

Biologická fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích

2007



Role vířníků při filtraci oocyst kryptosporidií ve vodním sloupci

Bakalářská práce

Vypracovala: Petra Brůčková

Školitel: RNDr. Oleg Ditrich CSc

Školitel specialista: Mgr. Martina Štrojsová

Bakalářská diplomová práce

Brůčková P., 2007: Role vírníků při filtraci oocyst kryptosporidií ve vodním sloupci [The role of rotifers by filtration of *Cryptosporidium* in water column] 33 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Filtration abilities of *Cryptosporidium parvum* oocysts by rotifers (*Brachionus calyciflorus*) were studied. The filtration rate of rotifers is quick: the passage of oocysts through their digestive system is few minutes only. During the first 10 minutes 24 300 of whole amount one million oocysts passed through the digestive system of 100 rotifers. Moreover, 93 % of oocysts were death after passage. All oocysts expelled were unable to infect suckling BALB/c mice. Oocysts were degraded in mastax, stomach and intestine. Rotifers can be use for detection of cryptosporidia oocysts in water and they effectively decrease their numbers.

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi pomohli s touto prací, především mému školiteli specialistovi Martině Štrojsové za trpělivost, se kterou mě vedla při pokusech a za cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli Olegu Ditrichovi za vedení bakalářské práce a připomínky a celému kolektivu Laboratoře lékařské a veterinární parazitologie, zvláště Daně Květoňové za pomoc při práci v laboratoři. Za podporu ve studiu bych pak chtěla poděkovat Honzovi, své rodině a všem přátelům.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze za pomoci uvedené literatury.

.....

České Budějovice, 16.4.2007

Tato práce je součástí programu Laboratoře oportunních parazitů podpořených grantem GA ČR zabývajícím se výzkumem žaludečních kryptosporidií.

Obsah

1.	Úvod	4
1.1.	Rod <i>Cryptosporidium</i>	5
1.1.1.	<i>Cryptosporidium parvum</i>	5
1.2.	Vířníci – Rotifera	8
1.2.1.	Rod <i>Brachionus</i>	9
1.3.	Interakce mezi vířníky a oocystami kryptosporidií	9
2.	Cíle práce	11
3.	Materiál a metody	12
3.1.	Izolace a příprava oocyst <i>Cryptosporidium parvum</i>	12
3.1.1.	Barvení oocyst kryptosporidií (Miláček et Vítovec 1985)	12
3.1.2.	Čištění oocyst na sacharózovém gradientu (Arrowood et Sterling 1987)	12
3.2.	Získání a udržování kultury <i>Brachionus calyciflorus</i>	13
3.3.	Pozorování interakcí mezi vířníky a oocystami kryptosporidií.....	13
3.3.1.	Barvení oocyst kryptosporidií <i>Cryptosporidium</i> - IF Testem (Medac)	14
3.3.2.	Sledování úbytku oocyst kryptosporidií v médiu s vířníky	15
3.3.3.	Osud oocyst v těle vířníků	15
3.3.4.	Barvení oocyst kryptosporidií propidium jodidem a zjišťování procentuálního zastoupení mrtvých oocyst ve vzorku	16
3.3.5.	Infekce myši BALB/c oocystami prošlými trávicím traktem vířníků	16
4.	Výsledky	18
4.1.	Sledování úbytku oocyst kryptosporidií v médiu s vířníky	18
4.2.	Barvení oocyst kryptosporidií <i>Cryptosporidium</i> - IF Testem (Medac)	20
4.3.	Zjištění životaschopnosti oocyst kryptosporidií	21
4.3.1.	Oocyst kryptosporidií barvené propidium jodidem	21
4.3.2.	Počítání procentuálního zastoupení mrtvých kryptosporidií ve vzorku barveném propidium jodidem	22
4.4.	Infekce myši BALB/c oocystami prošlými trávicím traktem vířníků.....	23
5.	Diskuze	24
6.	Závěry	28
7.	Použitá literatura	29

1. Úvod

Řada parazitů člověka a zvířat se přenáší fekálně-orálním transportem. Prostředníkem mezi parazitem a hostitelem je v mnoha případech voda, kterou parazit využívá ke svému šíření a infekci hostitele. Epidemie pocházející z vody způsobují ti paraziti, kteří mají životní stádia velmi odolná vůči působení vnějších vlivů. Z jednobuněčných parazitů jsou to kromě giardií především kryptosporidie. Oocysty kryptosporidií se do vody dostávají kontaminací vodních zdrojů z chovů skotu, splachů z polí hnojených dobytčím trusem a odpadní vodou z lidských sídel (Madore 1987).

Výskytem *Cryptosporidium parvum* a *Giardia intestinalis* v našich vodách se ve své bakalářské práci zabývala G. Půžová (Půžová 1999). Zjistila, že jejich oocysty lze běžně nalézt nejen v surových vodách, ale i ve zdrojích pitné vody. V 80 % vyšetřovaných vzorků byly nalezeny oocysty *C. parvum* a v 15 % cysty *G. intestinalis*.

Oocysty kryptosporidií ve vnějším prostředí přichází do kontaktu se suchozemskými i vodními bezobratlými živočichy. Někteří z těchto živočichů slouží pro oocysty jako vektory k rozšiřování a infekci, jiné naopak dokáží oocysty usmrtit nebo alespoň snížit jejich infektivitu.

Interakce mezi suchozemskými bezobratlými a oocystami kryptosporidií: Během pokusů se synantropními mouchami bylo prokázáno, že oocysty kryptosporidií jsou schopné projít jejich trávicím traktem bez snížení infektivity a jsou mechanickým přenašečem kryptosporidiózy u lidí a zvířat (Graczyk et al. 1999, Graczyk et al. 2004). Podobný pokus byl proveden s kopro-fágními brouky. Cílem pokusu bylo zjistit, zda mohou být brouci vektorem pro oocysty kryptosporidií. V průběhu pokusu bylo prokázáno, že brouci živící se trusem skotu, ovcí a koní likvidují oocysty kryptosporidií (Mathison et Ditrich 1999).

Interakce mezi vodními bezobratlými a oocystami kryptosporidií: Při sledování filtrace oocyst kryptosporidií mlži bylo zjištěno, že oocysty jsou zachycovány na žábrech mlžů a z vody odfiltrovány, zároveň se ale po jídání tepelně neupravených mlžů (ústřic aj.) zvyšuje možnost přenosu infekce oocyst kryptosporidií na člověka (Graczyk et al. 1998). Bylo prokázáno, že mlži mohou sloužit jako rezervoár pro oocysty *C. parvum*. Blízko ústí řek byly nalezeny slávky a srdcovky, které obsahovaly až 1 000 oocyst, jež byly infekční pro neonatální myši (Gomez-Bautista et al. 2000). K. Ryvolová se v bakalářské práci zabýval interakcemi mezi mlži a kryptosporidii. Prokázala, že mlži filtrují oocysty kryptosporidií a oocysty našla i v jejich trávicím ústrojí. Došla k závěru, že mlži by mohli sloužit nejen jako

indikátory přítomnosti oocyst kryptosporidií ve vodě, ale že se podílejí i na odstraňování oocyst kryptosporidií z vody (Ryvolová 2005). Britští autoři vystavili nálevníky, améby a vířníky oocystám *C. parvum*. Všechny sledované druhy oocysty pohlcovaly a predační aktivita a rychlost pohlcování oocyst závisela na typu predátora a hustotě kořisti (Stott et al. 2003).

1.1. Rod *Cryptosporidium*

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou prvoci řazení do kmene Apikomplexa s příbuzností ke gregarinám (Carreno et al. 1999). Jsou to paraziti gastrointestinálního traktu. Hostiteli mohou být ryby, obojživelníci, plazi, ptáci a především savci včetně člověka (Fayer 1997). Kryptosporidie (rod *Cryptosporidium*) se šíří fekálně-orálním transportem. Člověk se může oocystami kryptosporidií nakazit požitím potravy či vody kontaminované oocystami, kontaktem s infikovanými lidmi a zvířaty, kontaktem s výkaly nakažených jedinců (O'Donoghue 1995).

Podle tvaru a velikosti oocysty lze určit, zda se jedná o kryptosporidii střevního či žaludečního epitelu (Xiao et al. 2004). Oocysty napadající buňky střevního epitelu jsou menší, kulovitěho tvaru (např. *C. parvum* 4,5x5 µm). Větší, oválné oocysty se vyvíjejí v epitelu žaludku (např. *C. andersoni* 5,5x7,4 µm). Žaludeční druhy mají méně odolné oocysty a jejich šíření vodou má menší význam než u střevních druhů (Kváč et al. 2007).

Jako první byly kryptosporidie nalezeny u myši (Tyzzer 1910). První infekce u člověka byly popsány až v roce 1976 (Meisel et al. 1976, Nime et al. 1976). Mezi žaludeční kryptosporidie patří *C. muris* Tyzzer, 1910, identifikované u myši, *C. serpentis* Levine, 1980, zjištěné u hadů, *C. galli* Ryan et al., 2003, popsané u kura, *C. andersoni* Lindsay et al., 2004, nalezené u tura,. Zástupci kryptosporidií napadající epitel tenkého střeva jsou *C. parvum* Tyzzer, 1912, nalezené u myši, *C. meleagridis* Slavin, 1955, zjištěné u krocana, *C. wrairi* Vetterling et al., 1971, popsané u morčat, *C. felis* Iseki, 1979, nalezené u koček, *C. saurophilum* Koudela et Modrý, 1998, identifikované u scinka, *C. canis* Fayer et al., 2001, zjištěné u psů, *C. hominis* Morgan-Ryan et al., 2002, nalezené u člověka. *C. molnari* Alvarez-Pellitero et al., 2002, oocysty byly nalezeny v kloace ryb. *C. suis* Ryan et al., 2004, popsané u prasete a *C. baileyi* Current et al., 1986, zjištěné u ptáků. Tyto kryptosporidie byly nalezeny jak v žaludku, tak v epitelu střeva (Thompson et al. 2005). Doposud byly zjištěny tři druhy kryptosporidií způsobující epidemie pocházející z vody: *C. parvum*, *C. hominis* a *C.*

meleagridis. Pro svůj pokus jsem si vybrala druh *C. parvum* z důvodu poměrně snadné dostupnosti oocyst získaných izolací z infikovaných hospodářských zvířat.

1.1.1. *Cryptosporidium parvum*

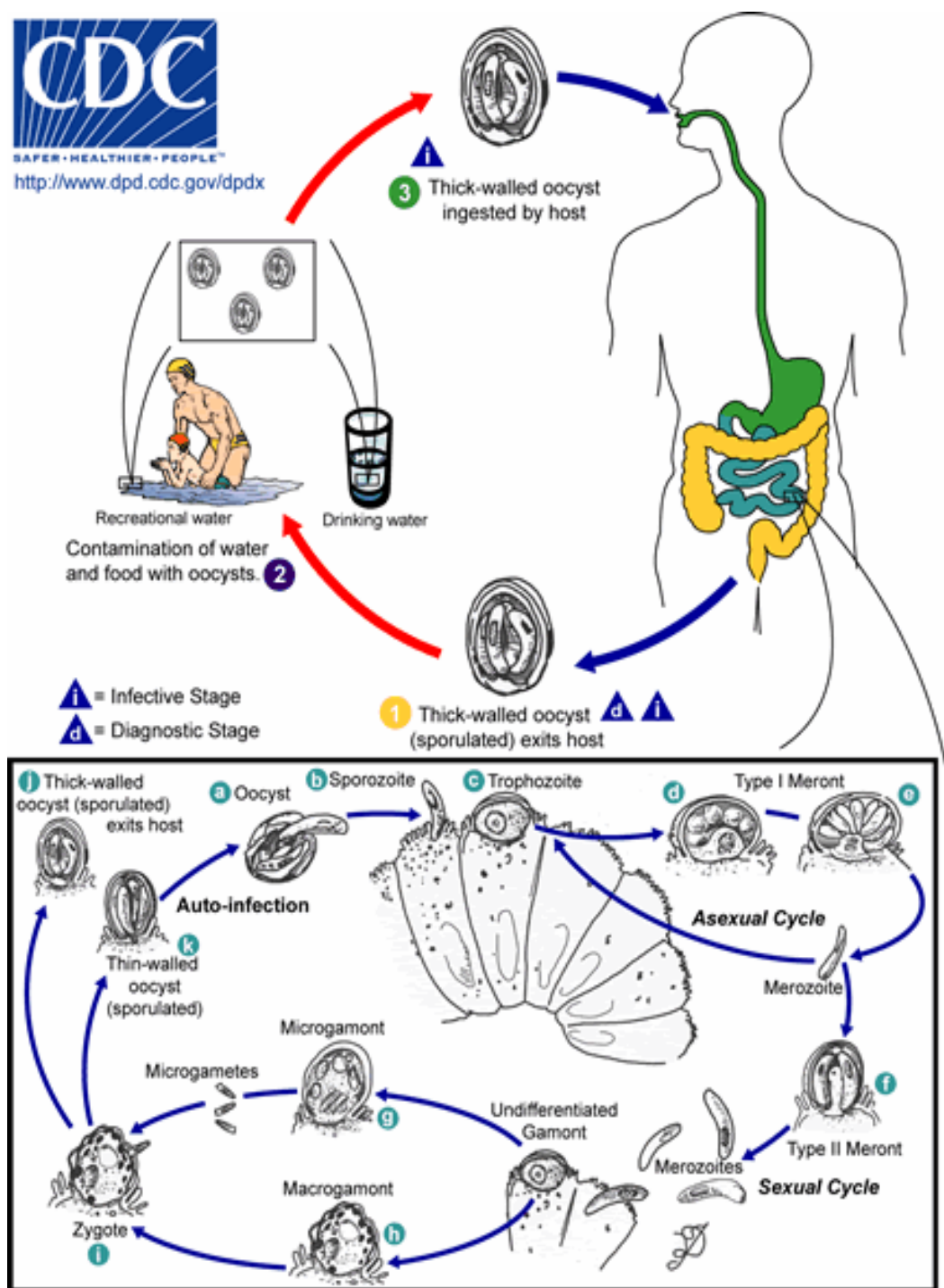
C. parvum se řadí mezi kryptosporidie parazitující v epitelu střeva. Jejich oocysty mají kulovitý tvar a velikost 4,5 x 5,0 μm (Fayer 1997), mají čtyři sporozoity a reziduum. Jejich silnostěnné oocysty s dvojitou membránou jsou schopné infikovat trávicí trakt zvířat i člověka.

Celý vývojový cyklus *C. parvum* probíhá v jednom hostiteli (Obr.1). Po požití silnostěnných oocyst dochází k excystaci a k uvolnění sporozoitů. Ti vnikají do hostitelských buněk a mění se na trofozoity. Trofozoiti se nezanořují do cytoplazmy, ale zůstávají pod buněčnou membránou v parazitoformní vakuole (intracelulární – extracytoplazmatický parazit) a pronikají do lumen. Trofozoiti se nepohlavně dělí a vznikají z nich dva typy merontů. Meronti typu I obsahují šest až osm merozoitů, kteří se po dozrání uvolní z parazitoformní vakuoly a napadají další hostitelské buňky. Meronti typu II mají pouze čtyři merozoity, kteří se gametogonií přemění na sexuální stádia: makrogamonty (samiči) a mikrogamonty (samčí). Po uvolnění do lumen střeva splývají, vzniká zygota a z ní asexuálním vývojem buď tenkostěnné, nebo silnostěnné oocysty. Tenkostěnné oocysty slouží k infekci dalších úseků trávicího traktu. Silnostěnné oocysty odchází z hostitele s trusem a infikují další hostitele. Tyto silnostěnné oocysty jsou dobře vybaveny pro přežití v nepříznivých podmínkách (Fayer et al. 1995, Graczyk et al. 1997). V příznivých podmínkách si svoji infekčnost zachovávají déle než rok (Nichols et al. 2004, Smith et Rose 1990).

Požení infekčních oocyst může způsobit průjmové onemocnění – kryptosporidiózu. Nemoc je doprovázena nekrvavým vodnatým průjmem, kolikovými bolestmi břicha, nechutenstvím, zvracením, úbytkem na váze a zvýšenou teplotou. U imunokompetentních pacientů odezní příznaky do 10 dnů. U imunodeficitních jedinců, zvláště u pacientů s AIDS, je průběh onemocnění těžší. Onemocnění je chronické, často diseminuje do dalších orgánů a ke smrti dochází v 52 až 68 % případů (Rose 1994). Infekční dávka pro dospělého člověka byla odhadnuta na 30 až 100 oocyst (Du Pont et al. 1995). Kryptosporidióza se také vyskytuje u dětí.

K jedné z největších epidemií kryptosporidiózy patří kontaminace veřejného vodního zdroje v Milwaukee (Wisconsin, USA) oocystami kryptosporidií v roce 1993. Projevy této

nemoci trpělo 403 000 osob (Eisenberg et al. 2005, Mackenzie et al. 1995). K výskytu kryptosporidiózy také došlo na několika místech Velké Británie (Anglie a Wales), kde v letech 1992-1995 bylo zaznamenáno 26 epidemií pocházejících z vody. U poloviny případů byla prokázána spojitost s bazény a vodními zdroji (Furtado et al. 1998). V roce 1994 byli v Las Vegas (Nevada, USA) postiženi kryptosporidiózou pacienti s AIDS, kteří se infikovali pitím vody z kohoutku. U nás dosud žádná velká epidemie kryptosporidiózy neproběhla, vyskytují se jen jednotlivé případy u imonodeficitních pacientů a dětí (Chmelík et al. 1998).



Obr.1: Životní cyklus *Cryptosporidium parvum*.

1.2. Vířníci – Rotifera

Vířníci jsou živočichové mikroskopických rozměrů s velikostí těla většinou od 0,1 mm do 0,6 mm, zřídka dosahují velikosti i 3 mm. Vyskytují se hlavně ve sladké vodě, kde jsou součástí zooplanktonu, popřípadě žijí přisedle. V moři žijí jen ojedinělé druhy. Dokáží žít

v malých vodních prostorách, nalézáme je např. v mechu a ve vlhké půdě. Vířníci mají schopnost anabiózy, kdy vytvoří klidové stadium odstraněním co největšího podílu vody z těla a omezením metabolismu na minimum přežívají období s nepříznivými podmínkami (sucho, mráz). U vířníků se vyskytuje epibióza, symbióza a dokonce i parazitizmus. Vířníci mají stálý počet buněk jednotlivých ústrojí (eutelie), stavba četných orgánů je ze soubuní a schopnost regenerace je u nich velmi malá.

Tělo vířníků se skládá ze třech oddílů: hlavy, trupu a nohy. Povrch těla je kryt kutikulou, u některých druhů kutikula tvoří krunýř. Na hlavě je vyvinut vířivý aparát, jenž má pohybovou funkci a pomáhá při příjmu potravy. Většinou je složen ze dvou vířivých věnců (cingulum a pseudotrochus). Trávicí soustava se skládá z úst, ústní dutiny, mastaxu, jícnu, žaludku, střeva, kloaky a řiť (Kleinow et al. 1991, Lindemann et Kleinow 2000). Mastax (žvýkadlo) je složen z pohyblivých kutikulárních destiček a tyčinek a slouží k uchopení a rozmělnění potravy (Bartoš 1959). Trávicí hydrolytické enzymy jsou vylučovány ze slinných žláz do mastaxu a z žaludečních žláz ústících do žaludku a střeva (Kleinow et al. 1991).

Pohlaví jsou oddělena a vývoj je přímý. Samečci jsou mnohem menší než samičky, někdy až trpasličí a v některých případech dokonce chybějí (např. Bdelloidea). Samečci se vyskytují po nepříznivé změně prostředí a žijí jen krátce. Vířníci se rozmnožují pohlavně i nepohlavně. Během příznivých podmínek se rozmnožují nepohlavně partenogenezí, kdy se amiktické samičky množí pomocí neoplozených vajíček. Pod vlivem stimulů prostředí (např. změna délky dne, množství a druh potravy, změna teploty vody) se začnou líhnout miktické samičky, které vytváří haploidní vajíčka, z nichž se bez oplození líhnou samečci. Tito samečci oplodňují miktické samičky, a tak vznikají diploidní trvalá vajíčka se silnými obaly. Trvalá vajíčka jsou velmi rezistentní vůči nepříznivým podmínkám prostředí. Na jaře nebo za vhodnějších podmínek se z trvalých vajíček opět líhnou amiktické samičky. Střídání partenogeneze a pohlavního rozmnožování se označuje jako heterogonie.

Planktonní vířníci mají nezastupitelnou roli v recyklaci živin v ekosystému (Walz 1995). Mají velkou rychlost reprodukce a rychle se přizpůsobují změnám v prostředí (Herzig 1987). Planktonní vířníci se živí převážně fytoplanktonem, nálevníky, heterotrofními bičíkovci, bakteriemi, vířníky, malými perloočkami a detritem (Arndt 1993). Obecně lze říci, že filtrující druhy přijímají potravu o velikosti zhruba od 0,5 μm do 20 μm , lovící druhy potravu větší (od 15 μm) (Rothhaupt 1990). V laboratorních podmínkách jsou vířníci schopni přijímat rozličnou potravu jako 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).

1.2.1. Rod *Brachionus*

Zástupci rodu *Brachionus* mají tělo kryto pevným krunýřem, hlava a noha jsou volné. Krunýř je srostlý z hřbetní a břišní destičky a zadní okraje destiček často vybíhají v různé dlouhé ostny. Noha je dlouhá a zakončena dvěma prsty s lepovými nožními žlázami, jejichž lep slouží k přichycení k povrchu. Vířníci rodu *Brachionus* se vyskytují kosmopolitně ve sladkých vodách. U nás se zástupci rodu *Brachionus* hojně vyskytují v planktonu rybníků, přehradních nádrží, řek i malých tůňek o různé trofi (Bartoš 1959). Je známo 35 druhů vířníků rodu *Brachionus*. U nás se vyskytuje 15 druhů, k těm nejhojnějším patří: *B. angularis* Gosse, 1851, *B. diversicornis* Daday, 1883, *B. forficula* Wierzejski, 1891, *B. budapestinensis* Daday, 1885 a *B. calyciflorus* Pallas, 1766.

1.3. Interakce mezi vířníky a oocystami kryptosporidií

Oocysty kryptosporidií mají dvouvrstvou stěnu, která je chrání před nepříznivými podmínkami prostředí ve vodách a tak si dlouho zachovávají infektivitu (Fayer et al. 1997). Riziko kontaminace vod oocystami kryptosporidií se zvyšuje chovem hospodářských zvířat. Z trusu infikovaných jedinců jsou oocysty odplavovány a dostávají se do podzemních vod i povrchových vod, kde se mohou setkat s přítomnými vířníky.

Fayer et al. (2000) provedl pokus, kdy 6 druhů vířníků (včetně rodu *Brachionus*) bylo vystaveno oocystám *C. parvum*. Neobarvené i obarvené oocysty byly přidány do suspenze vířníků a byly pozorovány mikroskopem. U všech druhů vířníků bylo prokázáno, že pojídají oocysty kryptosporidií. Maximum oocyst (25) bylo pozorováno v žaludcích rodů *Euchlanis* a *Brachionus*. Bylo pozorováno, že vířníci vylučovali chomáče pohlceného materiálu a oocysty.

Na základě publikovaných článků jsem se rozhodla, že se ve své bakalářské práci pokusím zjistit, zda vířníci účinně odstraňují oocysty kryptosporidií z vodního prostředí a zda se sníží infekčnost oocyst prošlých trávicím traktem vířníků.

2. Cíle práce

- Provést literární rešerši o tématu a na jejím základu stanovit vhodný modelový druh vířníků pro pokusy.
- Navrhnout a provést pokus, na jehož základě bude možné stanovit počet oocyst vyloučených trávicím traktem vířníků.
- Provést pokus zda jsou kryptosporidie prošlé trávicím traktem vířníků schopné či neschopné infekce.
- Na základě experimentů zhodnotit roli vířníků při odstraňování oocyst kryptosporidií ve vodách.

3. Materiál a metody

V pokusech jsem pracovala s vířníky druhu *Brachionus calyciflorus* a oocystami *Cryptosporidium parvum*. Oocysty byly izolované z trusu skotu (farma Křenovice, Budějovicko).

3.1. Izolace a příprava oocyst *Cryptosporidium parvum*

Vzorky odebrané ze skotu se nejdříve vyšetřily na přítomnost oocyst *C. parvum*. Byl proveden nátěr trusu na podložní sklíčka a barvení. Následovalo prohlížení pod světelným mikroskopem (1 000-násobné zvětšení). Trus pozitivních vzorků byl zbaven hrubých nečistot převedením přes sítko a následně přečištěn na sacharózovém gradientu. Takto získané purifikované oocysty byly uchovány v chladničce při teplotě 4 °C.

3.1.1. Barvení oocyst kryptosporidií (Miláček et Vítovec 1985)

- rozetření trusu na podložní sklíčko a zaschnutí
- fixace podložního sklíčka methanolem v plameni
- barvení roztokem metylvioleti (0,6 g metylviolet, 1 ml anilin, 1 g fenol, 30 ml alkoholu 96 %, 70 ml deionizovaná voda) po dobu 30 minut
- opláchnutí vodou
- diferencování 2 % kyselinou sírovou (1-2 minuty)
- opláchnutí vodou
- dobarvení tartrazinem (1 % roztok v 1 % kyselině octové) po dobu 1 minuty
- opláchnutí vodou
- zaschnutí sklíčka

3.1.2. Čištění oocyst na sacharózovém gradientu (Arrowood et Sterling 1987)

Zásobní roztoky : 1) Sheaterův roztok: 259 ml deioniz.vody, 405 g sacharózy, 7,29 ml fenolu

2) Roztok PBS-Tween 1 % : 0,5 ml Tweenu 20, 1 000 ml PBS

Pracovní roztok A: 1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly PBS-Tween

B: 1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly PBS-Tween

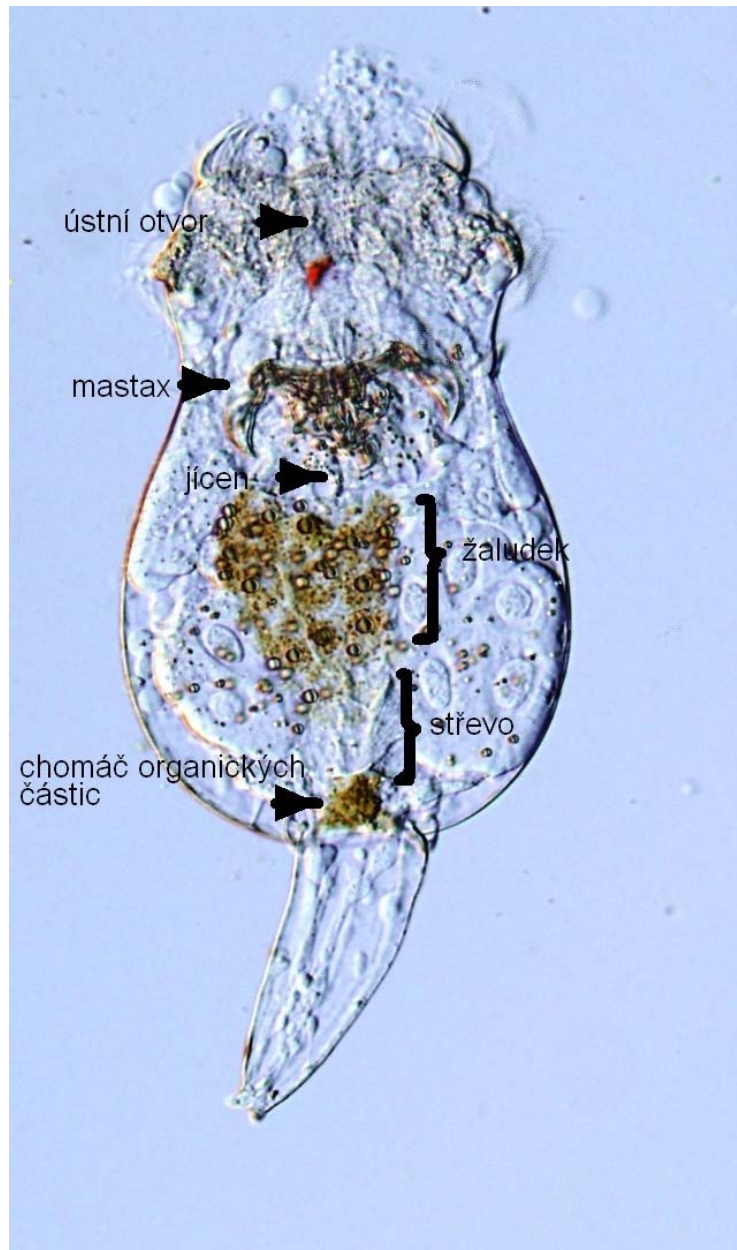
- do 100 ml kyvety navrstvení 30 ml roztoku A, 30 ml roztoku B a 15 ml vzorku (bez hrubých kousků, rozmíchaný)
- centrifugace 30 minut při 1 370 g
- odsátí vrchní tmavě zbarvené vrstvy, převedení zbytku supernatantu do čisté 100 ml kyvety a doplnění vodou
- centrifugace 20 minut při 1 370 g
- odsátí vrchní poloviny, doplnění vodou, rozmíchání a centrifugace 20 minut při 1 370 g
- odsátí vrchní poloviny, doplnění vodou, rozmíchání a centrifugace 20 minut při 1 370 g
- odsátí celého supernatantu, převedení sedimentu do sběrné zkumavky
- skladování sedimentu v chladničce při 4 °C

3.2. Získání a udržování kultury *Brachionus calyciflorus*

Použití vířníci pocházeli z kultury *B. calyciflorus*, která byla původně izolována z Bodamského jezera. Kultura byla získána z Leibnizova Institutu (Berlín, Německo). Tato kultura byla udržována v termoboxu za teploty 19 ± 1 °C a krmena řasou *Chlorella kessleri* Fott et Novakova, která byla získána ze sbírky kultur Botanického Institutu, AV ČR (Třeboň). Z důvodu dostupnosti dostatečného množství vířníků byli používáni i vířníci z trvalých vajíček (MicroBioTest inc., Nazareth, Belgie). Vajíčka byla uchovávána v chladničce při teplotě 4 °C. V případě potřeby byla vajíčka vložena do Z/4 média a ponechána v termoboxu při teplotě 19 ± 1 °C 2 až 4 dny, v závislosti na počtu vylíhlých vířníků. Řasová potrava vířníků, vajíčka i vířníci byli kultivováni v Z/4 mediu (Zehnder et Gorham 1960).

3.3. Pozorování interakcí mezi vířníky a oocystami kryptosporidií

S vířníky a oocystami kryptosporidií bylo provedeno několik pokusů, které měly zjistit, zda jsou vířníci schopni filtrováním účinně odstranit oocysty z vody a zda jsou oocysty prošlé trávicím traktem vířníků schopné infekce.



Obr. 2: *Brachionus calyciflorus*

3.3.1. Barvení oocyst kryptosporidií *Cryptosporidium* - IF Testem (Medac)

Pro účely pozorování oocyst v tělech vířníků byly oocysty kryptosporidií imunofluorescenčně barveny *Cryptosporidium* – IF Testem. Oocysty byly přidávány do vody k vířníkům, proto probíhalo barvení oocyst v mikrozkuhavce (1,5 ml).

- vložení oocyst kryptosporidií (3×10^6 až 5×10^6) do zkumavky a fixování po dobu 5 minut
- centrifugace (13 400 g, 3 minuty)
- odsátí methanolu
- přidání 25 μ l až 50 μ l Crypto Cel Reagent, promíchání na vortexu

- inkubace v termoboxu při teplotě 37 °C po dobu 30 minut
- doplnění PBS na objem 1,5 ml, promíchání na vortexu a ponechání 1 minutu
- centrifugace při 13 400 g po dobu 3 minut
- před přidáním oocyst kryptosporidií do vody s vířníky přidání 25 µl až 50 µl mouting fluid a promíchání
- oocysty kryptosporidií mají světlezelenou fluorescenci

3.3.2. Sledování úbytku oocyst kryptosporidií v médiu s vířníky

V pokusu byly použiti vířníci z kultury, kteří byli přibližně 24 hodin před pokusem přečzením přes sítko (velikost ok 40 µm) převedeni do čistého média bez řasy.

- přidání 5×10^6 oocyst kryptosporidií do 5 ml media s 500 vířníky
- lehké promíchání a ponechání v klidu po dobu 10 minut
- přečzení vířníků přes sítko o velikosti ok 40 µm a převedení do čistého média (5 ml)
- ponechání v klidu po dobu 10 minut
- přečzení vířníků přes sítko a tento postup opakovat ještě dvakrát (celková doba pokusu byla 40 minut)
- počítání vzorků v Bürkerově komůrce

3.3.3. Osud oocyst v těle vířníků

Pro ověření, zda oocysty skutečně prochází trávicím traktem vířníků byly provedeny pokusy, při kterých byly obarvené kryptosporidie přidány k vířníkům, promíchány a vše bylo ponecháno tři až patnáct minut. Poté byli vířníci přečzeni přes polykarbonátový filtr o velikostu pórů 10 µm (Osmonics, Minnetonka, MN, USA). Obarvené oocysty v tělech vířníků byly detekovány fluorescenčním mikroskopem a v některých případech byly vyhotoveny fotografie.

3.3.4. Barvení oocyst kryptosporidií propidium jodidem a zjišťování procentuálního zastoupení mrtvých oocyst ve vzorku

Barvením propidium jodidem (Cozon et al. 1992) bylo zjišťováno, zda jsou kryptosporidie prošlé trávicím traktem vířníků živé či nikoli a jejich procentuální zastoupení ve vzorku. Mrtvé kryptosporidie mají červenou fluorescenci, živé fluorescenci nemají.

- kryptosporidie získané filtrací vířníků (doba expozice vířníků s oocystami byla 10 minut a po převedení byli vířníci ponecháni 10 minut v čistém médiu) zkoncentrování centrifugací (3 minuty, 13 400 g) na objem přibližně 100 μ l
- promíchání vzorku na vortexu a přidání 5 μ l propidium jodidu
- promíchání vzorku na vortexu a umístění na temné místo po dobu 10 minut
- promytí deionizovanou vodou a centrifugace (13 400 g, 3 minuty)
- odsátí většiny vody tak, aby objem vzorku byl 200 μ l až 300 μ l
- kápnutí 5 μ l na podložní sklíčko s jamkou, přidání 3 μ l Sheaterova roztoku (omezení Brownova pohybu) a přiložení krycího sklíčka
- prohlížení sklíčka fluorescenčním mikroskopem (1 000x zvětšení), vyhotovení fotografií
- počítání živých a neživých oocyst v zorných polích, které se navzájem nepřekrývaly

Pokusy byly prováděny s oocystami vyizolovanými z trusu telat v květnu 2006 (v době pokusu byly oocysty kryptosporidií staré 11 měsíců). Abychom zjistili procentuální zastoupení neživých oocyst ve vzorku podávaném vířníkům a následně použitým k infekci myši, byly tyto oocysty barveny propidium jodidem. Počítáním oocyst v zorných polích bylo určeno procento mrtvých oocyst.

3.3.5. Infekce myši BALB/c oocystami prošlými trávicím traktem vířníků

- k 500 vířníkům v 5 ml media přidání 5×10^6 oocyst kryptosporidií
- lehké promíchání a ponechání 20 minut v klidu
- přecezení vířníků přes sítko (velikost ok 40 μ m), převedení do čistého média (5 ml) a ponechání 20 minut
- odebrání vířníků z média přecezením přes sítko
- počítáním vzorku v Bürkerově komůrce, zjištění množství kryptosporidií a přepočítání na skutečný objem (počet kryptosporidií v 5 ml)
- zkoncentrování vzorku s kryptosporidii postupnou centrifugací – centrifugace

- mikrozkumavky (1,5 ml) při 13 400 g po dobu 3 minut
- infekce myši oocystami (10 000 oocyst v 0,2 ml vody)
 - infekce šesti BALB/c myši 3 až 7 dní starých
 - součástí pokusu byla 1 pozitivní (myš infikována oocystami) a 1 negativní kontrola (myš neinfikována)
 - čtvrtý den po infekci odběr vzorků a kontrola trusu
 - diagnostika přítomnosti oocyst kryptosporidií metodou dle Miláčka et Vítovce

4. Výsledky

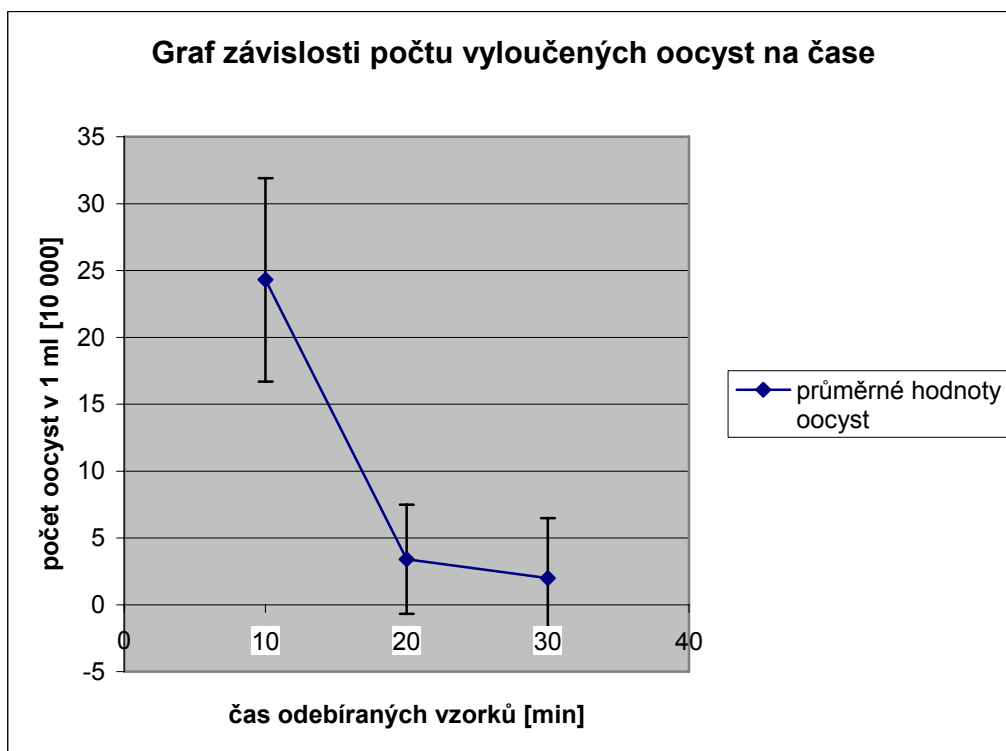
4.1. Sledování úbytku oocyst kryptosporidií v médiu s vířníky

Bylo provedeno 5 pokusů, v rozmezí čtyř měsíců, kdy bylo zjišťováno množství oocyst zbylých ve vodě po desetiminutové inkubace s vířníky a počet oocyst vyloučených vířníky v čistém médiu v intervalech 10, 20 a 30 minut.

Opakování pokusu	I	II	III	IV	V	Průměr
nezfiltrované oocysty (10 min./1 ml)	870 000	940 000	860 000	920 000	910 000	900 000
vyloučené oocysty (10 min./1 ml)	37 500	22 000	18 900	19 700	23 400	24 300
vyloučené oocysty (20 min./1 ml)	10 000	3 700	3 300	0	0	3 400
vyloučených oocysty (30 min./1 ml)	10 000	0	0	0	0	2 000

Tab.1: Počet nezfiltrovaných oocyst a množství oocyst vyloučených vířníky odebíraných v intervalech 10, 20, 30 minut.

Z tabulky 1 je zřejmé, že nejvyšší zaznamenaná hodnota vyloučených oocyst je 10 minut po převedení do čistého média. Průměrná hodnota vyloučených oocyst po 10 minutách je 24 200 oocyst, po 20 minutách 3 400 oocyst a po 30 minutách 2 000 oocyst. Ze systému ubylo 70 300 oocyst. Na 1 vířníka připadá úbytek 703 oocyst za 40 minut pokusu.

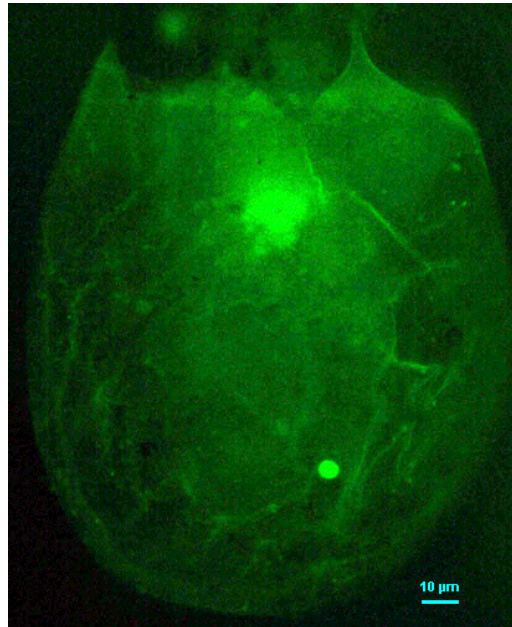


Graf č. 1: Rychlost vylučování oocyst *Brachionus calyciflorus*.

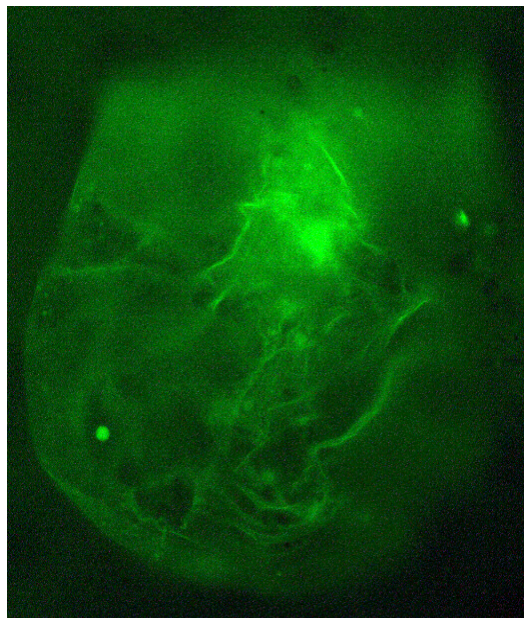
Z grafu 1 je patrné, že zpočátku byla rychlost vylučování oocyst vířníky největší, později rychlost vylučování výrazně poklesla.

4.2. Barvení oocyst kryptosporidií *Cryptosporidium* - IF Testem (Medac)

Obarvené oocysty kryptosporidií byly identifikovány v žaludku, střevě i v mastaxu vířníků.



Obr. 3: Oocysta *C. parvum* v žaludku vířníka *B. calyciflorus*.



Obr. 4: Oocysta *C. parvum* v žaludku vířníka *B. calyciflorus*.

4.3. Zjištění životaschopnosti oocyst kryptosporidií

4.3.1. Oocysty kryptosporidií barvené propidium jodidem

Oocysty prošlé trávicím traktem vířníků byly barveny propidium jodidem. Mrtvé oocysty byly buď obarvené celé nebo v nich byly patrné obarvené merozoity, živé oocysty se neobarvily.



Obr. 5: Mrtvá oocysta *C. parvum* barvená propidium jodidem.



Obr. 6: Mrtvá oocysta *C. parvum*, v níž jsou vidět tři mrtví merozoiti.

4.3.2. Počítání procentuálního zastoupení mrtvých kryptosporidií ve vzorku barveném propidium jodidem

Důvodem k barvení vzorku oocyst přidávaného k vířníkům do vody bylo zjištění, že oocysty jsou izolované již 11 měsíců a pro přesnost měření je nutné znát procento mrtvých oocyst ve vzorku.

Zorná pole	Počet živých oocyst	Počet mrtvých oocyst	Procento mrtvých oocyst
1.	62	11	15 %
2.	48	5	9 %
3.	58	5	8 %
4.	108	5	4 %
5.	42	6	13 %
6.	21	2	9 %
7.	79	7	8 %
8.	98	8	8 %
9.	104	14	12 %
Celkové počty oocyst	620	63	-

Tab. 2: Zjištění infekitivity oocyst kryptosporidií prošlých trávicím traktem vířníků.

Průměrné zastoupení mrtvých oocyst kryptosporidií ve vzorku přidaného do vody k vířníkům bylo $9 \pm 3,2$ % z celkového počtu 683 oocyst (Tab. 2).

Zjištěním procentuálního zastoupení mrtvých oocyst kryptosporidií ve vzorku byla zjištěna účinnost filtrace oocyst vířníky.

Zorná pole	Počet životaschopných oocyst	Počet mrtvých oocyst	Procento mrtvých oocyst
1.	1	6	86 %
2.	2	15	88 %
3.	5	70	93 %
4.	2	27	93 %
5.	3	31	91 %
6.	5	65	93 %
7.	4	71	95 %
Celkové počty oocyst	22	285	-

Tab. 3: Tabulka znázorňující procento mrtvých oocyst ve vzorku oocyst prošlých trávícím traktem vířníků.

Zastoupení mrtvých oocyst ve vzorku je $93 \pm 1,2$ % z celkového počtu 307 oocyst (Tab. 3).

4.4. Infekce myši BALB/c oocystami prošlými trávícím traktem vířníků

	4.den	5.den	6.den	7.den	8.den	9.den	10.den	11.den
myš I	-	-	-	-	-	-	-	-
myš II	-	-	-	-	-	-	-	-
myš III	-	-	-	-	-	-	-	-
myš IV	-	-	-	-	-	-	-	-
myš V	-	-	-	-	-	-	-	-
myš VI	-	-	-	-	-	-	-	-
pozitivní kontrola	-	-	-	-	+	+	+	+
negativní kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 4: Tabulka znázorňuje, zda byly odebírané a barvené vzorky pozitivní či negativní na přítomnost oocyst kryptosporidií (+ pozitivní nález oocyst ve vzorku, - negativní nález).

5. Diskuze

Oocysty kryptosporidií, které způsobují infekční onemocnění gastrointestinálního traktu, nalézáme jak ve sladkých vodách (povrchových i podzemních), tak i v moři. Většinou se pro detekování jejich přítomnosti ve vodě užívá přecezování vody přes filtry. Tento postup s sebou však přináší komplikace: musí se cedit velké množství vody (stovky až tisíce litrů) a filtry se snadno zanášejí a ucpávají (Půžová 1999). Často se stává, že vzorky vyjdou negativně, avšak v organizmech se oocysty nacházejí. Dalším problémem je odstraňování oocyst z vody, protože jejich malá velikost znemožňuje stoprocentní zachycení vodními filtry při úpravě vody. 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. V Austrálii vzrostl výskyt kryptosporidiózy u lidí ze 45 případů (2006) na 140 případů (2007) (<http://www.healthysa.sa.gov.au/HealthAlerts/cryptosporidiosis-sa-2mar07.pdf>). Tento nárůst naznačuje, že standardní postupy čištění vody nemají na odstraňování oocyst dostatečně účinný efekt. Proto se nabízí možnost využití organismů, kteří v sobě kumulují oocysty, jako indikátorů přítomnosti oocyst kryptosporidií, ale i jako nástroj k jejich odstranění. Jedním z těchto organismů jsou i vířníci.

Pro porovnání, zda je účinnější detekce oocyst ve vodě metodou filtrování vody či vyšetření vířníků na přítomnost oocyst, byly v Polsku odebírány vzorky vody ze tří jezer v průběhu celého roku a tato voda byla vyšetřována metodou 1623, založenou na filtraci vody, a odebíráním vířníků ze vzorků vody. Vířníci byly homogenizováni při 8 000 g po dobu pěti minut a pak vyšetřeni na přítomnost oocyst v jejich těle. Z pokusu vyplývá, že metoda používání vířníků jako indikátorů přítomnosti oocyst je více citlivější, méně časově náročná a levnější než jiné dosud používané metody (Nowosad et al. 2006).

Vířníky rodu *Brachionus* jsem si jako vzorový model zvolila z důvodu jasně strukturovaného trávicího ústrojí, v kterém lze pod mikroskopem rozlišit jednotlivé části. Výhodou je také to, že optimální velikost potravních částic pro rod *Brachionus* se shoduje s velikostí oocyst kryptosporidií. Je poměrně velké množství publikovaných článků, kde se používá jako model *B. calyciflorus* a dalším důvodem je také poměrně snadná kultivovatelnost tohoto druhu a jeho běžný výskyt ve vodních tocích a nádržích (Arndt et al. 1993). Schopnost vířníků filtrovat oocysty kryptosporidií byla prokázána v pokusech, které prováděli např. Fayer et al. (2000) a Stott et al. (2003).

Pokud by měli být vířníci využíváni jako indikátory přítomnosti oocyst ve vodách, je třeba zvážit všechny klady i zápory. Vířníci se v závislosti na podmínkách prostředí rozmnožují s různou intenzitou a velikost jejich populace se v průběhu roku mění. Ne všechny druhy vířníků jsou jako indikátory vhodné. Draví vířníci přijímají částice o velikosti od 15 μm a zřejmě by oocysty nepohlcovali, oproti tomu mají filtrující vířníci velikost potravních částic obecně v rozmezí od 0,5 μm do 20 μm (Rothhaupt 1990a). Oocysty kryptosporidií svou velikostí odpovídají částicím běžně pohlcovaným filtrujícími vířníky. Vířníci by mohli být vhodnými indikátory přítomnosti oocyst kryptosporidií ve vodě. Ve své práci jsem používala pouze jeden druh vířníků, ale ve vodách se běžně nalézá mnoho rozličných druhů a proto si nemyslím, že by bylo vhodné volit pouze jeden druh. Dalším důvodem je jejich velikost a četnost v jednotlivých typech vodních zdrojů a ročních obdobích.

Ve vodě žije kromě vířníků i mnoho dalších organismů detekujících kryptosporidie, patří k nim mimo jiné i mlži. Mlži žijí přisedle na dně, filtrace a průchod oocyst jejich trávicím traktem je dlouhodobá záležitost (až několik dní) (Ryvolová 2005) a proto jsou vhodnými indikátory pro zjišťování dlouhodobější přítomnosti oocyst ve vodách. Vířníci oproti nim žijí volně ve vodním sloupci a průchod oocyst jejich trávicím traktem trvá několik minut, byli by proto vhodní jako indikátoři pro zjištění aktuálního stavu oocyst ve vodě např. po prudkých deštích, kdy dochází ke splachům z polí. Bude samozřejmě nutné provést další pokusy, ale ze zjištění účinnosti filtrace oocyst vířníky, by se dala vypracovat metodika pro vyšetřování přítomnosti oocyst ve vodě.

Rychlost a účinnost filtrace vířníků je ovlivněna mnoha faktory jako jsou např. velikost potravních částic, jejich hustota, množství vířníků a jejich stáří, predanční tlak na vířníky, čerstvost potravy a jiné (Stott et al. 2003, Mohr et al. 2002, Lindemann et Kleinow 2000). Koncentrace potravy a velikost částic závisí na rychlosti jejich přijímání. Pokud je velikost přijímaných částic menší než optimální velikost roste rychlost pohlcování lineárně s koncentrací potravy (Rothhaupt 1990b). Vířníci se vyskytují ve vodách o různé trofii. Druh *Brachionus* žije i v eutrofních a hypertrofních vodách (Bartoš 1959). *B. calyciflorus* se dá označit za bioindikátor eutrofních vod (Gammon et Stemberger 1978) a vod znečištěných (Sladeczek 1983). Dá se tedy předpokládat, že je lze nalézt i ve vodách znečištěných močůvkou, které se mohou vyskytovat v blízkosti hospodářských stavení. Bylo by zajímavé zjistit, zda se při kontaminaci půdy vlivem záplav a splachů z polí hnojených trusem zvířat dostávají oocysty do kontaktu s půdními vířníky a zda mezi nimi dochází k interakcím.

Navrhla a provedla jsem pokusy, které mi měly pomoci zodpovědět otázku účinnosti

filtrace oocyst kryptosporidií vířníky a schopnosti infekce oocyst prošlých trávicím traktem vířníků.

V průběhu pokusů sledování úbytku oocyst kryptosporidií v médiu s vířníky se ukázalo, že vířníci uvolňovali nejvíce oocyst v průběhu prvních deseti minut po převedení do čistého média. Poté se rychlost vylučování výrazně sníží. Vysvětlením může být, že vířníci během dalších pokusů měli v žaludcích málo oocyst a proto bylo množství vyloučených oocyst nižší. Dalším vysvětlením může být, že vířníci začnou oocysty trávit s větší účinností. Zjistila jsem, že v průběhu trvání pokusu (40 minut) ubylo ze systému 703 oocyst na jednoho vířníka. Získané hodnoty se zdají být reálné, vezme-li se v úvahu, že v žaludku *Brachionus* bylo napočítáno až 25 oocyst (Fayer et al. 2000). Některé z oocyst, které byly ze systému odstraněny, byly pravděpodobně rozdrceny v mastaxu a stráveny za působení trávicích enzymů v mastabu, žaludku a střevu vířníků (Kleinow et al. 1991). Nelze vyloučit ztráty při manipulaci, avšak vzhledem k získaným hodnotám je považuji za zanedbatelné. Celková doba pokusu byla 40 minut a proto lze vyloučit možnost rozpadu nebo ulpení oocyst na dno. Otázkou je, proč jsou některé oocysty stráveny a jiné projdou trávicím traktem a jsou vyvrženy nepoškozené. To je pravděpodobně způsobeno závislostí rychlosti filtrace vířníků na hustotě a čerstvosti potravy. Pokud je potravy dostatek a je čerstvá, filtruje vířník pravděpodobně větší rychlostí, ale potravu méně tráví, protože jí má dostatek. Pokud je množství potravy sníženo, začne trávit s větší účinností a proto se také zpomalí vyvrhování částic. V našem případě oocyst, jak je vidět v grafu č.1.

Oocysty, které prošly trávicím traktem vířníků a nebyly stráveny, byly vyvrženy v chomáčcích pohlcených částic. Tato skutečnost je ve shodě se zjištěním, které provedli Fayer et al. (2000). Tyto oocysty byly použity pro infekci neonatálních myší. V tabulce č.4 je vidět, že všechny odebrané vzorky vyšly negativně na přítomnost oocyst kryptosporidií. Oocysty prošlé trávicím traktem vířníků tedy nebyly schopné infekce neonatálních myší. Tyto výsledky lze zdůvodnit snížením životaschopnosti a infekivity vyvržených oocyst. Pro ověření životaschopnosti byly vyvržené oocysty barveny propidium jodidem a počítány. Spočítáním poměru živých a neživých oocyst kryptosporidií jsem zjistila, že oocysty vyloučené vířníky po průchodu jejich trávicím traktem jsou z velké části mrtvé a tedy neschopné infekce. Neznám dosud přesné mechanismy snížení infekivity, ale pravděpodobně je způsobena mechanickým poškozením obalu oocysty v mastaxu a natrávením oocysty hydrolytickými enzymy v mastabu, žaludku a střevu vířníků. Z provedených pokusů a získaných hodnot vím, že téměř desetina oocyst podávaných vířníkům byla mrtvých, zatímco po průchodu jejich trávicím traktem se úmrtnost zvýšila na devadesát procent.

Pokusy, které jsem navrhla a provedla jasně ukazují, že vířníci *B. calyciflorus* účinně filtrují oocysty *C. parvum* a tím snižují jejich infekčnost a životaschopnost. V pokusech jsem prokázala, že oocysty prošlé trávícím traktem a vyloučené zpět do vody už nejsou infekceschopné. Samozřejmě je nutné provést ještě další pokusy, které potvrdí schopnost vířníků účinně trávit oocysty kryptosporidií. Podobně jako mlži mohou i vířníci sloužit jako indikátory přítomnosti oocyst ve vodě, což by hlavně v eutrofních vodách mohlo hrát velkou roli. Oproti standardním metodám má užívání vířníků pro detekci oocyst kryptosporidií ve vodě některé nesporné výhody, jednou z nich je nižší pořizovací cena. V mém pokusu prokázaná schopnost vířníků účinně trávit oocysty kryptosporidií, které po průchodu trávícím traktem nejsou schopné infekce, by také neměla být opomenuta.

6. Závěry

- Jako modelový druh pro ověření role vířníků při filtraci oocyst kryptosporidií ve vodním sloupci byl vybrán vířník *Brachionus calyciflorus*.
- Vířníci mohou být užíváni jako indikátory pro aktuální stanovení přítomnosti oocyst kryptosporidií ve vodách.
- Oocysty kryptosporidií prošlé trávicím traktem vířníků nejsou infekceschopné.
- Prokázala jsem, že vířníci filtrují a účinně tráví oocysty *Cryptosporidium parvum* a mohli by být používáni v metodice pro vyšetřování přítomnosti oocyst ve vodách.

7. Literatura

Arndt, H., 1993: **Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) – a review.** *Hydrobiologia*, 255/256: 231-246

Arrowood, M.J., Sterling, C. R., 1987: **Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradient.** *Journal of Parasitology*, 73: 314-319

Bartoš, E., 1959: **Vířníci – *Rotatoria*.** Nakladatelství ČSAV, pp. 969

Carreno, R.A., Martin, D.S., Bart, 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.** *Parasitology Research*, 85: 899-904

Cozon, G., Cannella, D., Biron, F., Piens, M.-A., Jeannin, M., Revillard, J.-P., 1992: ***Cryptosporidium parvum* sporozoite staining by propidium jodide.** *International Journal for Parasitology*, 22 (3): 385-389

Dawson, D.J., Samuel, C.M., Scrannage, V., Atherton, C.J., 2004: **Survival of *Cryptosporidium* species in environments relevant to foods and beverages.** *Journal of Applied Microbiology*, 96 (6): 1222-1229

Dolejš, P., Ditrich, O., Machala, T., Kalousková, N., Půžová, G., 2000: **Occurrence and separation of *Cryptosporidium* oocysts in drinking water treatment.** *Water Science and Technology*, 41 (7): 159-163

Eisenberg, J.N., Lei, X., Hubbard, A.H., Brookhart, M.A., Colford, J.M.Jr., 2005: **The role of disease transmission and conferred immunity in outbreaks: analysis of the 1993 *Cryptosporidium* outbreak in Milwaukee, Wisconsin.** *American Journal of Epidemiology*, 161: 62-72

Fayer, R., 1994: **Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water.** Applied and Environmental Microbiology, pp. 2732-2735

Fayer, R., 1997: ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis.** Boca Raton (FL): CRC Press; pp. 223

Fayer, R., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2004: **Zoonotic protozoa: from land to sea.** Trends in Parasitology, 20 (11): 531-536

Fayer, R., Trout, J. M., Walsh, E., Cole, R., 2000: **Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*.** Journal of Eukaryotic Microbiology, 47(2): 161-163

Furtado, C., Adak, G.K., Stuart, J.M., Wall, P.G., Evans, H.S., Casemore, D.P., 1998: **Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-5.** Epidemiology and Infectious, 121: 109-119

Gammon, J.E., Stemberger, R.S., 1978: **Zooplankton (especially crustaceans and rotifer) as indicators of water quality.** Trans American Microscopic Society, 97 (1): 16-35

Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Tabares, E., Lopez-Rodas, V., Costas, E., 2000: **Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*).** Applied and Environmental Microbiology, 66 (5): 1866-1870

Graczyk, T.K., Fayer, R., Cranfield, M.R., Owen, R., 1997: ***Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane filter dissolution method retain their infectivity.** Journal of Parasitology, 83: 111-114

Graczyk, T.K., Cranfield, M.D., Fayer, R., Bixler, H., 1999: **House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 61 (3): 500-504

Graczyk, T.K., Farley, C.A., Fayer, R., Lewis, E.J., Trout, J.M., 1998: **Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the tissue of eastern oysters (*Crassostrea***

***virginica* carrying principal oyster infectious diseases.** Journal of Parasitology, 84(5): 1039-1042

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.** Parasitology Research, 85 (7): 518-521

Graczyk, T.K., Grimes, B.H., Knight, R., Szostakowska, B., Kruminis-Lozowska, W., Racewicz, M., Tamang, L., Dasilva, A.J., Myjak, P., 2004: **Mechanical transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by flies.** Wiad Parazytol., 50 (2): 243-247

Herzig A. 1987: **The analysis of planktonic rotifer populations: A plea for long term investigations.** Hydrobiologia, 147: 163–180

Chmelík, V., Ditrich, O., Trnovcová, R., Gutwirth, J., 1998: **Clinical features of dinorrhoea in children caused by *Cryptosporidium parvum*.** Folia Parasitologica, 45: 170-172

King, B.J., Monis, P.T., 2006: **Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment.** Parasitology, 134: 309-323

Kleinow, W., Wratil, H., Kühle, K., Esch, B., 1991: **Electron microscope studies of digestive tract of *Brachionus plicatilis* (Rotifera).** Zoomorphology, 111: 67-80

Kváč, M., Květoňová, D., Salát, J., Ditrich, O., 2007: **Viability staining and animal infectivity of *Cryptosporidium andersoni* oocysts after long-term storage.** Parasitology Research, 100 (2): 213-217

Lindemann, N., Kleinow, W., 2000: **A study of rotifer and digestive processes using erythrocytes as microparticulate markers.** Hydrobiologia, 435: 27-41

Mackenzie, W.R., Schell, W.L., Blair, K.A., Addiss, D.G., Peterson, D.E., Hoxie, N.J., Kazmierczak, J.J., Davis, J.P., 1995: **Massive outbreak of waterborne cryptosporidium infection in Milwaukee, Wisconsin – Recurrence of illness and risk of secondary transmission.** Clinical Infectious Diseases, 21: 57-62

- Madore, M.S., Rose, J.B., Gerba, C.P., Arrowood, M.J., Sterling, C.R., 1987: **Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters.** Journal of Parasitology, 73: 702-705
- 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.** Journal of Parasitology, 47: 735-744
- Miláček, P., Vítovec, J., 1985: **Diferencial staining of *Cryptosporidia* by anilinecarbolmetyl violet and tartrazin in smears from feaces and scraping of intestinal mucosa.** Folia Parasitologica, 32: 50
- Mohr, S., Adrian, R., 2002: **Effects of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus rubens* on a manipulated freshwater microbial community.** Journal of Plankton Research, 24 (1): 25-31
- Nichols, R.A.B., Paton, C.A., Smith, H.V., 2004: **Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts after prolonged exposure to still natural mineral waters.** Journal of Food Protection, 67 (3): 517-523
- Nowosad, P., Kuczyńska-Kippen, N., Słodkiewicz-Kowalska, A., Majewska, A.C., Graczyk, T.K., 2006: **The use of rotifers in detecting protozoan parasite infections in recreational lakes.** Aquatic Ecology, 41 (1): 47-54
- O'Donoghue, P.J., 1995: ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals.** International Journal of Parasitology, 25: 139-195
- Pallas, P.S., 1766: **Elenchus zoophytorum sistens generuj adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succintas descriptiones cum selectis auctorum synonymis.** Stran XVI a 17-28 a 1-451
- Playment, P., Plante, R., Cejka, P., 2001: **Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility.** Canadian Journal of Microbiology, 47 (3): 188-193

Půžová, G., 1999: **Riziko výskytu *Cryptosporidium parvum* a *Giardia intestinalis* ve vodách.** pp. 28, Bak. pr., Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Rothhaupt, K.O. 1990a: **Changes of the functional responses of the rotifers *Brachionus calyciflorus* with particle sizes.** Limnology and Oceanography, 35: 24-32

Rothhaupt, K.O. 1990b: **Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species.** Limnology and Oceanography, 35: 16-23

Ryvolová, K., 2005: **Interakce mezi mlži a kryptosporidiemi.** pp. 43, Bak. pr., Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

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

Sladeczek, V., 1983: **Rotifers as indicators of water quality.** Hydrobiologia, 100 (1): 169-201

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 and Science Technology, 47 (3): 77-83

Thompson, R.C.A., Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S., Hijawi, N.S., 2005: ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis.** In: Bakr, J.R., Muller, R. et Rollinson, D. Advances in Parasitology, 59: 75-158

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004: ***Cryptosporidium* Taxonomy: Recent advances and implications for public health.** Clinical Microbiol. Reviews, 17: 72-92

Zehnder, A.A., Gorham, P.R., 1960: **Factor influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenk.** Canadian Journal of Microbiology, 6: 645-660