

Středoškolská odborná činnost 2006/2007
Obor 08 – Ochrana a tvorba životního prostředí

Interakce mezi mlži (*Sinanodonta woodiana*) a kryptosporidiiemi (*Cryptosporidium parvum*)

Autor:

Martina Křižanová
Biskupské gymnázium J.N. Neumanna
Jirsíkova 5
370 21, České Budějovice

Konzultant práce:

RNDr. Oleg Ditrich, CSc.
Laboratoř lékařské a veterinární parazitologie
Parazitologický ústav AV ČR
Branišovská ul. 33
370 05, České Budějovice

České Budějovice, 2007
Jihočeský kraj

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Olega Ditricha, CSc., pouze za pomoci uvedené literatury a internetových stránek.

V Českých Budějovicích dne 11.3. 2007

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi s touto prací pomohli. Především RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za odborné vedení mé práce a za čas, který mi věnoval, dále pak RNDr. Daně Květoňové, Ing. Martinu Kváčovi, PhD. a RNDr. Bohumilu Sakovi, PhD. za cenné rady a za pomoc při práci v laboratoři, Jiřímu Novákovi za nezapomenutelné zážitky z Kroměříže a okolí a za zapůjčenou fotodokumentaci a v neposlední řadě vedení Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za to, že jsem směla využívat zdejšího vybavení.

Tímto bych také chtěla poděkovat své učitelce PaedDr. Miroslavě Nygrýnové za to, že mi zprostředkovala možnost vypracovat mou práci v Laboratoři lékařské a veterinární parazitologie a umožnila tím její vznik.

Anotace práce

Autor: Martina Križanová

Škola: Biskupské gymnázium J.N.Neumanna České Budějovice

Konzultant: RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Klíčová slova: interakce, *Cryptosporidium parvum*, *Sinanodonta woodiana*, oocysta, kryptosporidióza

Počet stran: 35

Rok šetření: 2006/2007

Resumé: Práce se zabývá zkoumáním schopnosti škeble asijské zachycovat ve svém těle oocysty kryptosporidií (*Cryptosporidium parvum*). Teoretická část objasňuje problémy způsobené kryptosporidiemi, resp. jejich oocystami, v pitné vodě a ukazuje jedny z prvních prokázaných případů interakce mezi mlži a kryptosporidiemi. Praktická část popisuje postup pokusů na mlžích, měření získaných vzorků a jejich následné zpracování. Experiment prokázal schopnost mlžů zachytit na svých zábrách oocysty kryptosporidií. Tato schopnost je ovlivňována teplotou okolního prostředí. V systému docházelo k postupnému ubývání oocyst, který byl sice relativně pomalý, ale šetrnější než jiné metody používané k jejich odstranění z pitných vod. Zvolený modelový druh- *Sinanodonta woodiana* se osvědčil jako velice výkonný filtrátor.

Obsah

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST- LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1 BIVALVIA (MLŽI)	8
2.1.1. <i>Sinanodonta woodiana</i> Lea, 1834.....	9
2.2 KRYPTOSPORIDIE	11
2.2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> Tyzzer, 1912.....	13
2.3. KRYPTOSPORIDIÓZA	14
2.3.1. Epidemie kryptosporidiózy	14
2.4 INTERAKCE MEZI MLŽI A KRYPTOSPORIDIEMI.....	15
3. MATERIÁL A METODIKA	16
3.1 MATERIÁL	16
3.2 METODY	16
3.2.1. Předpokus: Sledování filtrace mlžů	16
3.2.2. Pokus: Sledování rychlosti filtrace za snížené teploty.....	17
4. VÝSLEDKY	17
4.1 PŘEDPOKUS: SLEDOVÁNÍ FILTRACE ZA NORMÁLNÍ TEPLoty (10°C) V PRŮBĚHU 1 MĚSÍCE	17
4.2 POKUS: SLEDOVÁNÍ RYCHLOSTI FILTRACE ZA TEPLoty 4 °C BĚHEM 12 DNŮ.....	18
4.2.1 Jednotlivé grafy (hlavní pokus)	20
5. DISKUSE	23
6. ZÁVĚR	25
7. LITERATURA	26
8. PŘÍLOHY	30
8.1 OBRÁZKY <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i>	31
8.2 OBRÁZKY ŠKEBLE ASIJSKÉ (<i>SINANODONTA WOODIANA</i>)	34

1. Úvod

V rámci své středoškolské odborné činnosti jsem se rozhodla studovat interakci mezi mlži, resp. škeblí asijskou (*Sinanodonta woodiana*) a kryptosporidii (konkrétně druh *Cryptosporidium parvum*). Snažila jsem se zjistit, zda *Sinanodonta woodiana*, coby přirozený filtrátor ve sladkých vodách, pohlcuje i oocysty kryptosporidií. Těchto vlastností by se poté dalo využít k jejímu uplatnění jako biologického indikátoru čistoty vody nebo dokonce k odstraňování kryptosporidií z nádrží. Tento výzkum rozhodně není samoúčelný, neboť problematika patogenních prvků v pitných vodách je i u nás závažným problémem.

Nemoc, kterou kryptosporidie způsobují, se nazývá kryptosporidióza. Jedná se o neléčitelné průjemové onemocnění, které sice u zdravého člověka po několika dnech samovolně odezní, ale u imunodeficitních a imunosuprimovaných jedinců může způsobit smrt.

Epidemie kryptosporidiózy jsou také závažným vodohospodářským problémem. Díky rezistenci klidových stádií a vysoké infekčnosti se tento prvek z pitných vod jen obtížně odstraňuje.

Výsledky publikované ve světové literatuře, týkající se problematiky odstraňování oocyst *Cryptosporidium parvum* při úpravě vody jsou zatím nedostačující. Vzhledem k velké složitosti a náročnosti analýz a mnoha faktorům ovlivňujícím chování oocyst při úpravě vody jsou výsledky jednotlivých pracovišť zatím jen obtížně srovnatelné. Stále je velký nedostatek technologicky interpretovatelných výsledků z laboratorních, poloprovozních i provozních pokusů. Dostupná data jsou nesystematická a stále málo reprezentativní na to, aby bylo možno vyvozovat obecnější závěry (Frey a kol., 1998).

Sice již existují způsoby, jak oocysty z vody spolehlivě odstranit, ale je to finančně i časově náročné.

Vlastní práci jsem prováděla v Laboratoři lékařské a veterinární parazitologie Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích, pod vedením RNDr. Olega Ditricha, CSc. Ten mi také navrhl mimo jiné toto téma a já ráda souhlasila, neboť mě tato problematika velmi zaujala.

2. Teoretická část- literární přehled

2.1 Bivalvia (mlži)

Mlži jsou druhou nejpočetnější skupinou ze sedmi tříd kmene *Mollusca* (měkkýši). Většina žije v mořích, přibližně jedna třetina ve sladkých vodách.

Celkem je známo asi 25 000 druhů mlžů, z nichž asi 20 druhů žije na našem území. Kromě škeble rybníčné (*Anodonta cygnea*), vyskytující se spíše ve vodách stojatých, žije v našich potocích a řekách například velevrub malířský (*Unio pictorum*) s protáhle vejčitými lasturami a výrazně vyvinutým zámekem na vnitřní stěně lastur. V šumavských potocích se vyskytuje perlorodka říční (*Margaritana margaritifera*).

Jejich tělo je chráněno lasturou, schránkou vylučovanou pláštěm. V ní se jedinec nachází v poloze na boku. Pohyby lastur jsou zajišťovány svěrači. Schránka bývá slabší, jindy zesílená až masivní, vždy se skládá ze tří vrstev. Stavba stěny misek odpovídá obecné stavbě schránek měkkýšů, u některých skupin bývá mohutně vyvinuta perleťová vrstva. Na vrcholu hřbetní části jsou lastury kloubně spojeny zámekem. Na povrchu lastury vidíme soustředné vrstevnice, které jsou dokladem růstu živočicha.

Kvůli uzavření ve schránce je tělo ze stran zploštělé, bez zřetelné hlavy. Takto zredukovaná hlava již není nosičem smyslových orgánů, tuto funkci převzal okraj pláště.

Noha je primárně velká, druhotně bývá redukována u přisedlých forem. Je vysunována mezerou mezi předními laloky pláště a slouží k pohybu a čechrání sedimentu. V noze bývá byssová žláza, produkující pevná vlákna k přichycení k podkladu (byssová vlákna).

Žábry jsou silně modifikované. Původní lupínkovité žábry (*ktenidie*) jsou většinou nahrazeny nitkovitými (*filibranchie*) nebo lamelovitými (*lamellibranchie*) žábry; žábry mohou i zaniknout a namísto nich se objevuje příčná přihrádka (*septibranchie*). Kromě dýchání slouží žábry i k filtraci potravy (detritu, planktonu) z vody, malá část mlžů potravu vybírá ze sedimentu nebo loví větší kořist. Voda se dostává do plášťové dutiny otvorem při zadním okraji (inhalantní otvor), v jeho blízkosti se nachází i otvor exhalantní, kterým voda plášťovou dutinu opouští. (viz.obr. 8 - přílohy)

Mezi další vnitřní orgány mlžů patří mozková, tělní a nožní nervová uzlina; ústa (postrádající radulu), žaludek, střevo, řitní otvor; srdce, osrdečnicková dutina a pohlavní žlázy.

Mlži jsou převážně gonochoristé a jejich vývoj je nepřímý. Larva se u některých druhů nazývá *veliger*, u jiných je parazitující larva, *glochidie*. U hermafroditických zástupců se rodí plně vyvinutí jedinci podobní dospělcům.

Způsob života mlžů je rozmanitý. Někteří mlži jsou volně pohybliví, jiní leží na dně či žijí v norách pod povrchem dna, ve skalách nebo ve dřevě. Zajímavá je také ústřice, která se ke svému podkladu přicementovává, nebo slávka, která se po přisednutí na místo pevně přichytí pomocí byssových vláken (Ryvolová, 2005).

2.1.1. *Sinanodonta woodiana* Lea, 1834

Škeble asijská je celosvětově rozšířený invazní druh, pochází původně z východní a jihovýchodní Asie. Rozšíření v ČR dosud není zcela známo. Výskyt byl zatím prokazatelně zjištěn ve čtyřech lokalitách, převážně na Moravě. Zařazení do systému je zaneseno v tabulce č.1.

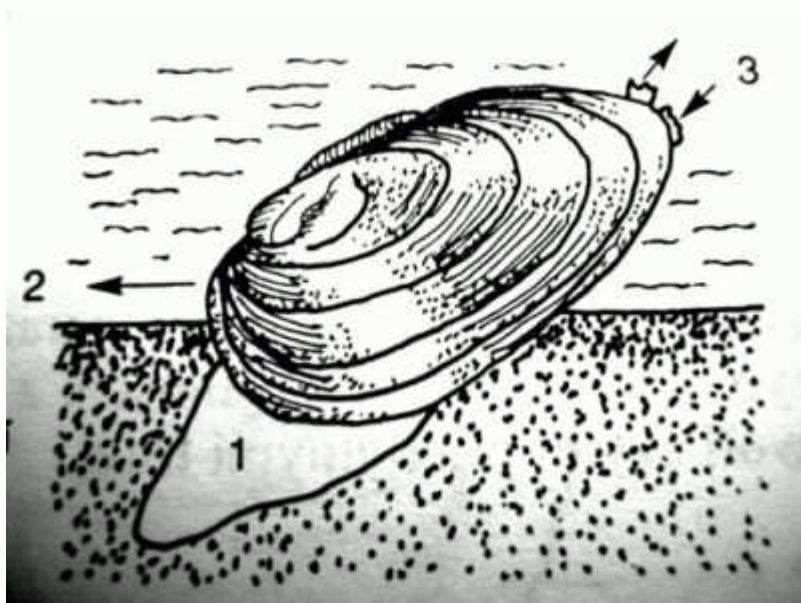
Tab. č.1: Zařazení v systému.

třída	<i>Bivalvia</i> Linnaeus, 1758 - mlži
podtřída	<i>Eulamellibranchia</i> Pelseneer, 1889 - listožábří
nadřád	<i>Palaeoheterodonta</i> Newell, 1965
řád	<i>Unionoidea</i> Stoliczka, 1870
nadčeleď	<i>Unionoidea</i> Rafinesque, 1820
čeleď*	<i>Unionidae</i> Rafinesque, 1820 - velevrubovití
podčeleď	<i>Anodontinae</i> Rafinesque, 1820
rod	<i>Sinanodonta</i> Modell, 1945 - škeble
druh	<i>Sinanodonta woodiana</i> (Lea, 1834) - škeble asijská

**Unionidae*:

velevrub tupý *Unio crassus* Philipsson, 1788 - Čechy, Morava
velevrub malířský *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) - Čechy, Morava
velevrub nadmutý *Unio tumidus* Philipsson, 1788 - Čechy, Morava
škeble říční *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) - Čechy, Morava
škeble rybníčná *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758) - Čechy, Morava
škeble plochá *Pseudanodonta complanata* (Rossmässler, 1835) - Čechy, Morava
škeble asijská *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) - nepůvodní, Čechy, Morava

Škeble asijská (*Sinanodonta woodiana*) žije zahrabaná na dně stojatých a mírně tekoucích vod, zejména v odstavných ramenech a tůních, rybnících a větších řekách.



Obr. č.1:

- 1- svalnatá noha
- 2- směr pohybu živočicha
- 3- dolní přijímací a horní vyvrhovací otvor

(zdroj: Biologie pro gymnázia, J.Jelínek, V.Zicháček)

Tělo má ze stran zploštělé, s redukovanou hlavou. Je kryto dvouchlopňovým pláštěm, vylučujícím 2 miskovité lastury shodné velikostí i tvarem. Měkké tělo škeble je uloženo uprostřed ve střední části dutiny, tvořené lasturami.

U škeblí považujeme širší část jejího těla za oddíl hlavový, užší část těla tvoří zád'. Na užším konci těla jsou dva otvory: spodní otvor přijímací (inhalantní), jímž je okysličená voda s mikroskopickou potravou nasávána do plášťové dutiny a horní otvor vyvrhovací (exhalantní), který odvádí vodu a nestrávené zbytky z kloakálního prostoru.

Svalnatá noha, umístěná v břišní části těla, je ze stran zploštělá a sekerovitá. Při lezení a rytí do dna bývá zpevněna přítokem krve do krevních dutin (erekce).

Trávicí trubice škeble začíná ústním otvorem (mlži nemají slinné žlázy) a pokračuje jícnem do žaludku, obklopeného játry (*hepatopankreas*). Pokračuje pak střevní kličkou, směřující do hřbetní části těla. Konečník prostupuje osrdečníkem a ústí v kloakálním prostoru.

Srdce je uloženo ve hřbetní části těla v osrdečnickovém vaku. Má jednu komoru a dvě předsíně. Čerpá okysličenou krev ze žaber a aortou ji vhání do hlavové části těla a do útroh. Před návratem do žaber se krev v metanefridiích zbavuje látek tělu škodlivých.

Krev mlžů obsahuje hemocyanin a je namodralá.

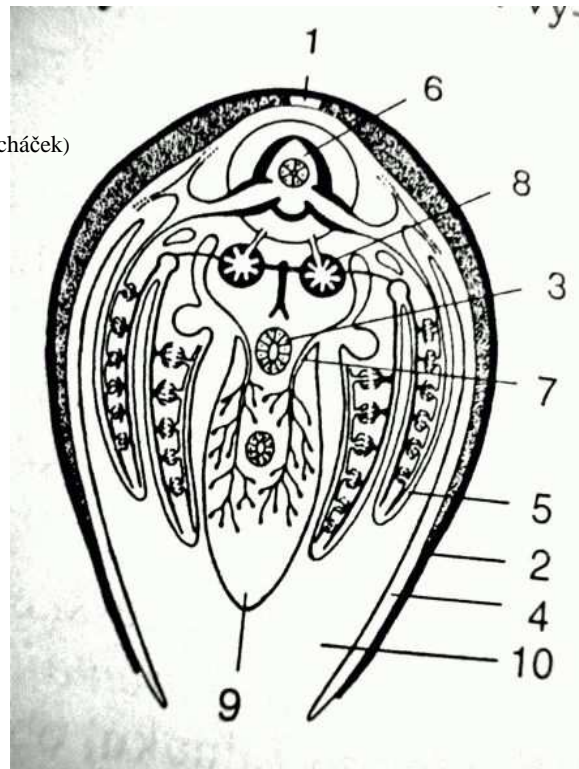
Dýchací ústrojí tvoří párové žábry, omývané proudem okysličené vody. Ty jsou umístěny po obou stranách těla.

Gangliová nervová soustava je výrazně bilaterálně souměrná. Nervové uzliny jsou vzájemně propojeny nervovými vlákny. Škeble, stejně jako většina mlžů, nemá vyvinuté oči. Zato mají smyslové ústrojí čichové - osfradium, párovou statocystu (pro vnímání polohy těla) ve svalnaté noze a velké množství smyslových buněk, rozložených po celém těle.

obr. č. 2: příčný řez škeblí

(zdroj: Biologie pro gymnázia, J.Jelínek, V.Zicháček)

- 1- vaz spojující obě lastury
- 2- lastura
- 3- střevo
- 4- plášť
- 5- žábry
- 6- srdce
- 7- pohlavní ústrojí
- 8- nefridie
- 9- noha
- 10- plášťová dutina



Škeble asijská je gonochorický druh s vývojem nepřímým. Jako všichni naši velcí sladkovodní mlži je odděleného pohlaví. Spermie mlžů jsou nasávány do plášťové dutiny jiného jedince, v níž dochází k oplození vajíček. Larvy (tzv. *glochidium*, viz.obr. č. 9 - přílohy) žijí ektoparaziticky. Mají lepkavé vlákno a malou ozubenou skořápku. Určitou dobu cizopasí na kůži nebo žábrách ryb.

2.2 Kryptosporidie

Jde o prvoky parazitující primárně v buňkách gastrointestinálního traktu, a to mimo cytoplazmu. Hostitelem mohou být savci, ptáci, plazy, některé druhy mohou infikovat také člověka a pro *Cryptosporidium hominis* je člověk primárním hostitelem.

Kryptosporidie jsou řazeny do kmene Apicomplexa a v jeho rámci jsou příbuzné gregarinám.

Jako první popsal rod *Cryptosporidium* E. E. Tyzzer a to v roce 1910, kdy objevil a pojmenoval druh *Cryptosporidium muris* v žaludku laboratorních myší. U člověka byly kryptosporidie nalezeny až v roce 1976 u pacientů s imunopresivní léčbou nebo imunologickými poruchami (Miesel et al. 1976, Nime et al. 1976).

Kryptosporidie by se daly rozdělit do dvou skupin podle místa, kde probíhá vývojový cyklus. Jedny se vyskytují v žaludečním epitelu, druhá skupina pak v epitelu střeva. Již podle tvaru oocysty se dá rozpoznat, ze které části trávicího traktu pocházejí. Menší a kulaté oocysty můžeme nalézt v buňkách střevního epitelu (např. *C. parvum*), větší a oválné cysty jsou pak charakteristické pro epitel žaludku (např. *C. andersoni*).

Kromě šestnácti druhů kryptosporidií uvedených v následující tabulce existuje velké množství genotypů, které by mohly být v budoucnu popsány jako samostatné druhy (Ryvolová 2005).

Tab. č.2: Přehled popsáných druhů kryptosporidií

DRUH KRYPROSPORIDIE ČLOVĚKA	AUTOR, ROK POPISU	TYPOVÝ HOSTITEL	INFEKCE
<i>C. muris</i>	Tyzzer, 1910	<i>Mus musculus</i>	ano
<i>C. parvum</i>	Tyzzer, 1912	<i>Mus musculus</i>	ano
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	<i>Meleagris gallopavo</i>	ano
<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al., 1971	<i>Cavia porcellus</i>	ne
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979	<i>Felis catus</i>	ano
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1980	<i>Elaphe guttata</i>	ne
<i>C. bailey</i>	Current et al., 1986	<i>Gallus gallus</i>	ne
<i>C. saurophilum</i>	Koudela et Modrý, 1998	<i>Eumeces schneideri</i>	ne
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al., 2000	<i>Bos taurus</i>	ano
<i>C. canis</i>	Fayer et al., 2001	<i>Canis familiaris</i>	ano
<i>C. hominis</i>	Morgan- Ryan et al., 2002	<i>Homo sapiens</i>	ano
<i>C. molnari</i>	Alvarez- Pellitero et al., 2002	<i>Sparus aurata</i> , <i>Dicentrarchus labrax</i>	ne
<i>C. galli</i>	Ryan et al., 2003	<i>Gallus gallus</i>	ne
<i>C. suis</i>	Ryan et al., 2004	<i>Sus scrofa</i>	ano
<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez- Pellitero et al., 2004	<i>Scophthalmus maximus</i>	ne
<i>C. bovis</i>	Fayer et al., 2005	<i>Bos taurus</i>	ne

2.2.1. *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912

Cryptosporidium parvum je jednou ze střevních kryptosporidií schopných infikovat trávicí trakt a dýchací ústrojí nejen zvířat, ale i člověka. Způsobuje průjemová onemocnění- kryptosporidiózu, která může v krajním případě končit i smrtí. Infekční formou *C. parvum* jsou vysporulované oocysty.

Ve svém životním cyklu prochází *C. parvum* několika různými stádii a to vždy v jednom hostiteli. Ten pozře či inhaluje silnostěnnou oocystu, z níž se uvolní sporozoiti, kteří napadají a následně ničí epitel trávicího a dýchacího traktu. Sporozoit se změní v trofozoit, jeho jádro se poté dělí a tím probíhá nepohlavní množení za vzniku schizontů. U *C. parvum* jsou schizonti dvojího typu a liší se počtem jader. Z jader vznikají merozoiti.

První typ schizonta má šest až osm merozoitů, ti jej po dozrání opouštějí a infikují další hostitelskou buňku.

Sexuální rozmnožování může proběhnout pouze u merozoitů vzniklých ze schizonta druhého typu. Ti jsou vždy čtyři a jeden takový merozoit dává vznik jednojadernému samčímu mikrogamontu. Z gamontů vznikají gamety. Z oplozené gamety makrogamonta vznikají buď silnostěnné nebo tenkostěnné oocysty. Tenkostěnné oocysty způsobují autoinfekci a silnostěnné odcházejí s trusem ven z těla (Ryvolová 2005).

C. parvum se množí pouze v gastrointestinálním traktu, ale dokáže velmi dlouho přežít ve vodách, půdách apod. Díky svým nepatrným rozměrům (mají velikost okolo 5 μm) a nízkým koncentracím (obvykle desítky až tisíce jedinců na 100 litrů) je při úpravě pitné vody tento organismus velmi těžko odstranitelný. Naopak, značná rezistence klidových stadií umožňuje jejich přežívání a detekci i ve vzorcích, které prošly složitým zpracováním.

Tab.3: Zařazení v systému.

říše	Protozoa (Goldfuss, 1818) R. Owen, 1858 - prvoci
podříše	<i>Alveolata</i> Cavalier-Smith, 1991
kmen	<i>Apicomplexa</i> - výtusovci
rod	<i>Cryptosporidium</i>
druh	<i>Cryptosporidium parvum</i>

2.3. Kryptosporidióza

Kryptosporidióza je poměrně vzácné onemocnění, kdy malé kokcidie infikují a destruují mikroklky enterocytů. Parazit byl původně považován jen za původce průjmu telat, později se potvrdily i infekce člověka.

Běžným klinickým obrazem kryptosporidiózy je těžký průjem vodnatého charakteru, který obsahuje hlen, ale někdy také krev. Imunokompetentní pacienti pociťují při nemoci bolesti břicha, hlavy, trpí nechutenstvím, zvracením a mají zvýšenou teplotu. Zpravidla se uzdraví spontánně během 3–12 dní.

U imunosuprimovaných pacientů průběh závisí především na stavu imunitního systému a celkové kondici, někdy dojde i k extraintestinální manifestaci (diseminace parazita do jiných orgánů mající epiteliální buňky) s postižením plic, jater, slinivky břišní nebo žlučníku.

Pro kryptosporidiózu zatím není známa účinná terapie. Navíc se požití oocyst prakticky nedá předejít. Oocysty parazita jsou značně rezistentní na běžně užívané dezinfekční prostředky. Běžné hygienické zabezpečení vody (chlorace) není při odstraňování uvedených prvoků vůbec účinné. Shrnutím údajů uváděných různými autory porovnává Dolejš (1997) množství jednotlivých desinfekčních činidel a potřebných dob kontaktu nutných pro inaktivaci *C. parvum*. Potřebné dávky resp. doby kontaktu jsou příliš vysoké a pro běžné použití většinou málo reálné.

2.3.1. Epidemie kryptosporidiózy

Hlavní podíl na kontaminaci vodních zdrojů prvokem *Cryptosporidium parvum* mají především hospodářská zvířata a volně žijící zvěř. Z jejich trusu jsou oocysty odplavovány do podzemních vod a dále do vodních toků. Riziko kontaminace vod se zvyšuje také např. využíváním trusu hospodářských zvířat k přihnojování polí.

Četné zprávy o propuknutí epidemie kryptosporidiózy spojené s pitnou vodou v severní Americe, Velké Británii a Japonsku ukazují, že voda je hlavním prostředkem pro přenos kryptosporidiózy (Fayer 2004).

Jako infekční dávka se obvykle uvádí množství od pouhé 1 do 100 oocyst *C. parvum*. Tento prvok může u imunodeficientních osob způsobit život ohrožující

onemocnění, může však infikovat i imunokompetentní jedince. Tato skutečnost byla potvrzena např. při epidemii kryptosporidiózy v Las Vegas v roce 1994, která zasáhla především HIV pozitivní populaci.

V současné době neexistuje žádná účinná léčba kryptosporidiózy. Nutná je však podpůrná terapie, spočívající v rehydrataci organismu.

V České republice byl ve vodách zatím zjištěn hojnější výskyt *C. parvum*. Zajímavé výsledky získané v ČR v Českých Budějovicích publikovali Chmelík a kol. (1998). Pozorováním výskytu kryptosporidióz u dětí ve věku 2 – 36 měsíců se ukázalo, že podíl kryptosporidiózy na průjmových onemocněních (11%) je srovnatelný s podílem salmonely (11%) nebo rotaviru (13%). Srovnání počtu pacientů s kryptosporidiózou u různých věkových skupin vykazuje maximum u dvouletých dětí. Ohroženy jsou především děti ve věku do 5 let. Od šesti let je už četnost výskytu kryptosporidiózy konstantní.

Přítomnost *C. parvum* v pitné vodě představuje významné zdravotní riziko. V průběhu 80. a 90. let byla popsána řada epidemií kryptosporidiózy, především v USA a Velké Británii. Nejznámějším případem dokazujícím nebezpečí těchto prvoků je velká epidemie v Milwaukee (USA, stát Wisconsin), která je největší dosud popsanou epidemií svého druhu. Při této epidemii v roce 1993 prokazatelně onemocnělo asi 400 000 lidí a několik desítek jich zemřelo (Mackenzie et al. 1995).

Z výsledků analýz povrchových vod na několika místech v ČR je zřejmé, že u nás *C. parvum* představuje vážný problém pro mikrobiologickou kvalitu vody. Je třeba dále pokračovat v monitorování těchto prvoků v povrchových zdrojích pitných vod a také sledování jejich průchodu resp. jejich separace při úpravě pitné vody spolu s následnými návrhy optimálních technologických postupů, zajišťujících jejich odstranění.

2.4 Interakce mezi mlži a kryptosporidiemi

Epidemiologicky významným problémem je výskyt kryptosporidií v mořských měkkýších. Odolné oocysty mohou přežívat poměrně dlouhou dobu i ve slané vodě. Fayer et al. provedli v roce 1997 pokus, ve kterém byly ústřice vnořeny do slané vody s oocystami. Po vyšetření mlžů bylo prokázáno filtrování oocyst (viz. obr.č. 3) V dalších letech objevili oocysty i u komerčně chovaných mlžů.

Navzdory všem nálezům kryptosporidií v mlžích doposud nebyly publikovány žádné zprávy o kryptosporidióze zapříčiněné konzumací syrových mlžů (Fayer et Lindsay 2004).

3. Materiál a metodika

3.1 Materiál

Jako materiál byli použity mlži rodu *Sinanodonta* (*S. woodiana*) a oocysty *Cryptosporidium parvum* vyizolované z trusu skotu, které byly škeblím přidány do vody v akváriu.

Mlži byli naloveni v říčce Malá Bečva v oblasti mezi Chropyní a Kroměříží ve hloubce kolem jednoho metru. Odběr proběhl na začátku května roku 2006. Škeble byly uskladněny v akváriích s odstátou pitnou vodou v místnosti o teplotě kolem 10°C. Ještě před začátkem pokusu byli mlži vyšetřeni na přítomnost oocyst kryptosporidií.

3.2 Metody

3.2.1. Předpokus: Sledování filtrace mlžů

Do akvária naplněného odstátou pitnou vodou bylo vloženo šest škeblí (*Sinanodonta woodiana*).

V předpokusu bylo přidáno v přepočtu 1.6 milionu oocyst na jednoho mlže a akvárium bylo přemístěno do místnosti o teplotě kolem 10 °C. Cílem bylo ověřit, zda a v jakém měřítku jsou škeble schopny filtrovat oocysty kryptosporidií.

Žábry jednotlivých škeblí byly vypláchnuty 10% roztokem PBS (fosfátový solný pufr, phosphate-buffered saline- 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ a 0,24 g KH₂PO₄) do kterého se uvolnily oocysty. Tato tekutina byla nalita do čistých zkumavek a zcentrifugována (15 minut, 2 500 otáček/min). Na dně zkumavky se oocysty usadí, veškeré PBS stočíme a znovu naředíme na 20μl. Oocysty byly počítány v Bürkerově komůrce na 25 čtvercích, získaný počet byl vynásoben 1000. Tím bylo docíleno počtu oocyst v 1 ml.

3.2.2. Pokus: Sledování rychlosti filtrace za snížené teploty

V samotném pokusu byly škeble umístěny do chladicího boxu o teplotě 4 °C a do odstáté pitné vody bylo přidáno 5 milionů oocyst na jednoho živočicha. Byla zkoumána rychlost filtrace škeblí v průběhu 12 dnů po přidání oocyst a ovlivnění schopností filtrace při poklesu teploty. Metody tohoto pokusu byly identické s pokusem předchozím.

4. Výsledky

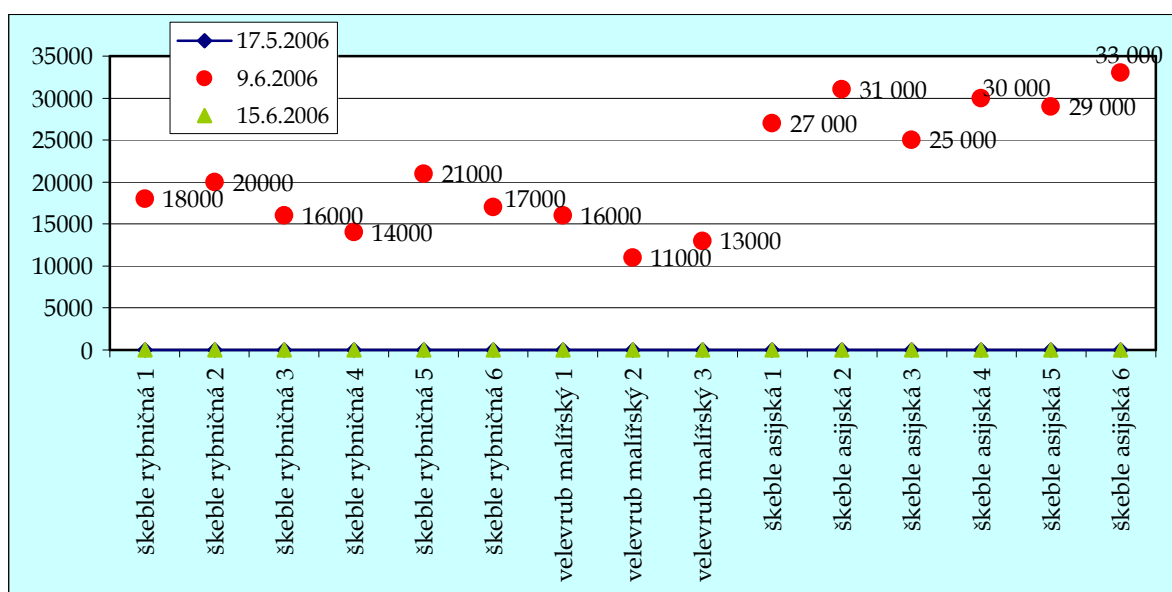
4.1 Předpokus:

sledování filtrace za normální teploty (10°C) v průběhů 1 měsíce

V předpokusu jsem ověřovala schopnost mlžů nafiltrovat oocysty. Měření proběhlo pouze 2x, protože jsem zkoumala tyto schopnosti nejen u škeble asijské (*S. woodiana*), ale i u velevrubu malířského (*U. pictorum*) a škeble rybníčné (*A. cygnea*).

17. května bylo přidáno 1.6 milionu oocyst na jednoho mlže, 9. a 15. června probíhala měření.

Graf č. 1: Výsledky předpokusu



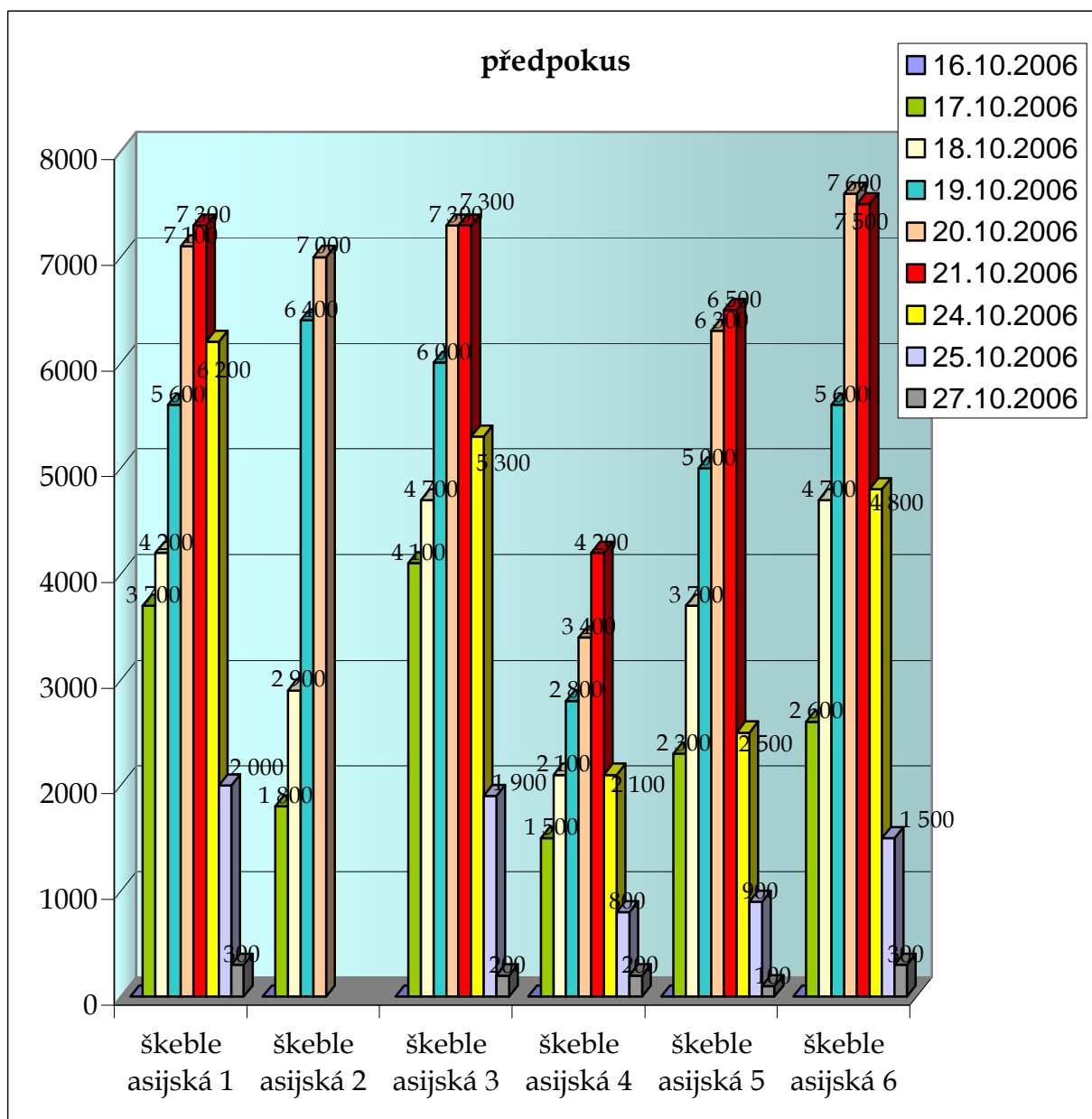
4.2 Pokus:

Sledování rychlosti filtrace za teploty 4 °C během 12 dnů

Při samotném pokusu jsem počítala oocysty ze žaber škeblí za prvních 12 dnů.

16.října 2006 bylo přidáno 30 milionů oocyst kryptosporidií, v přepočtu 5 milionů na 1 škebli. Během následných 12 dnů byl zjišťován počet oocyst na žábrách každého jedince. 21.října uhynula *Sinanodonta* č.2.

Graf č. 2: Výsledky pokusu



Tab. č. 3: Celkový počet oocyst na žábrách škeblí v průběhu dvanácti dní.

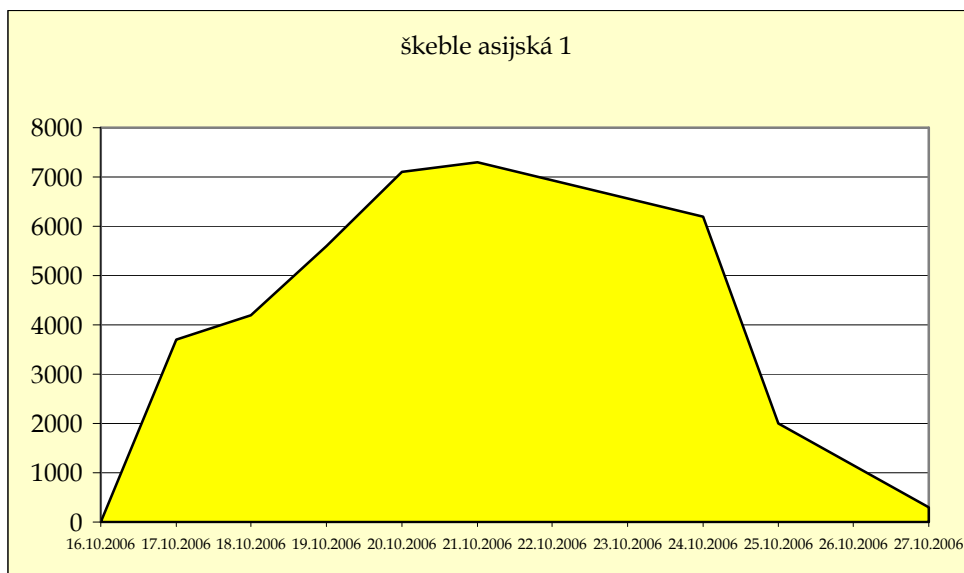
Den odběru	Celkový počet oocyst na žábrách
1.	0
2.	16 000
3.	22 300
4.	31 400
5.	38 700
6.	32 800
9.	20 900
10.	7 100
12.	1 100

Obr. č. 3: Oocysty na žábrách mlže

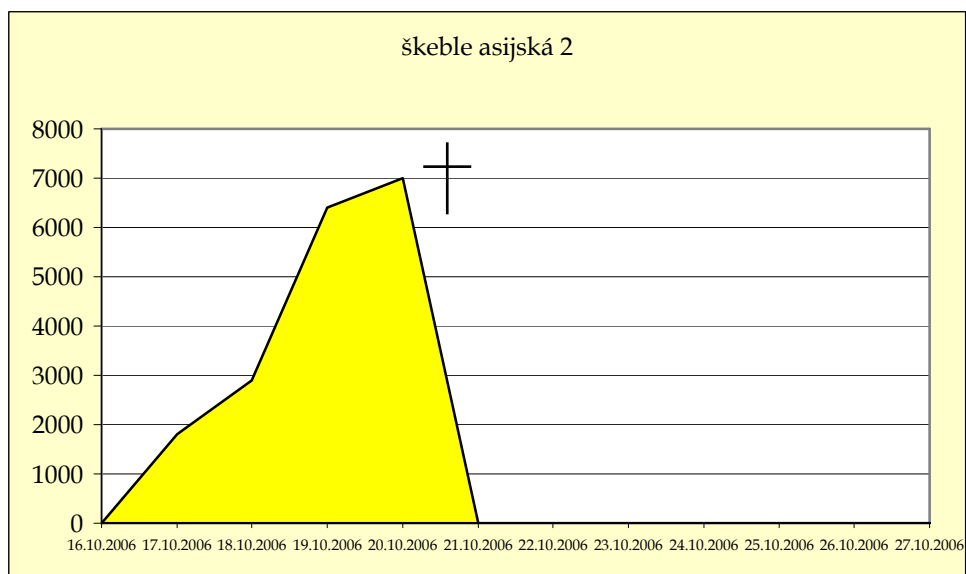
4.2.1 Jednotlivé grafy (hlavní pokus)

- nárůst počtu oocyst na žábkách *Sinanodonty woodiany*

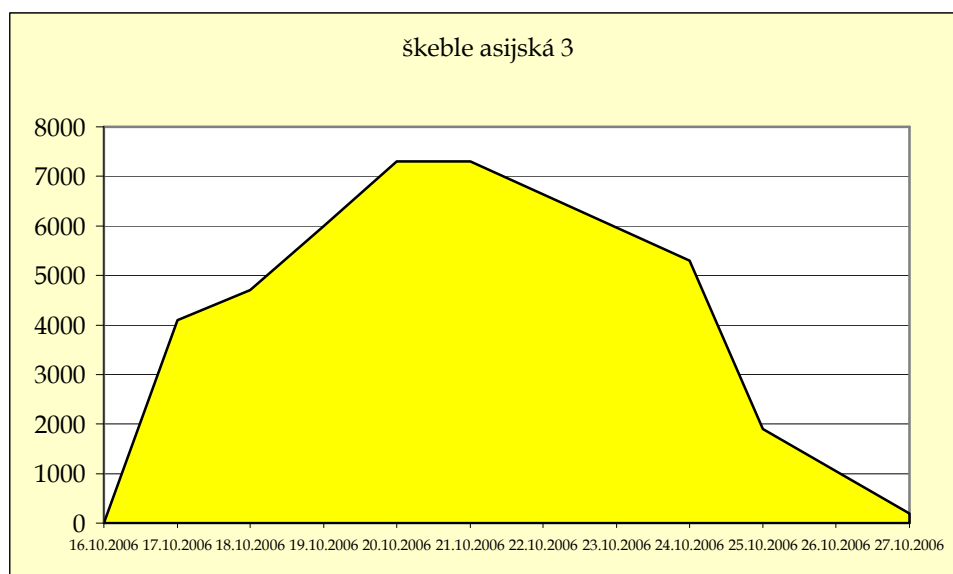
Graf č. 3:



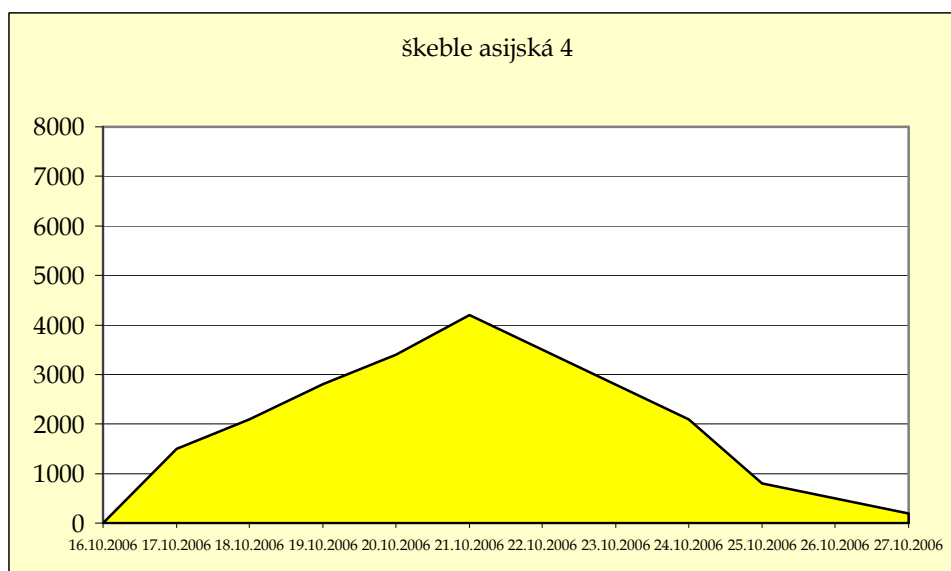
Graf č. 4:



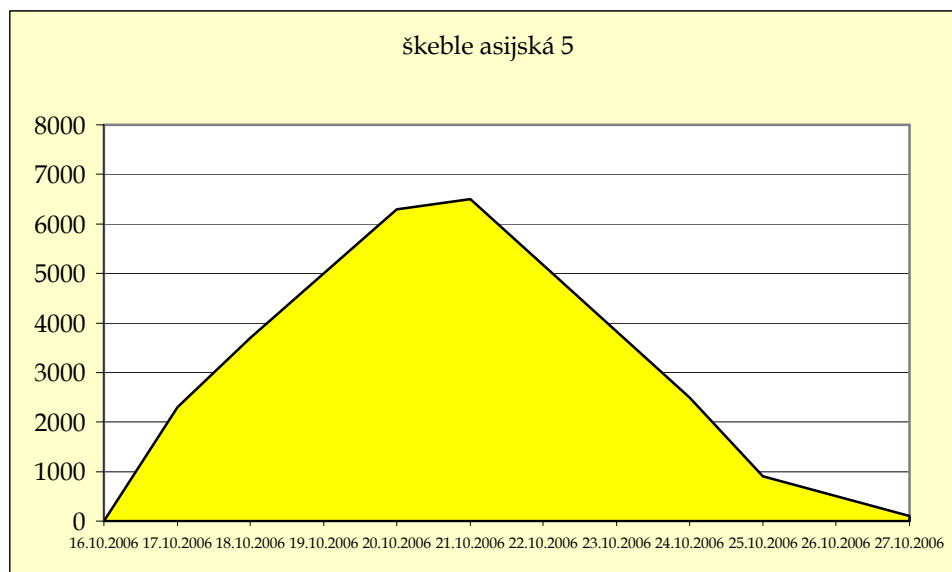
Graf č. 5:



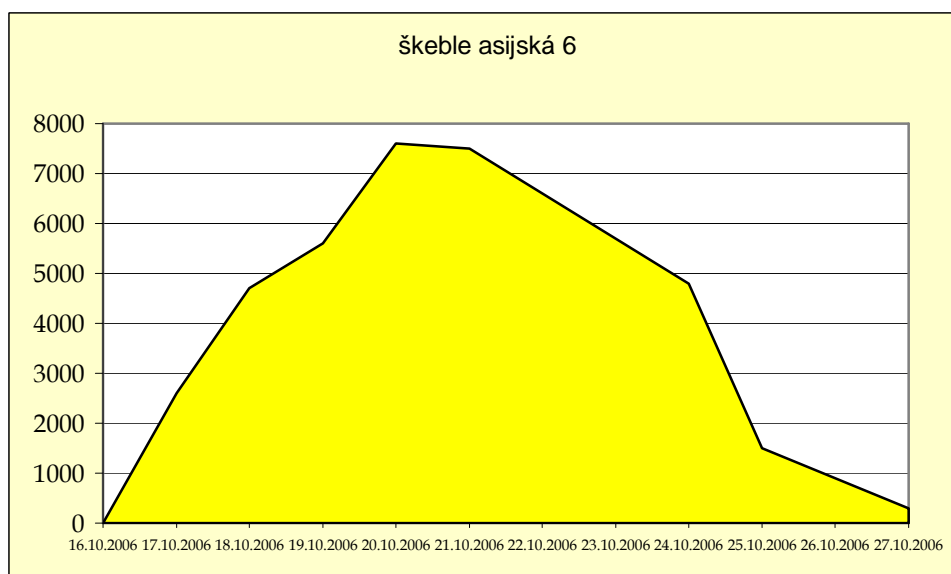
Graf č. 6:



Graf č. 7:



Graf č. 8:



5. Diskuse

Díky neustále rostoucím nárokům na území a zvyšujícímu se znečištění přírody hrozí mnohým živočichům na našem území vyhynutí. Tato hrozba se netýká pouze suchozemských zvířat, ohroženy jsou i mnohé vodní druhy, včetně mlžů. Škeble rybničná (*Anodonta cygnea*) patří mezi silně ohrožené druhy, perlorodka říční (*Margaritana margaritifera*) a velevrub malířský (*Unio pictorum*) jsou ze zákona zařazeni mezi kriticky ohrožené druhy. Další dva zástupci velevrubů (*U. crassus* a *U. tumidus*) sice nejsou zákonem chráněni, ale jsou ještě vzácnější než dva výše zmíněné kriticky ohrožené druhy. Bohužel nejsou ohrožovány pouze ubýváním jejich přirozeného prostředí nebo znečištěním.

V posledních letech se objevila hrozba ve formě introdukovaného druhu škeble (*Sinanodonta woodiana*), který jim konkuruje. Škeble asijská se na naše území dostala spolu s rybami z Asie, na kterých její larvy (*glochidie*) cizopasí.

Patogenních prvoci v pitných vodách bývají poměrně běžným jevem a představují značný problém. Není ale vůbec snadné zjistit ve vodě jejich přítomnost. Pro spolehlivou diagnostiku a zvláště pro kvantifikaci je potřeba filtrovat velké objemy vody (standardně 1000 litrů) a ve velkém objemu filtrátu je pak pracně koncentrovat (Ditrich et al. 2004).

Jak se vyjadřuje ve své bakalářské práci Kamila Ryvolová, bylo by mnohem snazší i časově méně náročné, kdyby byla tato diagnostika prováděna na mlžích z dané nádrže. Je možné, že by tato metoda byla ještě spolehlivější, neboť se často stává, že standardní testovací metodou vyjdou vzorky negativně, ale v tkáni mlžů se organismy nacházejí. Důvodem je vysoká schopnost mlže filtrovat, a to nejen již zmíněné kryptosporidie, ale i patogenní bakterie a viry. Tento poznatek by mohl být využit v uplatnění mlžů jakožto biologického indikátoru chemického, virového, bakteriálního nebo parazitárního zamoření vody (Lowery et al. 2001; Fayer et al. 1998, 1999, 2003; Gomez-Couso et al. 2003).

Pokud by se mlži měli v naší zemi používat jako bioindikátory, vyvstává další otázka, kterého zástupce si zvolit. V tu chvíli se nám nabízí např. škeble asijská (*Sinanodonta woodiana*), která na našem území vytlačuje jiné kriticky ohrožené druhy.

Pokus s těmito mlži proběhl dvakrát, poprvé na konci května, podruhé v říjnu.

Předpokus byl zaměřen především na schopnost mlžů zachycovat ve svém těle oocysty a tím snižovat jejich počet ve vodě v průběhu delší doby. Do vody s oocystami úmyslně nebyly přidány žádné další organismy, aby jim mlži případně nedaly přednost. V předpokusu byly využity i jiné druhy mlžů (*A. cygnea*, *U. pictorum*). Zajímavé je, že škeble asijské byly, co se týče nafiltrování oocyst, nejvýkonnější.

Ve vlastním pokusu jsem již pouze mapovala rychlost filtrování škeble asijské za snížené teploty během prvních dvanácti dnů. Na grafu č. 2. je patrné, že mlži nafiltrují oocysty v největší míře během prvního dne (až na *Sinanodontu* č.2, která navíc o několik dnů později uhynula), později už jsou rozdíly v počtu nafiltrovaných prvků závislé na aktivitě filtrace jednotlivých živočichů.

Za snížené teploty jsou škeble kupodivu dost aktivní, ale v porovnání s předkusem je počet nafiltrovaných oocyst stále relativně nízký.

Bylo prokázáno nafiltrování oocyst a následně jejich relativně rychlé ubývání na žábrách, jak je vidět na grafu č. 2. Tím tento pokus svými výsledky ukazuje, že mlži oocysty nejen filtrují, ale nejspíše je i stráví. Jak jinak by docházelo k ubývání oocyst na žábrách mlžů? Jedinou možností je úbytek oocyst ve vodě, který mohl být způsoben buď odstraňováním oocyst z vody díky mlžům, nebo případným samovolným rozpadem oocyst. Podmínky, které byly při pokusu zajištěny, nemohly nijak výrazně ovlivnit rozpad oocyst ve vodě a navíc pokus trval pouze měsíc. Za tak krátkou dobu by k rozpadu oocyst dojít nemělo.

Myslím, že tyto pokusy dostatečně prokázaly schopnost mlžů filtrovat oocysty, a díky houževnatosti *S. woodiana* (za celou dobu pokusu došlo k jedinému úhynu), nadprůměrné výkonnosti filtrace (viz. graf č.1) a tomu, že je na našem území nepůvodní druh, by se dalo uvažovat nejen o jejím uplatnění coby biologického indikátoru kvality pitné vody, ale také k pozdějším laboratorním výzkumům.

Předtím je ale třeba důkladně zvážit riziko jejího přemnožení v nádržích, neboť by mohla vytlačovat původní kriticky ohrožené druhy.

6. Závěr

Škeble asijská (*Sinanodonta woodiana*) je vhodný modelový druh pro popis interakcí s patogenními organismy ve vodě.

Mlži jsou schopni nafiltrovat velké množství kryptosporidií, s největší pravděpodobností je i konzumují. (Netroufám si však tvrdit, jestli by kryptosporidiím dali přednost před běžnou potravou.)

Tento proces je u škeble asijské rychlejší, než například u *Dreissena polymorpha* (-Ryvolová 2005) nebo u škeble rybničné (*Anodonta cygnea*) a vevrubu malířského (*Unio pictorum*) a je ovlivňován teplotou (viz. str. 24).

Mlži proto mohou být užíváni jako indikátory pro stanovení kryptosporidií, případně jiných parazitických organismů, ve vodě.

K těmto účelům doporučuji použít kromě dříve studovaných sláviček (*Dreissena polymorpha*) především mnohem větší asijskou škebli *Sinanodonta woodiana*, která je na našem území také nepůvodní, a proto by bylo možné její využití i pro laboratorní účely.

7. Literatura

- ALVAREZ-PELLITERO, P., QUIROGA, M.I., SITJA-BOBADILLA, A., REDONDO, M.J., PALEMZUELA, O., PADROS, F., VASQUEZ, S., NIETO, J.M., 2004: *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histological study. Diseases of Aquatic Organisms 62: 133-145
- ALVAREZ-PELLITERO, P., SITJA-BOBADILLA, A., 2002: Describe *Cryptosporidium molnari* sp. n. from marine fish. Int. J. Parasitol. 32: 1007-1027
- BERAN, L., 2002: Vodní měkkýši České republiky, Sborník Přírodovědeckého klubu v Uherském Hradišti, Supplementum č. 10/2002
- CURRENT, W.L., UPTON, S.J., HAYNES, T.B., 1986: The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chickens. J. Protozool. 33: 289
- DITRICH, O., 1998: Ohrožují nás giardie, kryptosporidie a cyklospory v pitných vodách? Vodní hospodářství č. 4, s. 78 – 81.
- DITRICH, O., RYVOLOVÁ, K., KVĚTOŇOVÁ, D., KVÁČ, M., 2004: Kryptosporidie ve vodách a význam mlžů jako indikátoru jejich výskytu. Sborník abstraktů, České a Slovenské parazitologické dny, 17.-21. května 2004, Ostravice. Str.9
- DOLEJŠ, P., 1997: Současné poznatky o nebezpečných prvocích *Cryptosporidium* a *Giardia* významné pro vodárenskou praxi. Sborník přednášek VODA 1997, str. 100 - 105, VaK Zlín.
- FAYER, R., 2004: *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126: 37-56

- 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. Appl. and Env. Microbiol. 64: 1070-1074
- FREY, M.M., HANCOCK, C., LOGSDON, G.S., 1998: Critical Evaluation of *Cryptosporidium* Research and Research Needs. AWWARF, Denver.
- FAYER, R., LEWIS, E.J., TROUT, J.M., GRACZYK, T.K., JENKINS, M.C., HIGGINS, J., XIAO, L., LAL, A.A., 1999: *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. Emerg. Infect. Dis. 5: 706-710
- FAYER, R., LINDSAY, D., 2004: Zoonotic protozoa in the marine environment: a threat to aquatic mammals and public health. Vet. Parasitol. 125: 131-135
- FAYER, R., SANTIN, M., XIAO, L.H., 2005: *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). J. Parasitol. 91: 624-629
- FAYER, R., TROUT, J.M., LEWIS, E.J., SANTIN, M., ZHOU, L., LAL, A.A., XIAO, L., 2003: Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. Parasitol. Res. 89: 141-145
- FAYER, R., TROUT, J.M., XIAO, L.H., MORGAN, U.M., LAL, A.A., DUBEY, J.P., 2001: *Cryptosporidium canis* n. sp. From domestic dogs. J. Parasitol. 87: 1415-1422
- GOMEZ-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 standards. Inter. J. of Food Microbiol. 87: 97-105
- CHMELÍK, V., DITRICH, O., TRNOVCOVÁ, R., GUTVIRTH, J., 1998: Clinical features of diarrhoea caused by *Cryptosporidium parvum*. Folia parasitologica 45: s. 170 – 172.
- ISEKI, M., 1979: *Cryptosporidium felis* n. sp. (Protozoa Eimeriorina) from the domestic cat. Jpn. J. Parasitol. 28: 285
- JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V., 2002: Biologie pro gymnázia, ISBN 80-7182-089-X: 107-108

- KOUDELA, B., MODRÝ, D., 1998: New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizard. *Fol. Parasitol.* 45: 96-100
- LEVINE, N.D., 1980: Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66: 830
- LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., OWENS, D.S., MORGAN, U.M., MEAD, J.R., BLAGBURN, B.L., 2000: *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos Taurus*. *J. Eukaryot. Mikrobiol.* 47: 91-95
- LECHEVALLIER, M.W., NORTON, W.D., LEE, R.G., ROSE, J.B., 1991: *Giardia* and *Cryptosporidium* in Water Supplies. AWWARF, Denver.
- LOWERY, C.J., NUGENT, P., MOORE, J.E., MILLAR, B.C., XIRU, X., DOOLEY, 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. *Epidemiology and Infection* 127: 545-553
- 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
- MIESEL, J.L., PERERA, D.R., MELIGRO, C., RUBIN, C.E., 1976: Overwhelming watery diarrhoea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70: 1156
- MORGAN, U.M., LINDSAY, D.S., UPTON, S.T., OWENS, D.S., MEAD, J.R., BLAGBURN, B.L., 2002: Describe *Cryptosporidium hominis* n. sp. from humans. This has been termed “*C. parvum* genotype I” previously. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 433-440
- NIME, F.A., BUREJ, J.D., PAGAE, D.L., HOLSCHER, M.A., YARDEY, J.H., 1976: Acute enterocolitidis in human begin infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70: 592

- RYAN, U.M., MONIS, P., ENEMARK, H.L., SULAIMAN, I.M., SAMARASINGHE, B., READ, C., BUDDLE, R., ROBERTSON, I., ZHOU, L., THOMPSON, R.C.A., XIAO, L., 2004: *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Suis scrofa*). J. Parasitol. 90: 769-773
- RYAN, U.M., XIAO, L., READ, C., SULAIMAN, I.M., MONIS, P., LAL, A.A., FAYER, R., PAVLASEK, I.A., 2003: A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. J. Parasitol. 89: 809-813
- RYVOLOVÁ, K., 2005: Interakce mezi mlži a kryptosporidii. 44 pp. Bakalářská práce. Biologická fakulta Jihočeské university v Českých Budějovicích.
- SLAVIN, D., 1955: *Cryptosporidium meleagris* (sp.nov.). J. Pathol. 65: 262
- SOLO-GABRIELE, H., NEUMEISTER, S., 1996: US outbreaks of cryptosporidiosis. J. AWWA, September, s. 76-86.
- TYZZER, E.E., 1910: An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. J. Med. Res. 23: 487
- TYZZER, E.E., 1912: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkd. 26: 394
- VETTERLING, J.M., JERVIS, H.R., MERRILL, T.G., SPRINZ, H., 1971: *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig. J. Protozool. 18: 248

Použité internetové stránky:

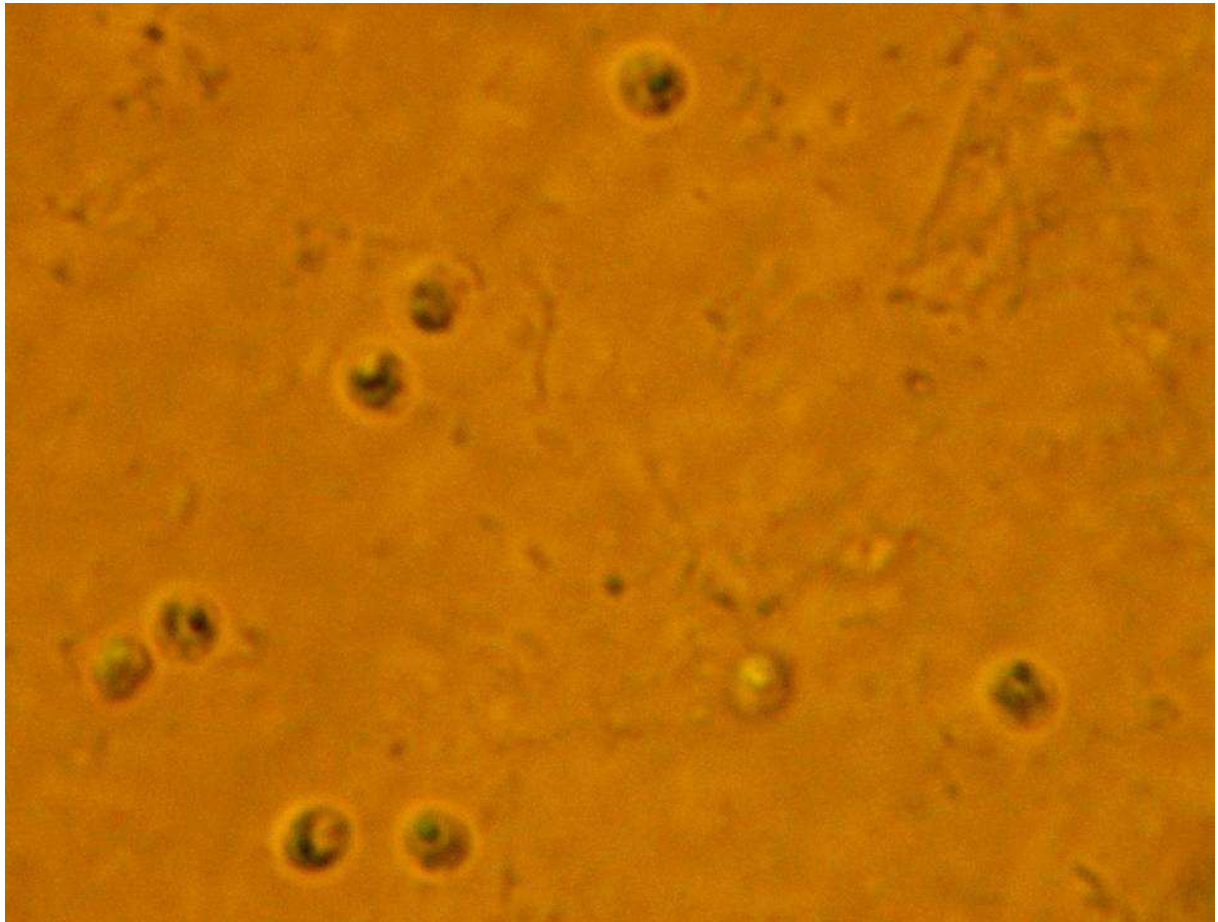
- <http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id3003>
<http://www.biolib.cz/cz/taxon/id3003>
<http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id222927>
<http://www.biolib.cz/cz/taxon/id2441>
<http://www.volny.cz/wet-team/projekty/crypto.htm>
www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm

8. Přílohy

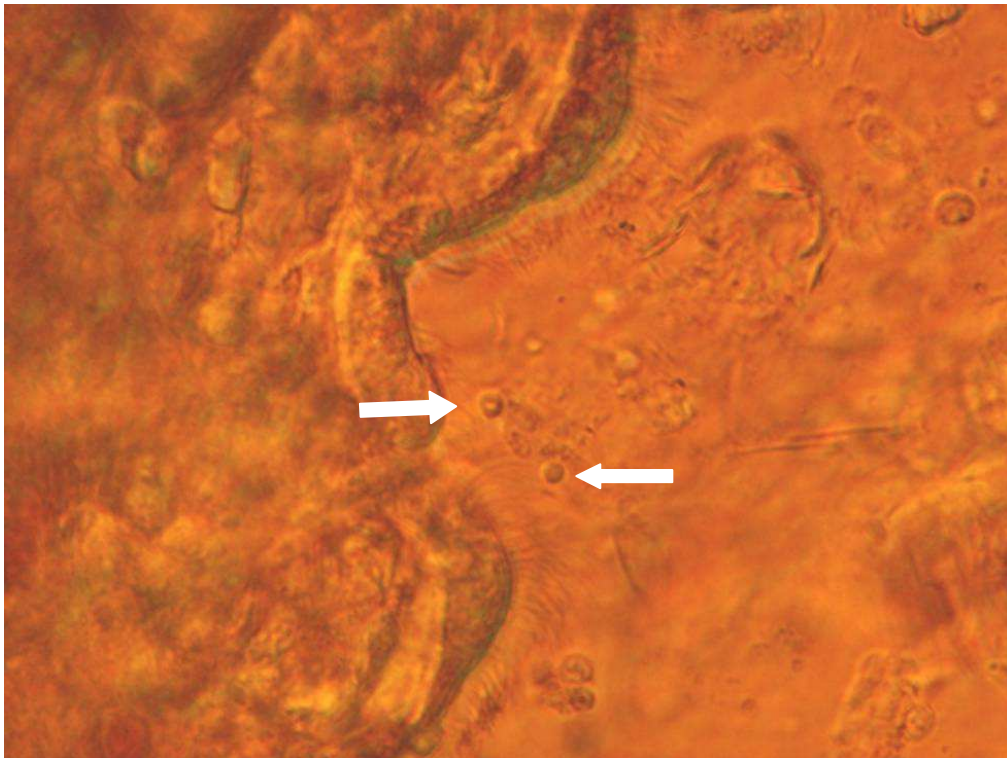
8.1 Obrázky *Cryptosporidium parvum*

Obr. č. 3: Oocysty na žábrách mlže str.19

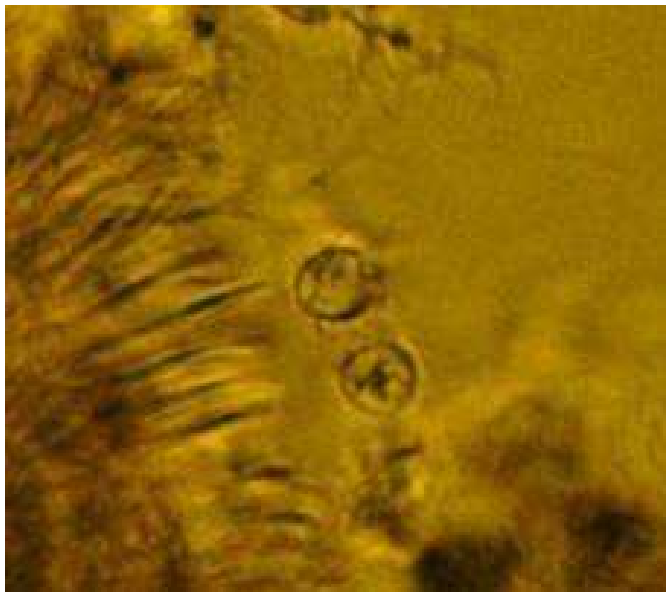
Obr. č. 4: Oocysty kryptosporidií vyplavené ze žaber



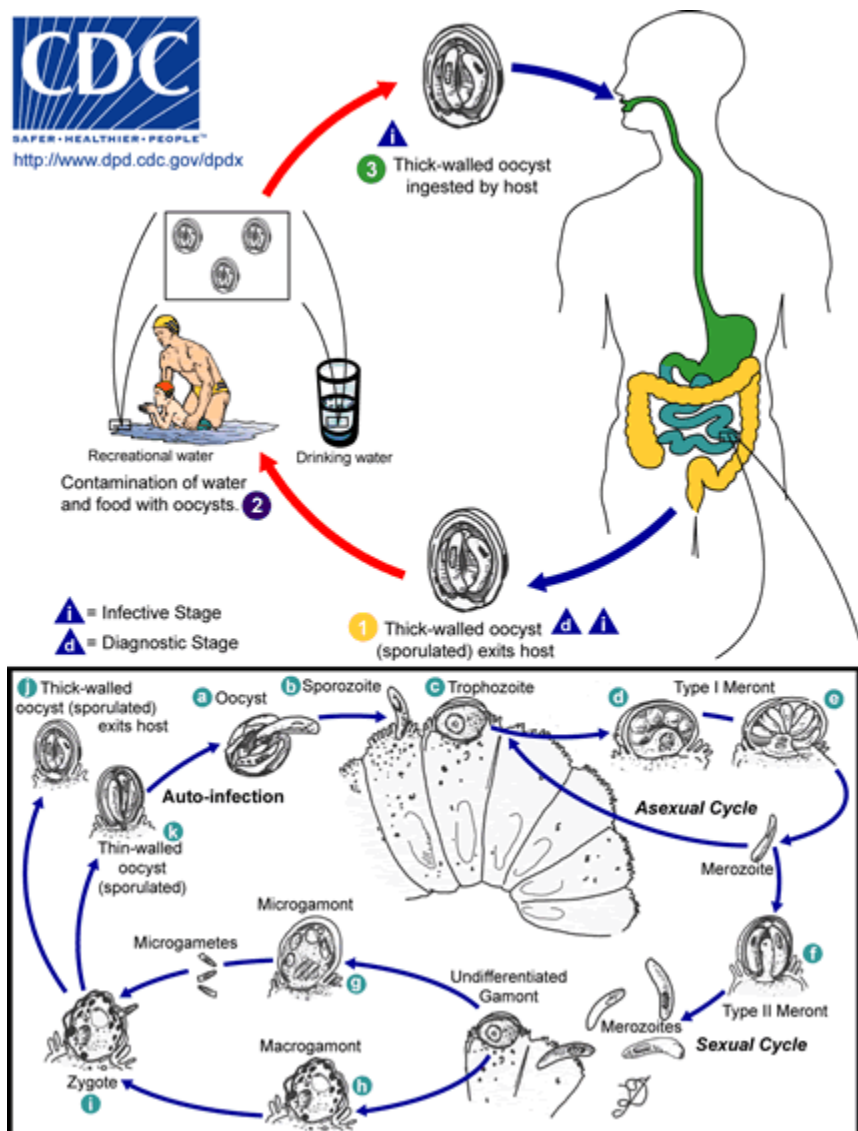
Obr. č. 5: Oocysty ve střevním epitelu mlže



Obr. č. 6: Detail- střevo mlže s oocystami



Obr. č. 7: Vývojový cyklus kryptosporidie

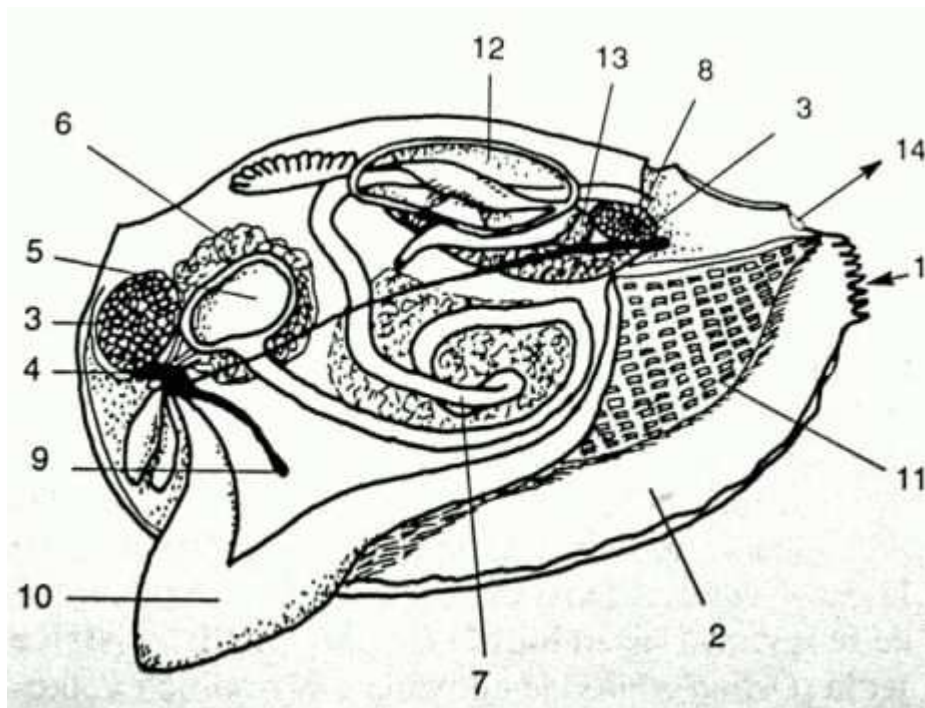


8.2 Obrázky škeble asijské (*Sinanodonta woodiana*)

Obr. č. 1: Škeble zahrabaná na dně str. 9

Obr. č. 2: Příčný řez škeblí str. 10

Obr. č. 8: Podélný řez škeblí (zdroj: Biologie pro gymnázia, J.Jelínek, V.Zicháček)

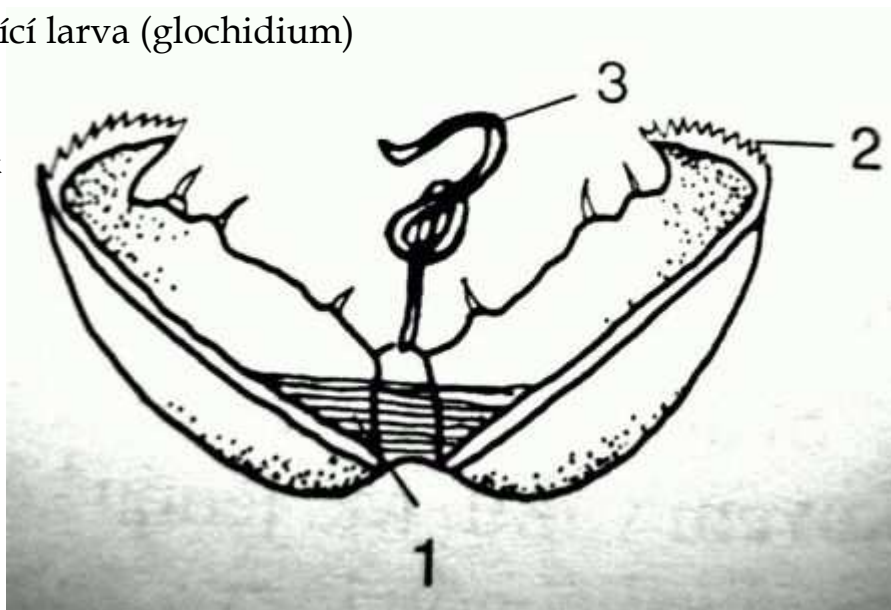


- 1- vstupní otvor do plášťové dutiny s čich. ústrojím (osfradium),
- 2- plášťová dutina,
- 3- svalové svěrače,
- 4- ústní otvor,
- 5- žaludek,
- 6- hepatopankreas,
- 7- střevo,
- 8- řitní otvor,
- 9- nervová soustava,
- 10- noha,
- 11- žaberní lupen,
- 12- srdce,
- 13- ledviny,
- 14- vyvrhovací otvor

Obr. č. 9: Parazitující larva (glochidium)

(zdroj: Biologie pro gymnázia, J.Jelínek, V.Zicháček)

- 1- svěrací svaly lasturek
- 2- přichytné trny
- 3- byssově vlákno



fotografie *Sinanodonta woodiana*

(zdroj: Jiří Novák)

Obr. č. 10:



Obr. č. 11:



Obr. č. 12:

