorem.

Potrava hlístic je velmi rozmanitá. Některé druhy ničí kořínky zemědělsky pěstovaných rostlin, jiné druhy se živí bakteriemi, houbami, mrtvou organickou hmotou nebo jinými hlísticemi.

Parazitické druhy mohou být nebezpečné pro člověka (Volf et al. 2007).

2.2.8. Interakce mezi hlísticemi a oocystami kryptosporidií

Volně žijící nematoda, mohou hrát roli v přenosu patogenů do prostředí. *Caenorhabditis elegans* je volně žijící nepatogenní půdní helmint z kmene hlístic. Žije v půdě po celém světě a je důležitým modelovým organismem, jehož výzkum začal v roce 1974. Tento druh, který se stal významným nástrojem molekulární a vývojové biologie, je v dnešní době často studován jako vhodný model pro studium možného přenosu oocyst *C. parvum*, se kterými může přijít v půdě do kontaktu (Bichai et al. 2008). Již v předchozích studiích bylo popsáno, že *C. elegans* a další volně žijící hlístice, mohou být potencionálními přenašeči gram- pozitivních a gram- negativních bakterií (Anderson et al. 2003). *C. elegans* rozšiřují, vylučováním životaschopných buněk, bakterie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria welshimeri* a *Bacillus cereus*, (Anderson et al. 2003) nebo bakterii *Clostridium*, která žije v mírně kyselých půdách (Lupi et al. 1995).

Huamanchay a jeho tým se snažili zjistit, zda může *C. elegans* sloužit také jako potencionální mechanický vektor pro přenos infekčních *C. parvum* a *Cyclospora cayetanensis* a zda může *C. elegans* pozřít, vyloučit a ochránit oocysty před vyschnutím. Sedmdesát z 85%

C. elegans pozřelo za 1- 2 hodiny od inokulace 0- 500 oocyst. Mnoho jedinců *C. elegans* pozřelo za 2 hodiny 101- 200 oocyst. Pozřené oocysty zůstaly v zažívacím traktu hlístic nedotčené, životaschopné a infekční, s možností excystace a uvolnění sporozoitů do zažívacího traktu hostitelů. Vyloučeny pak byly neporušené oocysty. Poté byla zjištěna infekčnost vyloučených

oocyst inokulací neonatálních myší. Hlístice, které obsahovaly oocysty a které byly vystaveny vysychání po dobu 1 dne, byly schopné myši infikovat, avšak samotné oocysty nebo samotné hlístice, které byly také vystaveny vysychání po stejnou dobu, neměly schopnost myši infikovat. Jedinci *C. elegans*, kteří v sobě měli oocysty *C. parvum*, měli schopnost infikovat myši dokonce i poté, co byli udržováni po dobu 7 dní ve vodě. Oocysty *Cyclospora* nebyly *C. elegans* pohlcovány (Huamanchay et al. 2004).

Je tedy zřejmé, že hlístice mají schopnost oocysty pohlcovat a zřejmě je i chránit před vysycháním i když *C. elegans* oocysty kryptosporidií spontánně nevyhledávají, ale pohlcují je náhodně s potravou. Přesto je problematika role volně žijících nematod a jejich schopnosti pohlcování oocyst stále ještě v začátcích a musí být ještě podrobněji prostudována (Huamanchay et al. 2004). Ačkoliv se do budoucna možná jeví vhodnější studovat hlístice jako vektory patogenních bakterií než jako vektory oocyst kryptosporidií, neboť rizika způsobená infekčními oocystami přenášenými uvnitř hlístic, jsou pravděpodobně velmi malá (Bichai et al. 2008).

2.2.9. Perloočky (Cladocera)

Perloočky (Animalia, Arthropoda, Crustacea, Branchiopoda) jsou drobní korýši, nacházející se ve velmi rozmanitých vodních prostředích. Obývají sladké vody, některé druhy žijí i v mořích, obvykle ve velkých množstvích, hojně obývají také vodní nádrže. Jsou důležitou složkou potravy ryb a jiných planktonofágních živočichů. Jejich význam pro vodní biocenózy je nenahraditelný. Biologický boj s planktonními sinicemi a řasami je možný především vytvářením účelových rybích sádek. Nanoplanktonní sinice a řasy jsou intenzivně odstraňovány především silnými populacemi větších perlooček, zejména druhy *Daphnia magna* a *Daphnia pulicaria* (Buchar 1992).

Trávicí soustava perlooček začíná ústním otvorem. Na rozhraní hlavy a těla se nachází labrum, párové silně sklerotizované mandibuly, párové maxily a labium. Potrava je do úst přiváděna 5 páry redukovaných, lupenitých, rozeklaných hrudních nožek (pereipody), které slouží k filtraci vody a k zachycování potravy. Komplexní pohyb těchto končetin vytváří stálý proud vody uvnitř schránky, kam přináší částice potravy, které jsou filtrovány a sbírány do centrální potravní rýhy. Potravní částice jsou pomocí příústních končetin dopraveny k ústnímu otvoru a zde jsou rozmělněny pomocí mandibul a poté pozřeny. Pokud k ústnímu otvoru pronikne příliš velká potravní částice, je odsunuta pomocí brv na 1. hrudních končetinách a pak „odkopnuta“ postabdomenem. Do ústní dutiny ústí čelistní žláza. Soustava dále pokračuje hltanem, jícnem, žaludkem a střevem s trávicí dutinou, které má pod mikroskopem zelenohnědé zbarvení. Střevo prochází tělem přímo a v hlavové části do něho ústí dvě hepatopankreatické žlázy. U většiny

perlooček prochází potrava střevem přibližně 15 až 60 minut. Strávené zbytky potravy opouští tělo řitním otvorem, který vyúsťuje mezi dvěma podélnými řadami trnů na zadečku (Jelínek et Zicháček 2000).

Mezi perloočkami se nachází dravci (Haplopoda, Onychopoda), kteří požívají vířníky nebo menší koryše, „mrchožrouti“ (*Pseudochydorus globosus*), ektoparaziti (*Anchistropus*) a filtrátoři (Anomopoda, Ctenopoda), kteří se živí bakteriemi, řasami, kvasinkami, eukaryoty, organickým detritem nebo coloidními organickými částicemi (Sedlák 2005).

2.2.10. Interakce mezi perloočkami a oocystami kryptosporidií

Je známo, že různé vodní organismy v sobě mohou hromadit a přenášet různé vodní patogeny a také oocysty kryptosporidií (Goméz- Couso et al. 2003, Graczyk 2003). Stejně tak je tomu i s perloočkami. Např. perloočka *D. carinata* dokáže za pomoci predace významně snižovat množství lidských patogenních bakterií *Campylobacter jejuni* (Schallenberg et al. 2005). Perloočky se snaží selektivně vybírat z vody částice, které by mohly být jejich potravou. Aktivně vyhledávají a pohlcují také oocysty kryptosporidií, čímž snižují jejich počet ve vodě (Rousková 2008). Zfiltrované oocysty jsou pak perloočkami velmi rychle vylučovány (Burns 1968).

Burns ve své práci popisuje vztah mezi velikostí těla a maximální velikostí částic, které mohou být perloočkami pohlceny. Bylo při ní použito 7 druhů Cladocer: *Daphnia magna* (Straus, 1820), *D. schødleri* (Sars, 1862), *D. galeata* (Sars, 1864), *D. mandootae* (Birge, 1918), *D. pulex* (Leydig, 1860), *D. dubia* (Herrick, 1895), *D. logiremis* (Sars, 1862) a *Bosmina longirostris* (Müller, 1785) a zkoumalo se, zda jsou schopny pohlcovat různé veliké kuličky a zda tato velikost souvisí s velikostí těla vířníků. Plastové kuličky (1- 80 µm) si po pozření uchovávají svůj počáteční tvar a velikost a jsou barevně odlišeny podle velikosti. Více než polovina perlooček kuličky pohlcovala, zbytek pohlcoval kvasinky nebo nepohlcoval vůbec. Jedinci nepohlčující kuličky byli ze 73% *D. longiremis* nebo *Bosmina*. Skutečnost, že větší kuličky nebyly u obou druhů pohlcovány, zřejmě nesouvisí s jejich velikostí těla, neboť například juvenilní jedinci z ostatních druhů *Daphnia*, kteří byli menších velikostí, pohlcovali kuličky bez problémů. I přes tuto výjimku se však dospělo k závěru, že velikost pohlcených částic perloočkami souvisí s velikostí jejich těla (Burns 1968).

Connelly a jeho kolegové zkoumali schopnosti zooplanktonního požírače *D. pulicaria*, který redukuje populace cyst *G. intestinalis* a oocyst *C. parvum* v povrchových vodách. Potenciál

D. pulicaria, mající roli biologického filtru *C. parvum* a *G. intestinalis*, byl testován v nádobách, ve kterých bylo 1×10^4 na 66 ml oocyst kryptosporidií a cyst giardií, společně s řasami *Selenastrum capricornutum*, jako potravou, stimulující normální požívání. Důkaz, že *D. pulicaria* požíral (oo)cysty, byl určen hodnotami odstraněných (oo)cyst, jejich životaschopností, excitací a infekčností v kultuře. Dvě *D. pulicaria* výrazně zmenšovaly excitaci (5%) a infekčnost (87%) oocyst *C. parvum*. Další dvě *D. pulicaria* výrazně snižovaly životaschopnost cyst *G. intestinalis* (52%). Žádné mechanické poškození oocyst *C. parvum* nebylo pozorováno, pravděpodobně díky jejich malé velikosti. Vnější stěna oocyst nebyla poškozena nebo byla porušena jen slabě, naproti tomu stěna cyst *G. intestinalis* byla porušena velmi, pravděpodobně díky jejich velikosti (Bichai et al. 2008). Data dokazují, že zooplanktonní požírači mají schopnost podstatně snižovat populace infekčních *C. parvum* a *G. intestinalis* ve vodních ekosystémech (Connelly et al. 2007).

Perloočkami v České republice se ve své práci zabývala i Lenka Rousková. Jako modelový organismus použila perloočky druhu *D. pulicaria*, kdy zkoumala roli těchto perlooček jako „odstraňovačů“ kryptosporidií ve vodním sloupci. Čtyřiceti vyhladovělým perloočkám dala jako potravu kryptosporidie, které perloočky aktivně pohlcovaly. Oocystami kryptosporidií, které prošly zaživacím traktem perlooček, pak perorálně inokulovala devět BALB/c myší a po několika dnech od inokulace začala odebírat, barvit a diagnostikovat trus. Z jejich výsledků vyplynulo, že perloočky jsou schopny velmi rychlého a efektivního pohlcování (dospělec perloočky byl schopen za 10 minut pozřít $1,5 \times 10^4$ oocyst *C. parvum*, za hodinu to bylo $2,4 \times 10^4$ oocyst). Při pokusu byly zřejmě oocysty kryptosporidií pro perloočky velmi atraktivní, protože je selektivně ve vodním sloupci vyhledávaly a tím snižovaly jejich počet ve vodě, nehledě na to, zda oocysty skutečně jako potrava slouží. (Rousková 2008).

Souhrnně lze tedy říci, že perloočky aktivně vyhledávají oocysty kryptosporidií nebo cysty giardií ve vodním sloupci, čímž snižují jejich počet ve vodě (Rousková 2008). Velikost pohlčených částic souvisí s velikostí samotného filtrátora (Burns 1968). Oocysty a cysty prošlé trávicím traktem perlooček jsou velmi rychle vylučovány, čehož by se dalo, stejně jako u vířníků, využít při zjišťování aktuálních stavů vody. Oocysty prošlé trávicí soustavou predátora již dále nejsou schopné života a infekce. Důvodem by mohlo být působení proteáz ve střevě perlooček, které zřejmě narušují a poškozují stěnu oocyst a sporozoiti pak nejsou schopni života a nákazy (Fayer 1997). Pohlčováním oocyst perloočkami *D. pulicaria* při pokusech *in vitro* bylo stanoveno, že se 87% snižuje infekčnost oocyst v povrchových vodách (Bichai et al. 2008). Proto by bylo vhodné použít perloočky jako účinné likvidátory kryptosporidií z vody (Rousková 2008).

2.2.11. Žábronožky (Anostraca)

Žábronožky (Animalia, Arthropoda, Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) jsou 1 až 2,5 cm velcí koryši, žijící převážně ve stojatých sladkých vodách, méně v moři. Ideálním prostředím jsou mělká sladkovodní jezera nebo periodické tůň (Buchar 1995).

Trávení žábronožek začíná ústním otvorem. Potravu si hledají převážně u dna, kde ji filtrují nožkami a brvy ji ve ventrální rýze posouvají k ústnímu otvoru, kde jsou rozmělněny a poté požřeny. Soustava dále pokračuje hltanem, jícnem a žaludkem až do střeva s trávicí dutinou. Střevo prochází tělem přímo a v hlavové části do něho ústí dvě hepatopankreatické žlázy. Strávené zbytky potravy pak tělo opouští řitním otvorem (Sedlák 2005). Žábronožky jsou především filtrátory, pro které je důležitá velikost částic, ale najdou se mezi nimi i dravci (*Branchinecta ferox*, *B. gigas*). Živí se především mikrořasami, bakteriemi, jednobuněčnými živočichy, detritem či organickými zbytky. Při domácím pěstování vylíhnutých nauplií, určených pro krmení ryb, se přikrmují pekařským droždím nebo již zmíněnými mikrořasami (Jelínek et Zicháček 2000).

2.2.12. Interakce mezi žábronožkami a oocystami kryptosporidií

Artemie jsou malí, aktivně filtrující koryši, kteří se živí velmi rozmanitou potravou. Nemají však schopnost selektivně uchvacovat a požírat pouze jedlé částičky. Je-li ve vodě směs jemného písku a krmných částiček, pohltnou obojí. Bylo dokonce zaznamenáno, že tvrdé částice stimulují polykání žábronožek. Při nadbytečném množství potravy, vylučují tyto koryši exkrementy s vysokým obsahem nestrávené organické hmoty. Tuto rezervu pak znovu používají, je-li ve vodní nádrži nedostatek potravy.

Je známo, že artemie v některých případech sloužily jako potrava také lidem. Například američtí Indiáni žijící u Solného jezera v Utahu tyto koryše s chutí pojídali. Arabové, putující na západ od delty Nilu, lovili žábronožky ve slaných jezerech a připravovali z nich pomazánku, kterou používali místo masa a která podle slov německého geografa Augusta Petermanna (1822- 1872) připomínala nasolené sledě. V současné době se artemie používají jako krmivo pro ryby a je jedním z nejpobulárnějších krmiv v průmyslovém rybářství. Pro mladé ryby a krevety, chované v rybářských podnikách a farmách, jsou žábronožky vysoce výživné krmivo. Vzhledem k tomu, že žábronožky mají schopnost pohlcovat i oocysty kryptosporidií, mohou je ve svých zažívacích traktech přenášet i na chovy ryb nebo krevet a tím způsobit případné epidemie (Hayo et Schwarz 1996).

Žábronožky byly již dříve zkoumány v laboratorních podmínkách, neboť se zjistilo, že mají schopnost přenášet na ryby mikrosporidie (Olson 1976). O několik let později, provedli Freire-Santos a jeho tým pokus, kdy zkoušeli experimentálně nakazit duhové pstruhy oocystami kryptosporidií. Ryby byly krmeny komerčními žábronožkami, které v sobě obsahovaly infekční oocysty *C. parvum*, které byly předtím testovány na životaschopnost a infekčnost, inokulací neonatálních myší. Po vyšetření ryb nebyly v jejich zažívacím traktu nalezeny oocysty jako takové, ale v oblasti žaludku a pyloru bylo nalezeno velké množství kulovitých útvarů, které byly zanořeny do epitelu tkáně. Pomocí metody IFAT se poté zjistilo, že šlo skutečně o kryptosporidie (Freire- Santos et al. 1998).

O několik let později byla snaha prokázat schopnost pohlcování a rozšiřování oocyst kryptosporidií a cyst giardií žábronožkou *Artemia franciscana*, za použití DIC (differential interference contrast) a fluorescenčního mikroskopu. Oocysty a cysty byly podávány metanaupliím pátého instaru. Metanauplia byla následně fixována formalinem a prohlédnuta mikroskopem a DIC. Prokázalo se, že metanauplia pohlcují a také vylučují oocysty kryptosporidií a cysty giardií. Bohužel se nezjistilo, zda metanauplia dokáží inaktivovat tato infekční stádia. Stanovení množství parazitů uvnitř těla metanauplií bylo velmi obtížné, neboť se zde paraziti nacházeli ve velkých shlucích a trávicí trakt byl velmi pohyblivý (Méndez- Hermida et al. 2006).

O rok později se Méndez- Hermida a jeho skupina zabývali opět žábronožkou *A. franciscana*. Životaschopnost oocyst *C. parvum* požitých metanaupliem *A. franciscana*, byla zjištěna za použití dvou fluorescentních barviv (DAPI a PI). Výsledky opět potvrdily, že metanauplia *A. franciscana* pohlcují a také exkretují oocysty kryptosporidií. V zažívacím traktu metanauplií byly nalezeny neporušené a životaschopné oocysty *C. parvum*. Toto zjištění vedlo k úsudku, že *Artemia*, hrají roli v přenosu infekčních stádií oocyst. Mohou tak infekci přenést na jejich potenciální predátory a významně tak přispívat ke vzniku epidemií ve vodních prostředích nebo v komerčních chovech ryb či krevet (Méndez- Hermida et al. 2007).

2.2.13. Mlži (Bivalvia)

Mlži patří mezi měkkýše (Animalia, Mollusca), kteří žijí bentický život na dně moří, malá část osídlila i sladké vody. Žijí převážně hrabavě, více či méně zabořeni do sedimentu, se sifony vysunutými nad dno. Přejít k přisedlému způsobu života vedl k tvorbě přichycovacích orgánů (byssová vlákna) nebo k cementaci schránky, a je často doprovázený ztrátou symetrie. Někteří mlži vrtají do pevných pokladů, které mechanicky nebo chemicky narušují. Menší část

mlžů leží volně na dně nebo je schopna i krátkodobého plavání klapáním misek a vytlačováním vody z plášťové dutiny (Sedlák 2005).

Jsou to živočichové typičtí převážně bilaterální symetrií a tělem zploštělým ze stran, které je pokryté plášťovými chlopněmi a uloženo v lastuře složené ze dvou misek.

Trávicí soustava mlžů začíná ústním otvorem, u kterého se nachází makadla a který se nalézá u předního okraje nohy. Části potravy jsou k ústům přiháněny obrveným epitelem. Ústa jsou vkleslá a nemají čelist. Potrava se nejdříve filtruje přes žábry a poté se dostává do úst. U mlžů se nenachází slinné žlázy. Ústa přecházejí v hltan, jícen a dále v rozsáhlý žaludek, který je obklopen hepatopankreatem a opatřen filtračním aparátem a krystalickým kuželíkem, který se otáčí kolem své osy pomocí brv. Za žaludkem následuje střevo, do kterého ústí hepatopankreas. Střevo je dlouhé, se smyčkami v gonádách a směřuje skrze osrdečník do hřbetní části těla. Zbytky potravy pak opouštějí tělo konečníkem, který prostupuje osrdečníkem a vyústuje v kloakální prostor. Trávení potravy většinou zahrnuje intra i extracelulární fáze v zažívacím traktu (Jelínek et Zicháček 2000).

Mlži jsou především filtrátoři, živí se planktonem. Malá část mlžů vybírá potravu ze sedimentu, někteří loví větší kořist (Buchar 1992).

2.2.14. Interakce mezi mlži a oocystami kryptosporidií

Mlži patří mezi organismy, které dokáží přefiltrovat velké objemy vody, vyskytují se ve sladkých vodách a v mořích, kde jsou často nacházeni při pobřeží nebo u ústí řek (Chalmers et al. 1997, Graczyk et al. 1999, Lowery et al. 2001). Mnoho mořských mlžů se živí fytoplanktonem, který je filtrován přes žábry a s pomocí cilií na povrchu buněk, dopravován do zažívacího traktu (Komárek 1952).

Fayer a jeho kolegové se v Marylandu, v přítoku zátoky Chesapeake, zabývali filtrací ústřic *Crassostrea virginica*. Hemocyty a žábry mlžů byly na přítomnost oocyst kryptosporidií a cyst giardií prozkoumány imulofluorescentním mikroskopem. V žádné z 360 ústřic nebyly těmito metodami zjištěny giardie. Detekce oocyst byla provedena u 30 *C. virginica* na žábrech a v hemocytech, neboť Graczyk a jeho tým zjistili, že jsou hemocyty různých mlžů, ať již mořských nebo sladkovodních, schopny fagocytovat oocysty a to již během prvních 15 minut (Graczyk et al. 1998). Žábry a hemocyty byly zpracovány a inokulovány do myší. Střevní tkáň z 2-3 myší byla pozitivní na přítomnost oocyst kryptosporidií, neboť byli mlži nasbíráni v blízkosti hospodářských budov a domů se septiky, které jsou častými místy, kde se oocysty nacházejí (Fayer et al. 1998). V České Republice se filtrací mlžů zabývala, ve své bakalářské práci, Kamila Ryvolová. Jako modelový organismus použila mlže *Dreissena polymorpha*.

Zkoumala, zda jsou *D. polymorpha* schopny filtrovat oocysty kryptosporidií a když se její domněnka potvrdila, vyšetřovala žábra a trávicí trakt mlžů. Prokázala, že *D. polymorpha* filtrují oocysty a našla je i v jejich trávicím ústrojí. Ze závěru její práce pak vyplývá, že by mlži mohli sloužit nejen jako indikátory přítomnosti oocyst kryptosporidií ve vodě, ale že se i aktivně podílejí na jejich odstraňování z vody (Ryvolová 2005).

Patogenní mikroorganismy ve vodě by mohly být během filtrování potravy mlži, soustředěny v zažívacím traktu nebo v tkáních. Mlži jsou totiž schopni v sobě kumulovat oocysty *C. parvum*, oocysty *T. gondii* a cysty *G. intestinalis* z okolní vody. Neví se však, zda si cysty *G. intestinalis* uchovávají svou infekčnost a jsou životaschopné, ale určité důkazy naznačují, že jsou v měkkýších inaktivovány. Toxoplasmy a kryptosporidie si svou infekčnost i po průchodu měkkýši uchovávají (Robertson 2007).

Mnohé experimenty prokázaly zachycení oocyst kryptosporidií různými druhy měkkýšů (Fayer et al. 1998, Graczyk et al. 1998, 1999, Freire- Santos et al. 2001, Gómez- Bautista et al. 2000) v různých částech světa: Španělsko (Gomez- Bautista et al. 2000, Gómez- Couso et al. 2003, 2004), Velká Británie a další Evropské země (Lowery et al. 2001, Gómez- Couso et al. 2003, 2004), USA (Graczyk et al. 1999) a Kanada (Graczyk et al. 2001).

Chalmers et al. 1997 v Irsku testovali mlže *Mytilus edulis* na přítomnost oocyst kryptosporidií. Řeku Owenboy si vybrali na základě její lokalizace v zemědělské oblasti. Mlži byli zhomogenizováni a prohlédnuti fluorescenčním mikroskopem. Oocysty byly nalezeny ve vzorcích z říční vody a nacházely se také v mlžích, což potvrdilo, že mlži v sobě dokáží akumulovat oocysty kryptosporidií.

V Itálii se Traversa a kolegové zabývali výskytem oocyst pocházejících z mlžů. Z ústí tří řek v centrální Itálii, přibližně 450 km od pobřeží Jaderského moře, bylo nasbíráno 480 mlžů *Chamelea gallina*. Z každého místa bylo nasbíráno 120 mlžů. Z každého mlže bylo získáno přibližně 100 µl hemolymfy, ze které byl vyizolován genom DNA. V této studii se potvrdila přítomnost oocyst *C. parvum* v mlžích nasbíraných okolo ústí řek, v jejichž okolí se často pasou přežvýkavci, kteří mohou být zdrojem nálezů. Stejně tak byly oocysty nalezeny v ústřicích nasbíraných z míst, v jejichž okolí se nacházejí hospodářské komplexy (Traversa et al. 2004). Téhož roku chtěla skupina vedená Graczykem zjistit, zda jsou *D. polymorpha* a *C. fluminea* schopny hromadit oocysty kryptosporidií a cysty giardií zfiltrovaných z vody. Mlži *C. fluminea* jsou původem asijský druh, který se v mnoha oblastech vyskytuje jako druh invazní. Jsou dobře adaptovány na nestabilní lokality a s velkou úspěšností se nacházejí v zemědělských odvodňovacích systémech (McMahon 1991). *Corbicula fluminea* mohou být díky své schopnosti kumulace chemických sloučenin ve tkáni, využiti rovněž jako bioindikátory toxinů používaných v zemědělství (Tatem 1986; Leland et Scudder 1990). Z jejich výsledků vyplynulo, že ihned po kontaminaci vody nebyly ani cysty giardií ani oocysty kryptosporidií v mlžích nalezeny.

Množství nalezených oocyst a cyst se postupně zvětšovalo z průběhu pěti týdnů a už po třech dnech je bylo možno nalézt v tkáni mlžů *Dreissena polymorpha*. V *D. polymorpha* se oocysty kryptosporidií a cysty giardií vyskytovaly ve větším množství, než v *C. fluminea*, důvod ovšem nebyl znám. Mlže *D. polymorpha* by se díky tomuto výsledku dalo lépe využívat (než *C. fluminea*) jako indikátory pro znečištění vody patogeny, zvláště pak kryptosporidii (Graczyk et al. 2004). I přes to, že bylo z matematických propočtů zjištěno, že jednotlivý mlž *C. fluminea* dokáže zachytit ve své tkáni přes 3 miliony oocyst *C. parvum* nebo cyst *G. intestinalis* (Fayer et al. 1998). Podobně tomu bylo i při studiích na ústřicích, kdy se využívala imunofluorescentní protilátka, pro detekci oocyst a cyst, kdy nebyla nalezena žádná giardie zatímco množství kryptosporidií bylo poměrně vysoké (Fayer et al. 1998).

V roce 2004 chtěli Graczyk a kolektiv dokázat, že lidské patogeny mohou být zachycovány mlži. Pro svůj pokus v oblasti řeky Shannon si vybrali opět mlže *Dreissena polymorpha*. Tito mlži, byli testováni na přítomnost parazitů *C. parvum*, *G. intestinalis*, *Encephalitozoon intestinalis* a *Enterocytozoon bieneusi*, metodami IFAT, FISH a PCR. Řeka Shannon je kontaminovaná závažnými patogeny zahrnujícími i *C. parvum*, neboť je v jejím okolí soustředěna zemědělská činnost a do řeky se vlivem splachů nebo znečištěných vod z měst dostávají vodní patogeny (Minchin et al. 2002). *Dreissena polymorpha* je vysoce invazivním druhem rozšířeným právě v oblasti řeky Shannon a ve Velkých jezerech (Minchin et al. 2002), kde také slouží jako výborné indikátory chemického, virového a bakteriálního znečištění, neboť ve své tkáni mohou tyto polutanty akumulovat (Brieger and Hunter 1993; Horgan and Mills 1999). Mlži byli nasbíráni, usmrceni a tkáň vyjmuta a zhomogenizována. Paraziti byli nalezeni v 75 % míst, s vysokou koncentrací 16 oocyst *C. parvum*, 9 cyst *G. intestinalis* a 8 spor *E. intestinalis* na jedince. Naměřená koncentrace oocyst *C. parvum* na jedince se pohybovala od 4 do 16 a od 2 do 12 na gram tkáně. Cysty *G. intestinalis* byly v průměru nalezeny od 5 do 9 na jedince a od 3 do 6 na gram tkáně. Množství nalezených spor *E. intestinalis* se pohybovalo od 7 do 8 na jedince a 6 na gram tkáně. Vyšetřeny byly také hemolymfy, v nichž se v průměru objevilo 6 oocyst na jedince. Spory *E. intestinalis* byly v hemolymfě nalezeny u čtvrtiny jedinců. Všechny vzorky byly testovány metodami FISH a PCR s pozitivním výsledkem přítomnosti *E. intestinalis* a *E. bieneusi*. Přibližně 80 % všech nalezených parazitů bylo životaschopných a tudíž schopných nákazy. (Graczyk et al. 2004).

Mlži jsou často vyhledáváni jako delikatesa a jsou pojídáni ať již tepelně zpracovaní nebo syroví, což z nich činí potenciální přenašeče nákazy, neboť ve své tkáni dokáží přenášet lidské patogeny jako např. oocysty *C. parvum*, oocysty *T. gondii* nebo cysty *G. Intestinalis* (Trollope 1984, Robertson 2007). Jestliže nejsou patogeny vyloučeny nebo inaktivovány v tělech mlžů, mohou být pozřeni predátory, ve kterých mohou vyvolat nákazu (Robertson 2007).

Na zátoku Chesapeake, kde se komerčně pěstují mlži, se soustředil Graczyk a jeho tým. Z 53 míst nasbírali třicet ústřic *Crassostrea virginica*. Ústřice byly testovány na přítomnost oocyst *C. parvum*, metodou IFA. Poté byly vzorky zpětně prošetřeny na přítomnost životaschopných oocyst, metodami IFAT a IFA. Z 265 ústřic, obsahovalo životaschopné, infekční oocysty 221 (84 %) jedinců. Infekceschopné oocysty byly z 10- 32 % nalezeny také v hemolymfě a na žábrech. Množství životaschopných oocyst nebylo ovlivněno velikostí těla nebo množstvím fekálního znečištění změřeného kultivací koliformních tyček v testovaných místech (Graczyk et al. 2006). Ve španělské Gallecii byl prováděn pokus vedený Gomez- Bautistou, kdy byly s pomocí *Mytilus galloprovincialis* a *Cerastoderma edule* detekovány oocysty kryptosporidií. Mlži byli nasbíráni v zálivu v místech s různými stupni organického znečištění. V sobě měli oocysty *C. parvum*, které zřejmě pohltili v místech poblíž ústí řeky, na jejichž březích bývá vysoká hustota přežvýkavců. *Mytilus galloprovincialis* a *C. edule*, si v sobě z této oblasti transportovali oocysty, které byly infekční pro neonatální myši. Výsledky ukázaly, že tyto dva mlži také mohou sloužit jako zdroje oocyst *C. parvum*. Kromě toho, mlži žijící u ústí řek mohou být používáni jako indikátory znečištění v říčních vodách (Gomez- Bautista et al. 2000).

Freire- Santos a jeho tým použili pro svou studii mlže *Ruditapes philippinarum*, kterým podávali oocysty *C. parvum* K určení životaschopnosti bylo použito DAPI a PI. Tito mlži byli uskladněni v nádržích s čerstvou mořskou vodou. Nádrže byly kontaminovány 8×10^6 oocystami *C. parvum* a poslední nádrž byla ponechána jako kontrolní. Všichni mlži byli usmrceni a byla jim vyjmuta žábra a zažívací trakt. Malachitová zeleň, která byla použita pro obarvení tkáně mlžů z nádrže 1, odhalila přítomnost oocyst. Identifikace byla provedena metodou IFAT. Histologická vyšetření mlžů z druhé nádrže odhalila přítomnost oocyst na žábrech a v zažívacím traktu (Freire- Santos et al. 2001).

Barvicí techniku DAPI a PI použili také Fayer a jeho kolegové. Pomocí ní odhalili, že více jak polovina myší byla infikována oocystami *C. parvum*. Histologická vyšetření odhalila oocysty na epiteliálních okrajích histologických řezů. Oocysty *C. parvum* zachycené mlži z mořské vody, si mohou uchovat svou infekčnost a mohou infikovat myši i po 48 hodinách.

Z těchto výsledků tedy vyplývá, že jsou mlži schopni v sobě uchovávat infekční oocysty a tím mohou sloužit jako mechanictí přenašeči těchto patogenů (Fayer et al. 1998).

Je známo, že na životaschopnost oocyst působí různé vnější podmínky. Ve Francii se Xunde et al. 2006 zabývali přítomností infekčních oocyst *C. parvum* v mlžích *Mytilus edulis*, kteří byli nasbíráni během různých ročních období ze 3 míst na severozápadním pobřeží Francie. Maso, žábry a vnitřní tekutiny byly s použitím immunomagnetické separace a IFA prozkoumány na přítomnost oocyst kryptosporidií. Oocysty byly přítomny ve všech vzorcích ze všech 3 míst a období. Vysoké hodnoty oocyst byly zjištěny u mlžů nasbíraných v lednu, nejnižší hodnoty se

objevují v období října. Množství oocyst bylo zcela jasně ovlivněno srážkami střídajícími se v průběhu období. Oocysty byly detekovány více ve vlhčím než sušším období (Gomez- Couso et al. 2003). Zřejmě je to proto, že v období srážek, ať již dešťových nebo sněhových, sebou z polí odnáší odtékající voda i nečistoty a patogeny, které se dostávají do vody (Rose et al. 1997). Infektivita oocyst byla určena perorální inokulací sajících NMRI myši a vývojová stadia tohoto patogena byla pozorována v tenkém střevě myši orálně infikované oocystami, které byly izolovány z mlžů z oblasti z jedné lokality Le Tréport (Xunde et al. 2006).

V roce 1997 se skupina vedená Fayerem zabývala tím, jak jsou oocysty kryptosporidií schopny snášet různou salinitu. Oocysty *C. parvum* umístěné do uměle vytvořené mořské vody o salinitě 10, 20 a 30 ppt, při 10°C a o salinitě 10 ppt při teplotě 20°C byly infekční po dobu 12 týdnů.

Takto umístěny byly i do vod se salinitou 20 a 30 ppt při 20°C a infekční byly po dobu 4-8 týdnů (Fayer et al. 1997). O několik let později se chtěli o salinitě a filtrování mlžů dozvědět více také Graczyk a jeho kolektiv. Uskladnili *Crassostrea ariakensis*, které byly chované v komerčních chovech, do nádrží s mořskou vodou o nízké (8 ppt), střední (12 ppt) a vysoké (20 ppt) salinitě. Tato voda byla kontaminována 1×10^5 oocystami *C. parvum* a cystami *G. intestinalis* a spory mikrosporidií (*Encephalitozoon intestinalis*, *E. hellem*, *Enterocytotozoon bienensii*).

Životaschopné oocysty, cysty a spory byly ve vodě nacházeny i 33 dní po inokulaci. Filtrování těchto patogenů bylo u *C. ariakensis* ovlivněno salinitou a optimální hodnoty byly získány při střední a vysoké salinitě (Graczyk et al. 2006).

Přítomnost oocyst na žábrech a v zažívacím traktu mlžů byla v následující práci demonstrována také při experimentálních podmínkách (Fayer et al. 1997, Graczyk et al. 1998), kdy Freire-Santos a jeho kolegové stanovili, že na životaschopnost oocyst působí kromě salinity také čas. Zjistili také, že životaschopné oocysty ubývají během prvních 4 dní, kdy se začnou aktivovat enzymy vylučované hepatopankreatem. Oocysty, které jsou nepozměněné a infekční se mohou nacházet na žábrech dospělých mlžů *Ruditapes philippinarum* i po 48 hodinách po kontaminaci vody (Freire- Santos et al. 2001).

Mlži tedy mohou sloužit jako vhodné biologické indikátory pro detekci oocyst v kontaminované vodě (Chalmers et al. 1997, Graczyk et al. 2001). Jsou také schopni v sobě přechovávat mnoho lidských patogenů, které se do jejich těla dostávají filtrací z okolní vody. V mlžích byly nejčastěji identifikovány oocysty rodu *Cryptosporidium* a cysty rodu *Giardia* (Graczyk et al. 2003). Bylo také zjištěno, že mlži v sobě dokáží koncentrovat i další částice, které jsou mnohem větší, než bakterie tzn. o maximální velikosti 2 μm (Fayer et al. 1997, Graczyk et al. 1998, Freire-Santos et al. 2001). Mlži mohou sloužit také jako zdroj oocyst *C. parvum*. Blízko ústí řek byly nalezeny slávky a srdcovky, které obsahovaly až tisíc oocyst, jež byly infekční pro neonatální myši (Gomez-Bautista et al. 2000). Pojídání tepelně neupravených mlžů (slávek,

ústřic aj.) zvyšuje možnost přenosu infekčních oocyst kryptosporidií na člověka (Graczyk et al. 1998).

2.2.15. Plži (Gastropoda)

Plži (Animalia, Mollusca) jsou nejúspěšnější skupinou měkkýšů, kteří postupně osídlili sladké vody i suchozemské prostředí. Dokázali se přizpůsobit i mimořádně suchým podmínkám v aridních oblastech, chladné klima jim však nevyhovuje. V moři osídlili mělkovodní i hlubokovodní prostředí, jsou dobře přizpůsobeni přílivo- odlivové zóně a jako zooplankton jsou rozšířeni i na otevřeném oceánu. (Buchar 1992).

Plži patří mezi řadu živočichů, kteří obývají bentos. Tímto termínem lze označit organismy, ať již rostlinné nebo živočišné, které obývají dna vodních toků, nádrží a moří. Můžeme zde nalézt různé mikroorganismy, rostliny (fyto-bentos) kořenící na dně, popřípadě přichycené k podkladům a také živočichy (zoobentos) žijící na dně, ve vrstvě sedimentu nebo na pevném podkladu.

Typickými představiteli bentosu jsou nitěnky, ježovky, sasanky, krabi, vodní berušky, larvy hmyzu, bentické ryby (mřenka mramorová, vranka obecná), máloštetinatci a také měkkýši (Frances 2003). Plži se v bentálu živí sedimentujícími planktonními řasami (planktonní děšť) nebo vodními rostlinami, které buď spásají, nebo oškrabávají. Vzhledem k tomu, že se plži pohybují po dně, ryjí v sedimentu nebo okusují rostliny, mohou s touto potravou pozřít také oocysty kryptosporidií, které vlivem usazování klesají ke dnu nebo se zachycují na rostlinách. Mezi plži můžeme nalézt také saprofágy nebo fytofágy, kteří se živí živočišnými i rostlinnými odumřelými pletivy nebo houbami. Řada plžů přešla k predaci a je potravně specializovaná na určitý druh kořisti. Homolice dokáží ulovit např. rybu, jiní plži vrtají do jiných živočichů. Někteří žijí jako paraziti ostnokožců (Jelínek et Zicháček 2000).

Trávicí soustava plžů začíná ústním otvorem na spodní straně hlavy, lemovaným pysky a krátkou ústní dutinou, do které ústní slinné žlázy, které mohou obsahovat např. kyselinu sírovou popřípadě jsou u některých druhů přeměněny v jedové žlázy, čehož pak plži využívají při leptání skořápek obětí nebo při lovu. Ústní dutina přechází do mohutného svalnatého jícnu, kam ústí jícnové žlázy a ve kterém se ve slepém váčku nachází radula, která slouží ke krouhání potravy. Radula má příčné řady chitinových zoubků, tvořících pět pruhů vedle sebe. Na horním patře úst vyrůstají dva zuby, které obvykle srůstají v jeden, tvořící protějšek raduly. Radulu tvoří odontocyty vzniklé z odontoblastů. Zuby raduly bývají mineralizovány většinou vápníkem, u přílipek i železem. Radula se opotřebovává na předním konci a na zadním konci neustále dorůstají další nové zuby (Jelínek et Zicháček 2000).

Potrava dále přechází do rozšířené části předního střeva, která se nazývá žaludek. Žaludek plžů je tenkostěnný a vakovitý, někdy může být žvýkací, obsahující vápenaté desky nebo rohovité plátky. U některých býložravců má žaludek slepý přívěsek, ve kterém se nachází krystalický enzymatický kuželík, který se díky bičíkům sliznice vysouvá, otáčí a rozpouští v amylasový ferment. Býložravci také vylučují celulázu, která jim pomáhá trávit celulózu. Vývody hepatopankreatické žlázy se spojují v jeden vývod a do žaludku ústí mohutná žláza, která může být hustě rozvětvená a vybíhající do papil na hřbetě. Hepatopankreas produkuje enzymy, které plžům napomáhají štěpit celulózu na lehce stravitelné sacharidy. Játra do žaludku nevylučují žádný sekret, pouze do svých buněk fagocytují částičky potravy a tráví je. Za žaludkem se nachází střevo, které uvnitř útrobního vaku opisuje tvar ulity, stáčí se a vpravo za hlavou vyúsťuje řitním otvorem do plášťové dutiny (Sedlák 2005).

2.2.16. Interakce mezi plži a oocystami kryptosporidií

V souvislosti s touto tematikou se ve světové literatuře doposud nevyskytly žádné články ani odborné práce, proto mě toto téma oslovilo a ve svém předpokusu jsem se snažila zjistit, zda jsou plži schopni pozřít, vyloučit, popřípadě destruovat oocysty kryptosporidií.

Ke své práci jsem použila plže z řádu Pulmonata, podřádu Basommatophora, konkrétně *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), *Physa fontinalis* (Linnaeus, 1758), *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) a *Physella acuta* (Draparnaud, 1805), které jsem nasbírala v okolí Sokolova a Lomnice a uskladnila odděleně ve sklenicích s odstátou vodovodní vodou. Ke každému plži jsem do vody přidala 10^6 oocyst *C. parvum*, které byly vyizolované z hovězího trusu z hospodářského komplexu v Křenovicích. Druhý den po společné inkubaci jsem začala vyšetřovat vodu a trus. Z každé sklenice s plžem jsem odebrala vodu o objemu 10 ml, centrifugací stočila po dobu 20 minut, supernatant vrátila zpět do sklenice a pelet jsem rozmíchala ve zbylé kapce supernatantu. Oocysty jsem v peletu počítala pomocí Bürkerovy komůrky (45 x 10 mm). Při běžných pokusech, lze plže uskladnit při pokojové teplotě za předpokladu, že je voda řádně okysličována. Vzhledem k tomu, že jsem nepoužila okysličovací zařízení, se ve sklenicích při pokojové teplotě začaly přemnožovat mikroorganismy, převážně kvasinky a rozsivky a plži častěji hynuli. Bylo také složitější počítat zbylé oocysty ve vodě, neboť se často zaměňovaly za artefakty. Sklenice jsem proto umístila do chladicího boxu s teplotou 4- 5°C, ve kterém byli plži stále aktivní, požírali oocysty a méně hynuli. Při nižších teplotách se také eliminoval růst mikroorganismů na minimum. Z výpočtů pak vyplynulo, že plži skutečně predací snižují počet oocyst ve vodě. Kromě vody jsem vyšetřovala také výkaly. Exkrementy jsem nafixovala na krycí sklíčko, obarvila methylvioletí (Miláček et Vítovec 1985) a prohlédla pod mikroskopem. Výkaly jsem

odebírala v 1., 2., 3. a 6. dni od inkubace. První a druhý den jsem oocysty v trusu nenašla, našla jsem je až v pozdějších dnech, kdy již prošly trávicím traktem a byly vyloučeny. Některé oocysty byly v neporušeném stavu, jiné byly částečně poškozené, zřejmě díky přítomnosti raduly nebo působením střevních hydrolytických enzymů. Bohužel se mi nepodařila stanovit životaschopnost a infekčnost oocyst, neboť to kvůli propuknutí epidemie v chovech myší nebylo možné.

2.2.17. Hmyz (Insecta)

Hmyz (Animalia, Arthropoda) osídluje Zemi od polárních oblastí, přes rovník, deštné pralesy, pouště až po vysoké hory. Nalezneme je i ve sladkých a slaných vodách. Jejich velikost se pohybuje od 1 mm po 18 cm (Pokorný, Šifer 2004).

Hmyz přijímá potravu ústním ústrojím, které se nachází na hlavě. Základním typem je ústní ústrojí kousací, s párem kusadel (mandibuly), čelistí (maxilly) a nepárovým spodním pyskem (labium). Spodní pysk, vzniklý splynutím párových čelistí druhého páru, uzavírá zespoda příústní dutinu. Důležitou součástí ústního ústrojí je i dolní patro (hypopharynx) rozdělující příústní dutinu na horní potravní komoru (cibarium) a dolní slinnou komoru (salivarium). Potravní komoru kryje svrchní pysk (labrum) s četnými chuťovými orgány a zároveň tvoří její horní patro (epipharynx). Vlastní ústní otvor se nachází hluboko na zadním konci příústní dutiny v místě styku horního a dolního patra. Podle způsobu příjmu potravy mohou být ústní orgány modifikovány na orgány lízací, bodavé nebo savé. Kousací ústní ústrojí umožňuje okusovat rostlinné tkáně i zpracovávat těla živočichů. Nachází se např. u švábů, termitů, vážek, vos, mravenců atd. Rozšířené je i ústní ústrojí obecně zvané sosák, umožňující nasávání tekuté potravy. Vyskytuje se u mšic, kříšů, cikád a ploštic, u kterých má podobu silného bodce s vysunovatelnými, ostrými, žlábkovitými štěty. Trubicovitý sosák komárů je tvořen bodcovitými přímými štěty. Silný sosák much je naopak jednotlivý útvar s přísavnými polštářky na konci. Všechny tyto smíšené typy představují ústní ústrojí bodavě sací. Sosák většiny motýlů je značně dlouhý a spirálně stočený. V tomto případě se mluví o sací ústní ústrojí. Včely a čmeláci mají volná nepřeměnná kusadla. Jejich čelisti a spodní pysk zčásti splynuly a tvoří tzv. lízací ústní ústrojí. Čelisti hmyzu mohou mít různé uspořádání také podle umístění na hlavě. Dravci mají tzv. prognátní typ čelisti směřující dopředu. Hmyz požírající potravu pod sebou má hypognátní typ čelisti směřující dolů. Švábi mají čelisti otočené dozadu, tento typ se nazývá opistognátní (Sedlák 2005).

K hrubému drcení potravy slouží kusadla, k jemnějšímu zpracování slouží čelisti, které posouvají potravu do dutiny ústní, kam ústí slinné žlázy. Následuje svalnatý hltan a trubicovitý

jícen, který se rozšiřuje ve vole. Jícen přechází v žaludek (proventriculus) s kutikulárními lištami a zuby, jimiž se u druhů s kousacím ústním ústrojím dokončuje rozměňování potravy. K vlastnímu trávení dochází ve žláznatém žaludku se slepými výběžky. Za žaludkem následuje střevo se slepými výběžky. Střevo často vytváří zvláštní útvary tzv. mycetomy, obsahující symbiotické mikroorganismy (mohou být lokalizovány ve specializovaných buňkách zvaných mycetocyty), které umožňují trávení např. celulózy (např. u termitů nebo larev živících se dřevní hmotou). Střevo se na konci rozšiřuje v konečník a vyúsťuje řitním otvorem, který je umístěn na posledním zadečkovém článku. K vylučování rozpustných metabolitů v podobě kyseliny močové, iontů sodíku, draslíku a amonných solí slouží malpigická trubice, ústící do střeva (Jelínek et Zicháček 2000). Převážná část trávicí soustavy se nachází v zadečku, kde je obklopena bělavou tukovou hmotou, která má smysl při akumulaci energie a při metabolických procesech a funguje podobně jako játra (Pokorný, Šifer 2004).

2.2.18. Interakce mezi hmyzem a oocystami kryptosporidií

Ve vnějším prostředí se oocysty kryptosporidií dostávají do blízkého kontaktu nejen s živočichy vodními, ale také se suchozemskými. Někteří z nich mají roli mechanických přenašečů a přispívají tak k rozšiřování infekce, jiní dokáží oocysty degradovat nebo snížit jejich infekceschopnost. Ze suchozemských bezobratlých živočichů můžeme jmenovat zejména synantropní mouchy a koprofágní brouky (Graczyk et al. 2005).

Dospělé mouchy žijí okolo 15 až 25 dní a za tu dobu jsou schopny klást 5x nebo 6x 75 až 150 vajíček. V mírném klimatu se může za jedno léto vylíhnout 10 až 12 generací. Zima většinou čas páření ukončuje, ale i přesto můžeme v zimním období najít ve stodolách nebo domech několik generací much (Ebeling 1978). *Musca domestica* dokáže uletět i 3 kilometry daleko a její pohyb je většinou orientován na znečištěná nebo hygienicky nevyhovující místa (Murvosh et Thaggard 1966). Synantropní mouchy se živí na zvířecích nebo lidských výkalech, na odpadcích, zvířecích podestýlkách nebo na rozkládajícím se organickém materiálu. Tato prostředí slouží mouchám i jako výborné místo pro odpočívání nebo páření (Graczyk et al. 2005).

Existuje 108 čeledí Diptera obsahující přes 120 tisíc druhů much. Přibližně 29 čeledí a 350 druhů může být spojováno s rozšiřováním protozoálních nákaz. U více jak 50 druhů synantropních much bylo prokázáno, že rozšiřují lidské patogeny do prostředí (Olsen 1998). Mouchy přenášející tyto patogeny jsou reprezentovány těmito čeleděmi: Calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Cochliomyia macellaria*, *Cynomyopsis cadaverina*, *Chrysomya putoria*, *Phaenicia cuprina*, *Phaenicia sericata*, *Phormia regina*), Sarcophagidae (*Sarcophaga carneria*, *Sarcophaga crassipalpis*, *Sarcophaga haemorrhoidalis*), Muscidae (*Musca domestica*,

Muscina stabulans, *Stomoxys calcitrans*), Faniidae (*Fannia canicularis*), Piophilidae (*Piophila casei*), Syrphidae (*Eristalis tenax*), Stratiomyidae (*Hermetia illucens*), Phoridae (*Megaselia insulana*) (Ebeling 1978, Hedges 1980).

Dlouhodobé výzkumy v laboratořích a v terénu ukazují, že synantropní mouchy skutečně přenášejí jak virové, tak i bakteriální patogeny, ohrožující zdraví lidí a zvířat (Graczyk et al. 1999). Byl u nich zjištěn přenos zejména těchto patogenů: *Sarcocystis* spp., *T. gondii*, *Isospora*, *Giardia* spp., *E. histolytica*, *Hammondia* spp. a *C. parvum* (Clavel et al., 2002). Diskutuje se o tom, zda mouchy přenášejí i *Cyclospora cayetanensis* (Ortega et al. 1997).

Synantropní mouchy jsou častými přenašeči také oocyst kryptosporidií. Ty byly detekovány v mouchách experimentálně infikovaných, chycených v přírodě (Sterling et al. 1987), nebo pochytených v hospodářských komplexech, kde se nacházely krávy, které spolu s trusem vylučovaly i oocysty *C. parvum* (Graczyk et al. 1999). Synantropní mouchy mohou být významným prostředníkem mezi trusem a jídlem v místech, kde jsou snadno dosažitelné kontaminované výkaly (Szostakowska et al. 2004). O prvním mechanickém přenosu kryptosporidií a giardií mouchami *Musca domestica* se diskutovalo již v roce 1987 (Sterling et al. 1987), tento domněnka byla později v roce 1999 (Graczyk et al. 1999) potvrzena. *Musca domestica* nebo *Chrysomya megacephala* dokonce dokážou kontaminovat mléko i po 48 hodinách od kontaktu s trusem, který obsahoval oocysty kryptosporidií. Některé oocysty vyisolované z much, byly infekční i po 72 hodinách od kontaktu (Zerpa et Huicho 1994). Szostakowska et al. 2004 provedli výzkum s mouchami z čeledí Muscidae, Sarcophagidae, a Calliphoridae, které pochytili ze dvou míst v Polsku v oblasti Gdansk. Muscidae byly chyceny v hospodářském komplexu, ve kterém byly chovány krávy, ostatní mouchy byly pochyteny na skládce odpadu. Mouchy byly homogenizovány a přečezeny přes CAM filtr. Výsledný pelet byl vyšetřen metodou IFA a FISH. Z celkového množství zjištěných oocyst a cyst, bylo v průměru 80 % životaschopných. Oocyst získaných z exoskeletu much bylo více, než ze zažívacího traktu. U cyst giardií tomu bylo přesně naopak. Synantropní mouchy tedy skutečně mohou sloužit jako mechanické přenašeče oocyst kryptosporidií a cyst giardií (Szostakowska et al. 2004).

Přenos oocyst dospělými mouchami tedy nastává buď prostřednictvím mechanického přemístění z exoskeletu, trusem, nebo opakovaným zvracením (Greenberg 1973). Mouchy mohou lidské patogeny přenášet také ústním ústrojím, na tělním nebo končetinovém ochlupení, nebo na lepivých polštářcích na nohou. Jemné chloupky na nohou much jsou pokryty lepivou substancí, která zlepšuje schopnost much udržet se při odpočívání nebo při lezení po vertikálních površích. Tato substance obsahuje přilnavé částičky, dále viry, bakterie a protozoální cysty, které mohou být přeneseny na různé povrchy, kam mouchy dosedají. Malé částice rychle přilnou díky elektrickému náboji k vnějšímu povrchu mouchy (Greenberg 1973).

Při dlouhodobém výzkumu sbírali Graczyk a jeho kolegové synantropní mouchy z čeledí Calliphoridae, Sarcophagidae a Muscidae z lapačů z hospodářských komplexů, kde byly chovány krávy, které byly či nebyly infikované patogenem *C. parvum*. Oocysty *C. parvum* byly zachyceny právě na povrchu exoskeletů much. Získané oocysty byly infekční, což bylo dokázáno inokulací myší. Množství oocyst získaných z much se pohybovalo od 4 do 131 a celkové množství oocyst kolísalo od 56 do přibližně $4,56 \times 10^3$. Molekulární data ukázala, že oocysty, které se nacházely v zažívacím traktu a které byly trusem vylučovány, byly mouchami přenášeny po dobu nejméně 3 týdnů. Tyto mouchy byly také schopny přenášet životaschopné oocysty kryptosporidií nejen uvnitř, ale i na povrchu svého těla a přenášely je i na další povrchy (Graczyk et al. 2000).

Rok před tím, potvrdili Graczyk a jeho tým domněnku, že mouchy mají skutečně roli mechanických přenašečů kryptosporidií a giardií. Synantropní mouchy při tomto pokusu přenášely kryptosporidie a giardie mezi skotem a divokou zvěří v zemědělském komplexu v severní Georgii, Výsledky zkoumání byly zjištěny FISH a IFA metodami. Kryptosporidie byly izolovány z 56 % much, zatímco giardie byly izolovány pouze z 8 %. Vyšší hodnoty kryptosporidií byly naměřeny také u krav a divoké zvěře, kdežto vyšší hodnoty giardií se vyskytly u ovcí. Kryptosporidie byly izolovány srovnatelně z exoskeletu a mušičích homogenátů, kdežto giardie byly izolovány převážně z homogenátů, z čehož vyplývá primární vnitřní přenos. (Graczyk et al. 1999).

Oocysty *C. parvum* byly v mouchách detekovány také ve studii vedené Clavelem. Tentokrát se jednalo o mouchy, pocházející z oblasti španělské Aragonie. Z much *M. domestica* byl vyroben homogenát, z něhož byla extrahována DNA, která byla zpracována metodou PCR. Přítomnost kryptosporidií byla potvrzena u 11 ze 60 vzorků (Clavel et al. 2002).

Mouchy požírající nebo přicházející do kontaktu s výkaly kontaminovanými oocystami *C. parvum*, si tedy oocysty uchovávají buď ve svém zažívacím traktu, na vnějším povrchu, nebo je vylučují ve svých výkalech (Graczyk et al. 1999). Mouchy, které přirozeně hromadí oocysty kryptosporidií, se vyskytují především ve vesnických lokalitách. Prevalence lidské kryptosporidiózy je tedy výrazně vyšší u pacientů pocházejících z vesnic než u pacientů měst (Clavel et al. 2002).

Je pravděpodobné, že jsou protozoální paraziti člověka přenášeni také přes larvální stadia much, která se živí na kontaminovaných substrátech (Graczyk et al. 1999). Tato domněnka byla potvrzena s oocystami *T. gondi*, které byly izolovány z larev a pup much, pěstovaných na kontaminovaných výkalech koček. Uvnitř pup, v mekoniu a v zažívacích kanálech larev, byly nalezeny také oocysty *C. parvum* (Graczyk et al. 1999).

Larválními stádii much se v roce 1999 zabývali Graczyk a jeho kolegové. Na Petriho misce společně s hovězím trusem, který obsahoval 2.0×10^5 oocyst/ ml chovali přibližně 250 pup

M. domestica. Tři dny po vylíhnutí, byl trus much sesbírán a z much byl vyroben eluát, který byl přecezen CAM filtrem (cellulose-acetate membrane). Zažívací trakt vypitvaný z náhodně vybraných much byl vyšetřen IFA a oocysty byly spočítány. Z výsledků vyplynulo, že všechny mouchy měly na svém povrchu oocysty kryptosporidií. Oocysty *C. parvum* byly nalezeny v zažívacím traktu a přibližně 150 až 320 oocyst bylo nalezeno na povrchu larev a pup (Graczyk et al. 1999).

Další z řady hmyzích zástupců, kteří často požírají lidské výkaly, jsou švábi (Fotedar et al. 1991). Pokud jsou tyto výkaly kontaminovány některými střevními patogeny jako např. *Entamoeba*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Isospora*, mohou švábi rozšiřovat jejich cysty nebo oocysty po okolí (Smith et Frenkel 1978). Důležitou epidemiologickou rolí švábů je přenos střevní *E. histolytica* (Schaudinn, 1903) a *E. dispar* (Brumpt, 1925), což bylo popsáno již v roce 1971 (Rao et al. 1971) a přenos *G. intestinalis*, který byl zaznamenán roku 1981 (Kasprzak et Majewska 1981).

Z výzkumů, které se prováděly v 11 základních školách v městské části severního Taiwanu bylo prokázáno, že švábi *Blatella germanica* a *Periplaneta americana* rozšiřují infekci *E. histolytica*, *E. dispar* a *G. intestinalis*. Přes 25% *P. americana* a 10% *B. germanica* bylo pozitivních na přítomnost cyst *E. histolytica* a *E. dispar* na povrchu kutikuly a v zažívacím traktu (Pai et al. 2003).

Při laboratorních experimentech v 70. letech, byly švábům *P. americana* a *B. germanica* podávány oocysty *T. gondii* a *Sarcocystis*. Z výsledků bylo patrné, že oocysty přenášené těmito šváby, byly infekční (Smith et Frenkel 1978). Oocysty *Sarcocystis*, prošlé *P. americana* si uchovávaly svoji infekčnost po dobu 20 dní. Oocysty prošlé *B. germanica* byly infekční po dobu 5 dní. Oocysty *T. gondii* prošlé *P. americana* byly infekční pouze 10 dní a oocysty prošlé *B. germanica* byly infekční jen několik málo minut po vyloučení (Smith et Frenkel 1978). Tito biologové také zjistili, že *P. americana* a *B. germanica* přenáší oocysty *I. rivolta* a *I. felis*. V roce 1989 byl prováděn výzkum ve 4 pediatrických odděleních v Malajsii. Ze švábů *P. americana*, *B. germanica*, *P. brunnea* a *Supella longipalpa*, byli izolovány bakterie, zahrnující patogenní a potenciální patogenní bakterie *Shigella boydii*, *S. dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella oxytoca*, *K. ozaena* a *Serratia marcescens* (Oothuman et al. 1989). Švábi však nemusí přenášet pouze bakterie. Přišlo se také na to, že *P. americana* přenáší rovněž helminty, konkrétně vajíčka Oxyuridae, vajíčka Ascaridae, larvy nematod, vajíčka Cestoda a vajíčka Toxocaridae (Thyssen et al. 2004)

V roce 2006 byl potvrzen také přenos *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a *Salmonella* šváby druhu *B. germanica*. Z pokusu, který byl prováděn v restauračních a

nemocničních zařízení v Addis Abeba (Etiopie) vyplynulo, že švábi jsou skutečně rezervoáry a potencionálními vektory různých patogenů, přenášených jídlem (Tachbele et al. 2006). Přenos patogenů a jejich infekčnost po průchodu zažívacím traktem švábů se liší mezi jednotlivými druhy švábů. Je to zřejmě kvůli různě vyvinutému ústnímu ústrojí, trávicí soustavě nebo trávicím enzymům, které působí na pozřené oocysty. Švábi *B. germanica* jsou vhodnějšími destruenty oocyst *Sarcocystis* nebo *Toxoplasma*, neboť vyloučené oocysty byly infekční pouze několik dnů nebo minut, na rozdíl od *P. americana*, kdy byly exkretované oocysty infekční po dobu i několika dní. Švábi se mohou také řadit mezi živočichy, kteří pohlcují oocysty kryptosporidií. Ty pak prochází zažívacím traktem beze změny a po průchodu si zachovávají infekčnost po dobu i několika dní (Graczyk et al. 2005).

Tab. 4.: Přehled vybraných patogenů přenášených šváby a rasy
(Upraveno dle: Stejskal et Lukáš 2004, Tاتفeng et al. 2005)

Bakterie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Houby (plísně)
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Pasteurella pestis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus</i> sp.	Viry	<i>Candida</i> sp.
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Coxsackie virus</i>	<i>Mucor</i> sp.
<i>Diplococcus</i> sp.	<i>Polyomyelitis virus</i>	<i>Rhizopus</i> sp.
<i>Enterococcus</i> sp.		
<i>Citrobacter freundii</i>	Eukaryota	Helminti
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Entamoeba histolytica, dispar</i>	<i>Trichuris trichiura</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Toxocara</i> sp.
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Isospora belli</i>	<i>Necator americanus</i>
<i>Salmonella</i> sp.	<i>Sarcocystis</i> sp.	<i>Strongyloides stercoralis</i>
<i>Serratia</i> sp.	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Enterobius vermicularis</i>
<i>Shigella</i> sp.	<i>Balantidium coli</i>	<i>Taenia saginata</i>

Stejně jako švábi a mouchy, i brouci živící se výkaly mohou přenášet lidské nebo zvířecí patogeny uvnitř nebo na povrchu svého těla (Mathison et Ditrich 1999). Bylo například zjištěno, že koprofágní brouci *Onthophagus* spp., jsou schopni přenášet oocysty *Toxoplasma gondii*, které si svou infekčnost udržely i několik měsíců po pozření (Graczyk et al. 2005).

Mathison et Ditrich provedli pokus s brouky *Onthophagus fracticornis*, *Anoplotrupes stercorosum* a *Aphodius rufus*, kterým byly podávány kočičí výkaly, obsahující oocysty

C. parvum. Po 24 hodinách byl trávicí trakt a kutikula brouků vyšetřena na přítomnost oocyst. Ty byly nalezeny jak na povrchu brouků, tak i v jejich trávicím traktu. Část oocyst prošla trávicím traktem brouků bezezměny, avšak větší část oocyst byla poničena a destruována. Oocysty, na povrchu těla těchto brouků, byly infekční po několik měsíců (Saitoh et Itagaki 1990, Graczyk et al. 2005).

Z těchto brouků byly rovněž získávány oocysty isospor, které brouci požírají spolu s trusem zvířat (Saitoh et Itagaki 1990). Koprofágní brouci, kteří snižují počet oocyst v prostředí, mohou být považováni za důležitý aspekt v ekologii gastro- intestinálních nemocí lidí a zvířat (Mathison et Ditrich 1999).

Z těchto poznatků je jasné, že synantropní mouchy a koprofágní brouci hrají důležitou roli v přenosu různých patogenů. Část těchto patogenů bezezměny prochází jejich zažívacím traktem (Mathison et Ditrich 1999) a mohou se pomocí výkalů nebo přenosu přes exoskelet rozšiřovat do okolí, kde mohou nakazit další hostitele. Také bylo prokázáno, že tento hmyz dokáže snižovat počet oocyst v prostředí (Mathison et Ditrich 1999). Je tedy nezbytné předejít tomu, aby se hmyz dostal do blízkosti jídla nebo vody, protože hmyzí potenciál pro mechanický přenos infekčních oocyst je skutečně veliký (Graczyk et al. 2005).

3. Diskuze

V předložené práci jsem se snažila shrnout informace o patogenu rodu *Cryptosporidium* a poukázat na to, co se děje s oocystami v prostředí, pokud se dostanou do kontaktu s různými skupinami vodních nebo suchozemských bezobratlých.

Oocysty kryptosporidií se mohou šířit jak suchozemskou tak vodní cestou. Nejčastěji je jejich přenos spojován právě s vodou, do které se spolu s dalšími patogeny dostávají vlivem dešťových srážek nebo záplav. Z tohoto důvodu je nutné dbát na kvalitu vody, neboť jsou s ní lidé a zvířata v každodenním kontaktu a je jimi hojně využívána. Proto, aby se předešlo rozsáhlým epidemiím, jako např. v Milwaukee roku 1993, kdy bylo nakaženo okolo 403 tisíc lidí nebo v Oslu roku 2007, kdy se nakazilo 6 tisíc lidí, by bylo vhodné využít různých vodních živočichů, především bezobratlých, kteří s potravou přijímají (ať už cíleně nebo náhodně) také oocysty kryptosporidií a tím snižují jejich počty ve sladkých nebo slaných vodách a zvyšují tak kvalitu vod. Tito živočichové mají schopnost oocysty pozřít a poté vyloučit buď beze změny, čímž přispívají k šíření infekce, nebo je mohou za pomoci trávicích enzymů ve svých zažívacích trakttech degradovat. Někteří mají dokonce schopnost oocysty ve svých tkáních kumulovat.

Mezi živočichy, kteří oocysty účinně pohlcují, se řadí zejména eukaryota, vířníci, perloočky, žábronožky, mlži a plži. Mezi nejprobádanější a v tomto směru velmi nápomocná eukaryota patří treпка *Paramecium caudatum* a améba *Acanthamoeba*. Vířníci, perloočky a žábronožky jsou výjimeční tím, že oocysty po pozření velmi rychle exkretují (15- 20 min). Perloočky navíc oocysty ve vodě aktivně vyhledávají. Mohli by proto být využiti při krátkodobém sledování stavu vody a pro stanovení aktuálního stavu vody. Naproti tomu mlži by mohli být využiti při dlouhodobém monitorování stavu vody, neboť oocysty exkretují až po delší době. Mlži jsou pro studium kryptosporidií ve vodách výborným „nástrojem“. Nejen, že oocysty pohlcují díky filtraci přes žábra, ale dokáží také zfiltrované oocysty kumulovat ve svých tkáních a také na žábrech. Většina mlžů pohlcuje oocysty a další patogeny z bentosu, neboť v něm ryjí a přitom si hledají potravu. Vzhledem k jejich velmi malé schopnosti destrukce pozřených oocyst, se mlži stávají velkou hrozbou pro jejich konzumenty, ať již živočichy (žraloky, ryby, korýše, želvy, ptáky nebo savce- vydry), nebo pro člověka. Patří totiž mezi vyhledávanou pochoutku zejména v přímořských oblastech. Za delikatesu jsou považováni hlavně mořští mlži, existují ovšem různé etnické skupiny, převážně z východní Asie, které vyhledávají také mlže sladkovodní. Nedostatečnou tepelnou úpravou mlžů se do těla jejich konzumentů mohou dostat i infekční oocysty, které mohou způsobit kryptosporidiózu a u imunodeficientních pacientů dokonce i smrt. Řada bezobratlých obývajících vodní prostředí je schopna nejen oocysty kryptosporidií pohltnout, ale i degradovat. Mezi tyto živočichy bychom mohli zařadit vířníky, perloočky a žábronožky. U

vířníků se na destrukci může podílet mastax a trávicí enzymy přítomné ve slinách, žaludku a střevě. U perlooček a žábronožek by oocysty mohly být narušeny pomocí mandibul a jejich stěna by mohla být porušena pomocí enzymů z čelistní nebo hepatopankreatické žlázy. Do této skupiny živočichů bychom zřejmě mohli zařadit také mlže, neboť Graczyk a jeho tým roku 1997 zjistili, že hemocyty mlžů fagocytují oocysty kryptosporidií. Do budoucna je ovšem nutné zabývat se tímto tématem podrobněji, neboť se z několika málo výsledků, které tito biologové získali, nedá vyvodit jednoznačný závěr o tom, zda mlži oocysty pomocí hemocytů skutečně degradují. Jako další potenciální destruenty oocyst bychom mohli zmínit eukaryota. Jimi pohlcené oocysty by mohly být, stejně jako ostatní potrava, obklopeny váčky s enzymatickým obsahem. Ven z těla by se pak oocysty mohly dostávat již destruované a tudíž neschopné infekce. Tuto hypotézu se však také ještě nepodařilo prokázat. Stejně tak nebylo prokázáno, zda by mohli být destruenty také plži. Ze svého předpokusu jsem totiž zjistila, že část oocyst prošla plži nezměněna a část prošla poškozena, což by znamenalo, že se na jejich destrukci podílela buď radula, nebo společně s ní i trávicí enzymy. Tuto skutečnost bych chtěla do budoucna objasnit a získat tak nové poznatky ohledně pohlcování oocyst plži. Bohužel se přesně neví, jaké části těla nebo jaké enzymy se podílí na destrukci oocyst.

Ze znalostí, které dnes máme o schopnostech vodních bezobratlých živočichů v souvislosti s oocystami kryptosporidií, bychom tyto živočichy mohli použít namísto současných metod, které jsou často složité a velmi finančně i časově náročné. Jednou z takových metod je např. filtrace. Je sice nejpoužívanější, zároveň je však velice zdlouhavá, neboť je potřeba zfiltrovat ohromné množství vody a často se vyskytují komplikace se zanášením nebo ucpáváním filtrů. Někdy se také stane, že jsou přefiltrované vzorky negativní, ale v organismech se oocysty stále nacházejí. Dalším problémem v souvislosti se zkvalitněním vod je odstraňování oocyst z vodních zdrojů, protože jejich malá velikost znemožňuje stoprocentní zachycení vodními filtry při úpravě vody. V tomto směru by se dalo využít eukaryot, vířníků nebo korýšů, neboť dokáží účinně detekovat oocysty ve vodním sloupci. Oocysty jsou také rezistentní na koncentrace chlóru používané k dezinfekci pitné vody (King et Monis 2006), ozonace vody usnadňuje jejich sedimentaci, ale nezabíjí je (Dolejš et al. 2000). Z těchto důvodů není možné zcela zabránit jejich přítomnosti v pitné vodě a následně infekci u lidí. Při těchto situacích by bylo vhodné využít mlže, jelikož z bentosu pohlcují spolu s potravou také oocysty kryptosporidií, které se zde vyskytly právě vlivem sedimentace a navíc mají schopnost kumulovat oocysty ve tkáních. Osobně si myslím, že by se počet oocyst ve vodě snížil a tím by byl tento problém alespoň částečně vyřešen. Použitím různých druhů bezobratlých, kteří dokáží patogeny detekovat, ale i účinně degradovat, by se tedy dalo přejít k ekonomičtějším, ekologičtějším a také méně časově náročnějším metodám. Myslím si, že by to mělo své nespočetné výhody, jelikož jsou bezobratlí živočichové většinou nenároční na

sběr nebo chov, jsou často kosmopolitně rozšířeni a díky tomu by mohli detekovat nebo degradovat patogeny po celém světě, jak ve sladkých tak i ve slaných vodách.

Jak již bylo dříve zmíněno, oocysty se nešíří pouze vodou. Na souši se s nimi můžeme setkat např. v půdě, ve výkalech nebo na místech s nimi spojených (toalety, jatka, odpadky atd.). Ze zatím probádaných bezobratlých živočichů, kteří se v těchto prostředích podílejí na přenosu, popřípadě destrukci oocyst, můžeme zmínit především koprofágní hmyz, synantropní mouchy a půdní hlístice. Nejprobádanější hlísticí je *C. elegans*, která je již dlouho uznávaným nástrojem molekulární a vývojové biologie. Kromě oocyst kryptosporidií přenáší mnoho různých patogenů např.: *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. welshimeri* nebo *B. cereus*. V roce 2007 zjistili Huamanchay a jeho kolegové, že *C. elegans* pohlcují oocysty kryptosporidií v půdě a mají schopnost chránit oocysty před vyschnutím. Ačkoliv *C. elegans* oocysty zřejmě aktivně nevyhledávají, ale pohlcují je spíše náhodně, mohli by být využiti při monitorování kvality půd. Faktem ovšem zůstává, že tato práce je jednou z prvních prací, která byla provedena na hlísticích ve spojitosti s kryptosporidii a že výzkum půdních hlístic, v souvislosti s pohlcováním nebo destrukcí oocyst kryptosporidií, je stále ještě v začátcích. Osobně si myslím, že by bylo vhodné se tímto tématem zabývat do budoucna podrobněji. Jistě by bylo rovněž zajímavé zjistit, zda mají i jiní půdní bezobratlí např. kroužkovci nebo půdní hmyz, také schopnost pohlcovat nebo destruovat oocysty kryptosporidií. Této skutečnosti by se pak dalo využít při monitorování stavu půdy.

Vedle půdních hlístic, se na přenosu a destrukci oocyst na souši podílí hmyz, konkrétně synantropní mouchy a koprofágní brouci. Tento hmyz, který kromě oocyst kryptosporidií přenáší patogeny jako např.: *Entamoeba*, *Isospora*, *Giardia*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma* atd., se živí na výkalech především hospodářských zvířat. Bylo zjištěno, že aktivně oocysty nevyhledává a přijímá je spíše náhodně s potravou. Oocysty pak přenáší jak ve svém zažívacím traktu, tak na svých kutikulách, kde se přichytí díky elektrickému náboji exoskeletu. Tento přenos je spojován zejména se šváby a synantropními mouchami. Díky přítomnosti křídel, schopnosti létat a skutečnosti, že některé dospělé mouchy dokáží uletět až 3 km, jsou oocysty přeneseny do velmi širokého okolí. Jedinými zatím zjištěnými destruenty na souši jsou koprofágní brouci. Mathison et Ditrich zjistili v roce 1999, že část oocyst prošlá zažívacím traktem brouků byla porušena a neschopná života i infekce. Na destrukci by se v tomto případě zřejmě mohly podílet čelisti a s nimi trávicí enzymy nacházející se v zažívacím traktu brouků. Na švábech a broucích byla bohužel provedena pouze jedna studie, ze které se ovšem nedají vyvozovat cílené závěry. Je proto nutné zaměřit se na podrobnější výzkum těchto živočichů, neboť jsou to zatím skutečně jediní zjištění suchozemští destruenti oocyst. Bylo by rovněž vhodné zjistit, zda nemají také další suchozemští bezobratlí schopnost pohlcovat oocysty a destruovat je. Takovýto živočichové by mohli snižovat infekční oocysty ve výkalech nakažených zvířat, čímž by se předešlo přenosu infekce například na hospodářské plodiny, které se běžně používají v domácnostech- zelenina

(saláty do hamburgerů), ovoce (jablečný mošt) (Smith et al. 2007), neboť se i v dnešní moderní době hnojí některé zemědělské plodiny právě trusem hospodářských zvířat.

Další výzkum různých skupin bezobratlých ať již vodních nebo suchozemských, kteří jsou schopnými destruenty oocyst nebo kteří slouží jako zdroj oocyst kryptosporidií, je nezbytný k objasnění mechanismů zahrnujících udržení infekčnosti patogenů v přenašeči, schopnost rozmanitých typů transportu (např. exoskelet, zažívací trakt) nebo dočasné prostorové rozmístění patogenů z kontaminovaných zdrojů do okolí.

4. Závěry

- Vířníci a perloočky mohou být využíváni jako indikátory pro aktuální stanovení přítomnosti oocyst kryptosporidií ve vodě, neboť velmi rychle vylučují pozřené oocysty.
- Půdní hlístice mají schopnost chránit oocysty kryptosporidií před vyschnutím. Na jejich destrukci se nepodílejí, naopak, mohou prodloužit jejich přežití.
- Perloočky aktivně vyhledávají oocysty kryptosporidií ve vodním sloupci. Pomocí predace pak významně snižují množství infekčních oocyst ve vodě.
- Mlži mohou být využiti jako dlouhodobé indikátory vody, neboť vylučují oocysty až po delší době. Po vyloučení zůstávají oocysty životaschopné, neboť mlži mají velmi malou schopnost destrukce .
- Mlži mají schopnost kumulovat v tkáních zfiltrované oocysty kryptosporidií. Tímto se stávají nebezpečnými pro jejich konzumenty. Po nedostatečné tepelné úpravě se do těla konzumentů dostávají také infekční oocysty.
- Zjistila jsem, že plži mají zřejmě schopnost degradovat oocysty. Na jejich destrukci se podílí pravděpodobně radula a trávicí enzymy.
- Koprofágní brouci jsou zatím jediní zjištění destruenti oocyst na souši. Infekční oocysty jsou degradovány zřejmě pomocí kusadel a trávicích enzymů.
- Synantropní mouchy přenášejí v zažívacích traktech a na kutikulách oocysty do velkých vzdáleností. Proto jsou řazeny mezi důležité mechanické přenašeče oocyst.

5. Literatura

- **Adékambi T., Salah S. B., Khlif M., Raoult D., Drancourt M., 2006:** Survival of environmental *Mycobacteria* in *Acanthamoeba polyphaga*. Appl. and Env. Microbiol., 72: 5974- 5981
- **Anderson G. L., Caldwell K. N., Beuchat L. R., Williams P. L., 2003:** Interaction of a free- living soil nematode, *Caenorhabditis elegans*, with surrogates of foodborne pathogenic bacteria. J. Food Prot. 66: 1543- 1549
- **Arndt H., 1993:** Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates): a review. Hydrobiol., 255/256, 231–246.
- **Arrowood M. J., Sterling C. R., 1997:** Diagnosis. In: Fayer R. (ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, Boca Raton (FL): CRC Press; pp. 223
- **Awad-El-Kariem F. M., Robinson H. A., Dyson D. A., 1995:** Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. Parasitol., 110: 129- 32
- **Bajer A., Cacciò S., Bednarska M., Behnke J. M., Pieniazek N. J., Sinski E., 2003:** Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. J. Parasitol. 89: 1053-1055
- **Bartoš E., 1959:** Fauna ČSR. Svazek 15. Vířníci- Nakl. ČSAV. Praha, pp. 969
- **Bielańska- Grajner I., Radwan S., 1997:** Arthropoda-Stawonogi. In: Razowski J (ed) Wykaz zwierząt Polski (A list of animals of Poland), 4: 1–31. Wydawnictwa Instytutu Systematyki I Ewolucji Zwierząt PAN, Cracow
- **Bichai F., Payment P., Barbeau B., 2008:** Protection of waterborne pathogens by higher organisms in drinking water: a review. Can. J. Microbiol. 54: 509- 524
- **Brieger G., Hunter R. D., 1993:** Uptake and depuration of PCB 77, PCB 169, and hexachlorobenzene by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Ecotoxicol. Environ. Safety, 26: 153- 165
- **Brooks J. L., Dodson S. I., 1965:** Predation, body size, and composition of plankton. Science 150: 28– 35
- **Brůčková P., 2007:** Role vířníků při filtraci oocyst kryptosporidií ve vodním sloupci. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, pp. 33
- **Buchar J., 1992:** Stručný přehled zoologie bezobratlých. Praha: Karolinum, pp. 114
- **Buchar J., Ducháč V., Hůrka K., Léllák J., 1995:** Klíč k určování bezobratlých. Praha: Scientia, pp. 285

- **Burns C. W., 1968:** The relationship between body size of filter-feeding cladocera and the maximum size of particle ingested. *Limnol. and oceanogr.*, 13: 675- 678
- **Camargo M. E., 1973:** Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Revista Brasileira de Patologia Clinica*, 10: 143– 171
- **Carr A., Marriott D., Field A., Vasak E., Cooper D. A., 1998 :** Treatment of HIV- 1 associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet*, 351: 2560- 2561
- **Carreno R. A., Martin D. S., Barta J. R., 1999:** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small. Subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.*, 85: 899- 904
- **Casemore D. P., Garder C. A., O'Mahony O., 1994:** Cryptosporidial infection, with special references to nosocomial transmission of *Cryptosporidium parvum*: a review. *Folia Parasitol.*, 41: 17- 21
- **Casemore D. P., Wright S. E., Coop R. L., 1997:** Cryptosporidiosis- human and animal epidemiology. In: Fayer R, (ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, Boca Raton (FL): CRC Press; pp. 223
- **Clavel A., Doiz O., Morales S., Varea M., Seral C., Castillo F. J., Rubio C., Gómez-Lus R., 2002:** House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*. *Folia Parasitol.*, 49: 163- 164
- **Clemente C. M., Caramori C. A., Padula P., Rodrigues M. A. M., 2000:** Gastric cryptosporidiosis as a clue for the diagnosis of the acquired immunodeficiency syndrome. *Arq. Gastroenterol.*, 37: 180-182
- **Connelly S. J., Wolyniak E. A., Dieter K. L., Williamson C. E., Jellison K. L., 2007:** Impact of zooplankton grazing on the excystation, viability and infectivity of the protozoan pathogens *C. parvum* and *Gairdia lamblia*. *Appl. and Env. Microbiol.*, pp. 7277- 7282
- **Ditrich O., Dolejš P., Půžová G., Machula T., 1998:** Prvoci v pitných vodách a možnost jejich stanovení. Sborník referátů „Mikrobiologický rozbor vod za havarijních situací“. Seminář Komise mikrobiologie vody Československé společnosti mikrobiologické, Velké Karlovice, 13. 14. 10. 1998
- **Ditrich O., Kváč M., Květoňová D., 2005:** Kryptosporidie a životní prostředí. Sborník semináře „Opportunní a opomíjené protozoální střevní nákazy“, Praha, pp. 27- 30

- **Ditrich O., Kváč M., Květoňová D., 2005:** Kryptosporidióza: Rizika pro imunokompetentní a imunodeficitní jedince. Sborník semináře „Oportunní a opomíjené protozoální střevní nákazy“, Praha, pp. 21- 26
- **Dolejš P., Ditrich O., Machula T., Kalousková N., Půžová G., 1999:** Occurrence and separation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia intestinalis* cysts in drinking water treatment. IWSA and IAWQ conference proceedings “Minimising the Risk from *Cryptosporidium* and other Waterborne Particles”, Paris, France, 19-22 April 1999
- **Dolejš, P., Ditrich, O., Machala, T., Kalousková, N., Půžová G., 2000:** Occurrence and separation of *Cryptosporidium* oocysts in drinking water treatment. *Water Science and Technol.*, 41 (7): 159- 163
- **Dumont H. J., 1983:** Biotic factors in the population dynamics of rotifers. *Biogeography of rotifers. Hydrobiol.*, 104: 19–30
- **DuPont H. L., Chappell C. L., Sterling Ch. R., Okhuysen P. C., Rose J. B., Jakubowski W., 1995:** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.*, 332 : 855- 859
- **Ebeling W., 1978:** Urban entomology. University of California Press, Davis, Calif, pp. 209- 213
- **Engstrand L., Enroth H., 1995:** Immunomagnetic separation and PCR for detection *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J. of Clin. Microbiol.*, 33: 2162- 2165
- **Fayer R., 1997:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Boca Raton (FL): CRC Press; pp. 223
- **Fayer R., 2004:** *Cryptosporidium*: a water-born zoonotic parasite. *Vet. parasitol.*, 126: 37- 56
- **Fayer R., Farley C. A., Lewis E. J., Trout J. M., Graczyk T. K., 1997:** Potential role of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2086- 2088
- **Fayer R., Graczyk T. K., Lewis E. J., Trout J. M., Farley C. A., 1998:** Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.*, 89: 107- 112
- **Fayer, R., Morgan U., Upton S. J., 2000:** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305-1322
- **Fayer, R., Trout J. M., Lewis E. J., Xiao L., Lal A. A., Jenkins M. C., Graczyk T. K., 2002:** Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.* 88: 998-1003

- **Fayer R., Trout J. M., Walsh E., Cole R., 2000:** Rotifer ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. Eukaryot. Microbiol., 47: 161- 163
- **Fayer R., Xiao L., 2008:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, second edition. Boca Raton (FL): CRC Press; pp. 560
- **Fotedar R., Shrinivas U. B., Verma A., 1991:** Cockroaches (*Blattella germanica*) as carriers of microorganisms of medical importance in hospitals. Epidemiol. Infect. 107:181-187
- **Frances D., 2003:** Průvodce světem oceánů. Slovart; pp. 64
- **Freire- Santos F., Gómez- Couso H., Ortega- Inarrea M. R., Casto- Hermida J. A., Oteiza- López A. M., García- Martín O., Ares- Mazás M. E., 2001:** Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). Parasitol. Res., 88: 130- 133
- **Freire- Santos F., Oteiza- López A. M., Castro- Hermida J. A., García- Martín O., Ares- Mazás M. E., 2001:** Viability and infectivity of oocysts recovered from clams, *Ruditapes philippinarum*, experimentally contaminated with *C. parvum*. Parasitol. Res., 87: 428- 430
- **Freire- Santos F., Vergara- Castiblanco C. A., Tojo- Rodriguez J. L., Santamarina- Fernandez T., Ares- Mata E., 1998:** *Cryptosporidium parvum*: an attempt at experimental infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Parasitol., 84: 935- 938
- **García L. S., Shum A. C., Bruckner D. A., 1992:** Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. J. Clin. Microbiol., 30: 3255- 3257
- **Godwin T. A., 1991:** Cryptosporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome: a study of 15 autopsy cases. Human. Pathol., 22: 1215- 1224
- **Gomez- Bautista M., Ortega-Mora L. M., Tabares E., Lopes-Rodas V., Costas E., 2000:** Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). Appl. and Env. Microbiol., 66: 1866- 1870
- **Gómez- Couso H., Freire- Santos F., Amar C. F. L., Grant K. A., Williamson K., Ares- Mazás M. E., McLauchlin J., 2004:** Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested- PCR. Inter. J. Food Microbiol., 91: 279- 288
- **Goméz- Couso H., Freire-Santos F., Martinez-Urtaza J., Garcia-Martin O., Ares- Mazas M. E., 2003:** Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standarts. Inter. J. Food Microbiol., 87: 97- 105

- **Gómez- Couso H., Médez- Hermida F., Ares- Mazás E., 2006:** Levels of detection of *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by IFA and PCR methods. Vet. Parasitol., 141: 60- 65
- **Gómez- Couso H., Paniagua- Crespo E., Ares- Mazás E., 2007:** Acanthamoeba as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. Parasitol. Res. 100: 1151- 1154
- **Gons H. J., 1979:** Periphyton in Lake Vechten, with emphasis on biomass and production of epiphytic algae. Hydrobiol. Bull., 13: 116
- **Gookin J. L., Nordone S. K., Argenzio R. A., 2002:** Host responses to *Cryptosporidium* infection. J. Vet. Int. Med., 16: 12- 21
- **Graczyk T. K., Conn D. B., Lucy F., Minchin D., Tamang L., Moura L. N. S., Da Silva A. J., 2004:** Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. Parasitol. Res., 93: 385- 391
- **Graczyk T. K., Conn D. B., Marcogliese D. J., Graczyk H., De Lafontaine Y., 2003:** Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). Parasitol. Res., 89: 107- 112
- **Graczyk T. K., Cranfield M. R., Fayer R., Bixler H., 1999:** House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 61: 500- 504
- **Graczyk T. K., Fayer R., Cranfield M. R., 1996:** *Cryptosporidium* is not transmissible to fish, amphibians, or reptiles. J. of Parasitol., 82: 748- 751
- **Graczyk T. K., Fayer R., Cranfield M. R., Conn D. B., 1998:** Recovery of *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clam (*Corbicula fluminea*). Appl. and Env. Microbiol., 64: 427- 430
- **Graczyk T. K., Fayer R., Cranfield M. R., Mhangami-Ruwende B., Knight R., Trout J. M., et Bixler H., 1999:** Filth flies are transport host of *Cryptosporidium parvum*. Emerg. Infect. Dis., 5: 726- 727
- **Graczyk T. K., Fayer R., Knight R., Mhangami- Ruwende B., Trout J. M., Da Silva A. J., Pieniazek N. J., 2000:** Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 63, pp. 178- 183
- **Graczyk T. K., Fayer R., Lewis E. J., Trout J. M., Farley C. A., 1999:** *Cryptosporidium* oocysts in bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. Parasitol. Res., 85: 518- 521
- **Graczyk T. K., Farley C. A., Fayer R., Lewis E. J., Trout J. M., 1998:** Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the tissues of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) carrying principal oyster infectious diseases. J. Parasitol. 84: 1039-1042

- **Graczyk T. K., Girouard A. S., Tamang L., Nappier S. P., Schwab K. J., 2006:** Recovery, bioaccumulation and inactivation of human waterborne pathogens by the Chesapeake Bay nonnative oyster *Crassostrea ariakensis*. Appl. and Env. Microbiol., p. 3390- 3395
- **Graczyk T. K., Knight R., Tamang L., 2005:** Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. Clin. Microbiol. Rev., p. 128-132
- **Graczyk T. K., Lewis E. J., Glass G., Dasilva A. J., Tamang L., Girouard A. S., Curriero F. C., 2006:** Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* loaded in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. Parasitol. Res., 100: 247- 253
- **Graczyk T. K., Marcogliese D. J., De Lafontaine Y., Da Silva A. J., Mhangami-Ruwende B., Pieniazek N. J., 2001:** *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence River. Parasitol. Res., 87: 231-234
- **Greenberg B., 1973:** Flies and diseases, Vol. II: Biology and disease transmission. Princeton University Press, Princeton, N. J., pp. 447
- **Guerrant R. L., 1997:** Cryptosporidiosis: An emerging, highly infectious threat. Emerg. Infect. Diseases, 3: 51- 57
- **Hayo M., Schwarz G., 1996:** Artemia- Der Urzeitkrebs. M+ S Verlag, pp. 63
- **Hedges A., 1980:** Flies, gnats and midges. In: Mallis A. (ed.), Handbook of pest control. Franzak and Foster Co., Cleveland, Ohio pp. 621-685
- **Herzig A., 1987:** The analysis of planktonic rotifer population: a plea for long- term investigations. Hydrobiol., 147: 163- 180
- **Hijawi N. S., Meloni B. P., Morgan U. M, Thomson R. C. A., 2001:** Compleat developent and long- term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. Inter. J. Parasitol., 31: 1048- 1055
- **Hijnen W. A., Schijven J. F., Bonn  P., Visser A., Medema G. J., 2004:** Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by slow sand filtration. Water Sci. Technol., 50: 147-54
- **Horgan M. J., Mills E. L., 1999:** Clearance rate and filtering activity of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): implications for freshwater lakes. Can. J. Fish Aquat. Sci., 54: 249-255
- **Huamanchay O., Genzlinger L., Iglesias M., Ortega Y. R., 2004:** Ingestion of *Cryptosporidium* oocysts by *Caenorhabditis elegans*. J. Parasitol. 90: 1176- 1178

- **Chalmers R. M., Sturdee A. P., Mellors P., Nicholson V., Lawlor F., Kenny F., Timpson P., 1997:** *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report. Letters in Appl. Microbiol., 25, 380- 384
- **Chmelík V. Ditrich O., Trnovcová R., Gutvirth J., 1998:** Clinical features of diarrhoea in children caused by *Cryptosporidium parvum*. Folia Parasitol., 45: 170- 172
- **Jelínek J., Zicháček V., 2000:** Biologie pro gymnázia. 4. rošřířené vydání. Nakladatelství Olomouc, pp. 559
- **Jenkins M. C., Trout J., Fayer R., 1997:** A semi-quantitative method for measuring *Cryptosporidium parvum* infection using polymerase chain reaction. J. Microbiol. Methods, 28: 99- 107
- **Jenkins M., Trout J., Higgins J., Dorsch M., Veal D., Fayer R., 2002:** Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. Parasitol. Res. 89: 1- 5
- **Jürgens K., Arndt H., Rothaupt K. O., 1994:** Zooplankton-mediated changes of bacterial community structure. Microbiol. Eco. 127: 27– 42
- **Karanis P., 2006:** A review of an emerging waterborne medical important parasitic protozoa. Jpn. J. Protozool., 39: 5- 19
- **Karanis P., Kourenti Ch., Smith H., 2007:** Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J. of Water and Health 5: 1- 38
- **Kasprzak W., Majewska A., 1981:** Transmission of *Giardia* cysts. I. Role of flies and cockroaches. Wiad. Parazytol., 27: 555-563
- **Kato S., Jenkins M. B., Ghiorse W. C., Bowman D. D., 2001:** Chemical and physical factors affecting the excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J. Parasitol., 83: 575- 581
- **Kleinow W., Wratil H., Kühle K., Esch B., 1991:** Electron microscope studies of the digestive tract of *Brachionus plicatilis*. Zoomorphol., 111: 67- 80
- **Komárek J., 1952:** Zoologie bezobratlých. Díl 1. Praha: Přírodovědecké vydavatelství; pp. 579
- **Kuhle K., Kleinow W., 1990:** Glycosidases in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). Comp. Biochem. Physiol., 95: 393- 402
- **Labege I., Griffiths M. W., Griffiths M. W., 1996:** Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. Int. J. Food Microbiol., 32: 1- 26
- **Leland H. V., Scudder B. S., 1990:** Trace elements in *Corbicula fluminea* from the San Joaquin River, California. Sci. Total Environ. 97/ 98: 641- 672

- **Lindemann N., Kleinow W., 2000:** A study of rotifer feeding and digestive processes using erythrocytes as microparticulate markers. *Hydrobiol.*, 435: 27–41
- **Lowery C. J., Nugent P., Moore J. E., Miller B. C., Xiru X., Dopleit J. S. G., 2001:** PCR- IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. *Epidemiol. And Infect.* 127: 545- 553
- **Lupi E., Ricci V., Burrini D., 1995 :** Recovery of bacteria in nematodes isolated from drinking water supply. *Aqua* 44: 212- 218
- **MacKenzie W. R., Hoxie N. J., Proctor M. E., Gradus M. S., Blair K. A., Peterson D. E., Kazmierczak J. J., Addiss D. G., Fox K. R., Rose J. B., Davis J. P., 1994:** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 333: 161– 167
- **Madore M. S., Rose J. B., Gerba Ch. P., Arowood M. J., Sterling Ch. R., 1987:** Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *J. Parasitol.*, 73: 702- 705
- **Majewska A. C., Graczyk T. K., Słodkiewicz-Kowalska A., Kuczyńska-Kippen N., Werner A., Nowosad P., 2003:** Use of rotifers and FISH assay for detection of intestinal protozoan parasites in surface waters. In: *Abstr. Conf. Biol. Chem. Contamination. Food.* Warsaw, Poland, p 39
- **Mathison B. A., Ditrich O., 1999:** The fate of *Cryptosporidium parvum* oocysts ingested by dung beetles and their possible role in the dissemination of cryptosporidiosis. *J. Parasitol.*, 85: 678- 681
- **McMahon R. B., 1991:** Mollusca: bivalvia. In: Thorp J. H., Covich AP (eds) *Ecology and classification of North America freshwater invertebrates.* Academic Press, San Diego, pp 315- 401
- **Megremis S., Segkos N., Daskalaki M., Tzortzakakis E., Paspatis G., Zois E., Sfakianaki E., 2004:** Gallbladder Cryptosporidiosis in patient with acquired immunodeficiency syndrome: Sonographic evaluation of the disease's course. *J. Ultrasound Med.*, 23: 137- 140
- **Meisel J. L., Perera D. R., Meligro C. Rubin C. E., 1976:** Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterol.*, 70: 1156- 1160
- **Méndez-Hermida F., Gómez-Couso H., Ares-Mazás E., 2006:** *Artemia* is capable of spreading oocysts of *Cryptosporidium* and the cysts of *Giardia*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53: 432- 434

- **Méndez- Hermida F., Gómez- Couso H., Ares- Mazás E., 2007:** Possible involvement of *Artemia* as live diet in the transmission of cryptosporidiosis in cultured fish. *Parasitol. Res.*, 101: 823- 827
- **Miláček P., Vítovec J., 1985:** Diferencial staining of *Cryptosporidia* by anilinecarbolyolmetyl violet and tartrazin in smears from feaces and scraping of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.*, 32: 50
- **Millard P. S., Gensheimer K. F., Addiss D. G., Sosin D. M., Beckett G. A., Houck- Jankoski A., Hudson A., 1994:** An outbreak os cryptosporidiosis from fresh- pressed apple cider. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 272: 1592- 1596
- **Miller W. A., Atwill E. R., Gardner I. A., Miller M. A., Fritz H. M., Hedrick R. P., Melli A. C., Barnes N. M., Conrad P. A., 2005:** Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *Int. J. Parasitol.*, 35: 673- 684
- **Minchin D., Lucy F., Sullivan M., 2002:** Monitoring of zebra mussels in the Shannon- Boyle navigation, other navigable regions and principal Irish lakes, 2001 and 2002. *Marine Evi. and Health Series*, pp. 5
- **Morgan U. M., Constantine C. C., Forbes D. A., Thompson R. C. A., 1997:** Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J. Parasitol.*, 83: 825- 830
- **Murvosh C. M., Thaggard C. W., 1966:** Ecological studies of the house fly. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 59: 533- 547
- **Nime F. A., Burek J. D., Page D. L., Holscher M. A., Yardley J. H., 1976:** Acute enterocolitis in human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterol.*, 70: 592- 598
- **Nowosad P., Kuczynska- Kippen N., Slodkowicz- Kowalska A., Majewska A. C., Graczyk T. K., 2006:** The use of rotifers in detecting protozoan parasite infections in recreational lakes. *Aquat. Ecol.*, 41: 47- 54
- **O'Donoghue P. J., 1995:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.*, 25: 139- 195
- **Olsen A. R., 1998:** Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. III. Review of flies and foodborne enteric disease. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 28:199-211
- **Olson R. E., 1976:** Laboratory and field studies on *Glutea stephani* (Hagenmuller), a microsporidian parasite of pleuronectid flatfishes. *J. Parasitol.*, 73: 711- 720

- **Ooms-Wilms A. L., Postema G., and Gulati R. D., 1995:** Evaluation of bacterivory of Rotifera based on measurements of *in situ* ingestion of fluorescent particles, including some comparisons with Cladocera. J. Plankton Res., 17: 1057-1077
- **Oothuman P., Jeffery J., Aziz A. H., Abu Bakar E., Jegathesan M., 1989:** Bacterial pathogens isolated from cockroaches trapped from paediatric wards in peninsular Malaysia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 83: 133- 135
- **Ortega, Y. R., Roxas C. R., Gilman R. H., Miller N. J., Cabrera L., Taquiri C., Sterling C. R., 1997:** 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
- **Pai H. H., Ko Y. C, Chen E R., 2003:** Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*. Acta Trop., 87:355-359
- **Pancieri R. J., Thomassen R. W., Garner F. M., 1971:** Cryptosporidial infection in calf. Vet. Parasitol., 8: 479- 484
- **Persson K., Svenungsson B., de Jong B., 2007:** An outbreak of cryptosporidiosis at a day-care centre in Sweden. Euro Surveill., 12
- **Perz J. F., Ennever F. K., Le Blancq S. M., 1998:** *Cryptosporidium* in tap water: Comparison of predicted risk with observed levels of disease. Am. J. Epidemiol., 147: 289- 301
- **Pokorný V., Šifer F., 2004:** Atlas hmyzu. Praha: Paseka; pp. 71, 98 s příl.
- **Pumann P., 2000:** Hygienické aspekty výskytu kryptosporidií ve vodě. SOVAK (Sdružení Odborů a Kanalizací ČR), 11: 23- 24
- **Půžová G., 1999:** Riziko výskytu *Cryptosporidium parvum* a *Giardia intestinalis* ve vodách. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, pp. 38
- **Rao C. K., Krishnaswami A. K., Gupta S. R., Biswas H., Raghavan N. G., 1971:** Prevalence of amoebiasis and other intestinal parasitic infections in a selected community. Indian J. Med., 59:1365-1373.
- **Robertson L. J., 2007:** The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in human: A review. Int. J. Food Microbiol., 120: 201- 216
- **Robertson L. J., Campbell A. T., Smith H. V., 1992:** *In vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum* under various environmental pressures. Appl. Environ. Microbiol., 58: 3494- 3500

- **Rose J. B., Lisle J. T., LeChavallier M., 1997:** Waterborne cryptosporidiosis: incidence, outbreaks and treatment strategies. In: Fayer R. (ed.) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Boca Raton CRC Press; pp 223
- **Rothhaupt K. O., 1990:** Changes in the functional response of the rotifers *Brachionus rubens* and *Brachionus calyciflorus* with particle size. *Limnol. Oceanogr.*, 31: 24- 32
- **Rousková L., 2008:** Role perlooček jako filtrátorů oocyst kryptosporidií ve vodním sloupci. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, pp. 31
- **Ryvolová K., 2005:** Interakce mezi mlži a kryptosporidiemi. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, pp. 43
- **Říhová- Ambrožová J., 2007:** Nálevníci, Ciliata, Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník. Praha: VŠCHT, Praha
- **Saitoh Y., et Itagaki H., 1990:** Dung beetles, *Onthophagus* spp., as potential transport hosts of feline coccidia. *Nippon Juigaku Zasshi*, 52:293-297.
- **Sarma S. S. S., Larios J. P. S., Nandini S., 2001:** Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera-Brachionidea). *Rev. Biol. Trop.*, pp. 77-84
- **Sedlák E., 2005:** Zoologie bezobratlých. Brno: Masarykova univerzita, pp. 336
- **Schallenberg M., Bremer P. J., Henkel S., Launhardt A., Burns C. W., 2005:** Survival of *Campylobacter jejuni* in water: Effect of grazing by the freshwater crustacean *Daphnia carinata*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 71: 5085- 5088
- **Sládeček V., 1983:** Rotifers as indicators of water quality. *Hydrobiol.*, 100: 169– 201
- **Slifko T. R., Friedman D., Rose J. B., Jakubowski W., 1997:** An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *App. and Env. Microbiol.*, 63: 3669- 3675
- **Smith H. V., Cacció S. M, Cook N., Nichols R. A B., Tait A., 2007:** *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol.* 149: 29- 40
- **Smith D., Frenkel J. K., 1978:** Cockroaches as vector of *Sarcocystis muris* and of other coccidia in the laboratory. *J. Parasitol.*, 64: 315- 319
- **Smith H. V., Nichols R. A. B., Grimason A. M., 2005:** *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.*, 21: 133- 142
- **Smith J. L., 1993:** *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. *J. Food. Prot.*, 56: 451- 461
- **Soave R., Danner R. L., Honig C. L., Ma P., Hart C. C., Nash T., Roberts R. B., 1984:** Cryptosporidiosis in homosexual men. *Ann. Intern. Med.*, 100: 504- 511

- **Stejskal V., Lukáš J., 2004:** Dezinfekce a deratizace v potravinářských provozech- III. Švábi a rusi. Potravinářský zpravodaj, 10: 36
- **Sterling C. R., Miranda E., Gilman R. H., 1987:** The potential role of flies (*Musca domestica*) in the mechanical transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* in a Pueblo Joven community of Lima, Peru. Abstr. Proc. Am. Soc. Trop. Med. Hyg., abstr. 38, 1987
- **Stott R., May E., Matsushita E., Warren A., 2001:** Protozoan predation as a mechanism for removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewaters in constructed wetland. Water Sci. Technol. 44: 191- 198
- **Stott R., May E., Ramirez E., Warren A., 2003:** Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health. Water Sci. Technol., 47: 77-83
- **Szostakowska B., Kruminis- Lozowska W., Racewicz M., Knight R., Tamang L., Myjak P., Graczyk K. T., 2004:** *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill. Appl. and Environ. Microbiol., 70: 3742- 4
- **Šlapeta J., 2007:** Centenary of the genus *Cryptosporidium*: from morphological to molecular species identification. In: Ortega-Pierres, M. G. (Ed). II International *Giardia* and *Cryptosporidium* conference, CABI Publishing, Morelia, Mexico (in press).
- **Šlapeta J., 2008:** Taxonomy of the genus *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa): revision and checklist- iCRYPTO. <http://www.vetsci.usyd.edu.au/research/JanSlapeta> Accessed on Year.Month.Day.
- **Tachbele E., Erku W., Gebre- Michael T., Ashenafi M., 2006:** Cockroach- associated food- borne bacterial pathogens from some hospital and restaurants in Addis Abeba, Ethiopia: Distribution and antibiograms. J. of Pub. Health, 5: 34- 41
- **Tatem H. E., 1986:** Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls and metals from contaminated sediment by freshwater prawns *Macrobrachium resenberghii* and clams *Corbicula fluminea*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 15: 171- 183
- **Tatfeng Y. M., Usuaulele M. U., Orukpe A., Digban A. K., Okodua M., Oviasogic F., Turay A. A., 2005:** Mechanical transmission of pathogenic organisms: The role of cockroaches. J. Vect. Borne Dis., 42: 129- 134
- **Theil-Nielsen J., Søndergaard M., 1999:** Production of epiphytic bacteria and bacterioplankton in three shallow lakes. Oikos. 86: 283– 292
- **Thyssen P. J., Moretti T C., Ueta M., T., 2004:** The role of insect (Blattodea, Diptera and Hymenoptera) as possible mechanical vectors of helminths in the domiciliary and peridomiciliary environment. Cad. Saúde Pública 20: 1096- 1102

- **Tijssen P., 1985:** Practise and theory of enzyme- immunoassays in laboratory techniques in biochemistry and molekular biology. Vol. 15. Edited by R. H. Burdon et P. H. van Knippenberg. Amsterdam: Elsevier
- **Traversa D., Giangaspero A., Molini U., Iorio R., Paoletti B., Otranto D., Giansante C., 2004:** Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from *Chamelea gallina* clams in Italy. Appl. and Environ. Microbiol., p. 4367- 4370
- **Trollope, D R., 1984:** Use of mollusks to monitor bacteria in water. In: Grainger J M, Lynch J M., (ed.), Microbiological methods for environmental biotechnology. Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Series 19. London, England: Academic Press Ltd.; pp. 393–409.
- **Tzipori S., 1983:** Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev., 47: 84- 96
- **Umemiya R., Fukuda M., Fujisaki K., Matsui T., 2005:** Electron microscopic observation of invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. J. Parasitol., 91: 1034- 1039
- **U. S. Environmental Protection Agency, 1999:** Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration / IMS/ FA. Publication EPA 821- R- 99- 006. U. S. Environmental Protection Agency office of water, Washington, D. C.
- **Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J., 2007:** Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton; pp. 318
- **Xiao L., Bern C., Limor J., Sulaiman I., Roberts J., Checkley W., Cabrera L., Gilman R. H., Lal A A., 2001:** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. J. Infect. Dic., 183: 492- 497
- **Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S. J., 2004:** *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev., 17: 72- 97
- **Xiao, L., Morgan U. M., Fayer R., Thompson R. C., Lal A. A., 2000:** *Cryptosporidium* systematic and implications for public health. Parasitol. Today, 16 : 287- 292.
- **Xunde L., Guyot K. Dei- Cas E., Mallard J. P., Ballet J., J., Brasseur P., 2006:** *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). Int. J. Food Microbiol., 108: 321- 325
- **Zerpa R., et Huicho. L., 1994:** Childhood cryptosporidial diarrhea associated with identification of *Cryptosporidium* sp. in the cockroach *Periplaneta americana*. Pediatr. Infect. Dis. J. 13:546-548
- **Zuckerman U., Gold D., Shelef G., Armon R., 1997:** The presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface waters and effluents in Israel. Wat. Sci., 35: 381- 384