

ROLE VODNÍCH BEZOBRATLÝCH PŘI ODSTRAŇOVÁNÍ OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ Z VODY

doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.^{1, 2)}, doc. Ing. Martin Kváč, PhD.^{1, 2)},
RNDr. Dana Květoňová¹⁾, RNDr. Bohumil Sak, PhD.¹⁾, Bc. Petra Brůčková²⁾,
Bc. Jitka Kociánová²⁾, Bc. Kamila Ryvolová²⁾, Bc. Lenka Rousková²⁾

¹⁾ Biologické centrum AV ČR, v.v.i. - Parazitologický ústav
Branišovská 31, 37005 České Budějovice

²⁾ Jihočeská universita v Českých Budějovicích
Branišovská 31, 37005 České Budějovice
e-mail: oleg@paru.cas.cz

Klidová stádia jednobuněčných parazitů se v některých případech dostávají do povrchových vod v obrovském množství a díky své vysoké odolnosti proti působení vnějších vlivů v ní dlouhodobě přežívají. Příkladem mohou být oocysty kryptosporidií kontaminující vodu při znečištění lidskými fekáliemi, zejména však při znečištění trusem hospodářských zvířat. V povrchových vodách se oocysty dostávají do kontaktu s planktonními i bentickými bezobratlými živočichy a pro mnohé z nich mohou být součástí potravy.

NÁLEVNÍCI

Britští autoři studovali predanční aktivitu nálevníků, která by mohla být vhodným mechanismem pro odstraňování oocyst kryptosporidií z volného prostředí. Při experimentu v laboratorních podmínkách, vystavili *Euplotes patella*, *Stylonychia mytilus* a *Paramecium caudatum* a dávkám obsahujícím 10- 10⁶ kryptosporidií/ ml po dobu 5 až 60 minut. Predanční aktivita pak byla zjištěna výpočtem fluorescenčně označených oocyst, za použití epifluorescenční mikroskopie. Zjistili, že predanční aktivita u druhu *P. caudatum* je 170 oocyst/ ml) u *S. mytilus* 60 oocyst/ ml a u *E. patella* 4 - 10 oocyst/ ml [1].

VÍŘNÍCI (Rotifera)

Američtí parazitologové prováděli pokus se šesti rody vířníků: *Philodina*, *Monostyla*, *Epiphonus*, *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. quadridentatus* pohltily shodně stejně velké množství oocyst. Oocysty pohlčené druhem *Philodina* sp. byly pozorovány v dlouhé stočené trubici, zřejmě ve střevě, posteriorně od žvýkacího mastaxu. U *E. triquetra* a *B. quadridentatus* 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 *Epiphonus brachionus*. Poměrně velké množství oocyst, vtažených pomocí brv do corony, bylo zjevně odmítnuto. Většina oocyst byla ihned po pozření vyloučena. Doba trvání od pohlčení oocyst k jejich vyloučení trvala u těchto druhů přibližně 15 minut [2].

V našich experimentech s vířníky jsme se zaměřili na problém, zda jsou oocysty prošlé trávicím traktem vířníků schopny infekce nebo nikoli. Jako modelový organismus jsme zvolili vířníky druhu *Brachionus calyciflorus*. Prokázali jsme, že vířníci jsou nejen schopní filtrátoři, ale i likvidátoři oocyst kryptosporidií. 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 [3].

PERLOOČKY (Cladocera)

V roce 2007 vyšla velmi zdařilá práce [4] prokazující, že perloočka *Daphnia pulicaria* redukuje populace cyst *Giardia intestinalis* a oocyst *Cryptosporidium parvum* v povrchových vodách. Potenciál *D. pulicaria*, 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. Efektivita požívání cysty a oocysty byla měřena hodnotami odstraněných cyst a oocyst, jejich životaschopností, schopností excitace a v případě kryptosporidií též infektivitou na buněčné kultuře. Dvě perloočky v nádobě výrazně zmenšovaly excystaci (5%) a infektivitu (87%) oocyst *C. parvum*. Čtyři perloočky v nádobě výrazně snižovaly životaschopnost cyst *G. intestinalis* (52%). Žádné mechanické poškození oocyst *C. parvum* nebylo pozorováno, pravděpodobně díky jejich malé velikosti. Stěna oocyst nebyla poškozena nebo byla porušena jen slabě, naproti tomu stěna cyst *G. intestinalis* byla porušena výrazně, pravděpodobně díky jejich velikosti. Data dokazují, že zooplanktonní požírači mají schopnost podstatně snižovat množství infekčních *C. parvum* a *G. intestinalis* ve vodních ekosystémech [4].

Jako modelový organismus jsme použili perloočky druhu *D. pulicaria* ke zjištění jejich role pro odstraňování oocyst kryptosporidií z vodního sloupce. Čtyřiceti vyhladovělým perloočkám jsme nabídli kryptosporidie, které perloočky aktivně pohlcovaly. Oocystami kryptosporidií, které prošly zaživacím traktem perlooček, jsme se pokusili perorálně infikovat sající BALB/c myši. Z výsledků vyplynulo, že perloočky jsou schopny velmi rychlého a efektivního pohlcování (dospělec perloočky byl schopen za 10 minut požít $1,5 \cdot 10^4$ oocyst *C. parvum*, za hodinu to bylo $2,4 \cdot 10^4$ oocyst). Oocysty kryptosporidií byly pro perloočky velmi atraktivní, protože je selektivně ve vodním sloupci vyhledávaly a tím snižovaly jejich počet, nehledě na to, zda oocysty skutečně jako potrava slouží. [5].

ŽÁBRONOŽKY (Anostraca)

Španělští autoři se snažili prokázat schopnost pohlcování a rozšiřování oocyst kryptosporidií a cyst giardií žábřonožkou *Artemia franciscana*, za použití DIC (diferenciální interferenční kontrast) 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 pohlcojí a také vylučují oocysty kryptosporidií a cysty giardií. Stanovení množství parazitů uvnitř těla metanauplií bylo velmi obtížné, neboť se zde paraziti nacházeli ve velkých shlucích a trávicí trakt byl velmi pohyblivý [6]. V další práci se žábřonožkou *A. franciscana* byla testována životaschopnost oocyst *C. parvum* požitých metanaupliím za použití dvou fluorescenčních barviv (DAPI a PI). Výsledky potvrdily, že *A. franciscana* pohlcojí a také exkretují oocysty kryptosporidií. V zaživacím traktu metanauplií byly nalezeny neporušené a životaschopné oocysty *C. parvum*. Toto zjištění vedlo k úsudku, že žábřonožky hrají roli v přenosu oocyst. Mohou tak infekci (např. *Cryptosporidium molnari*) přenést na jejich potenciální predátory a významně tak přispívat ke vzniku epidemií komerčních či zájmových chovech ryb [7].

MLŽI (Bivalvia)

Už koncem minulého století zjistil Graczyk se spolupracovníky na žábrech a v hemocytech ústřic *Crassostrea virginica* oocysty kryptosporidií, zatímco giardie v nich nalezeny nebyly [8]. Kryptosporidie byly zjištěny i u dalších mlžů v brakických vodách [9, 10, 11]. Infekčními pokusy na sajících myškách bylo prokázáno, že oocysty z žaber ústřic si zachovávají svoji infektivitu [12]. Dynamika filtrování oocyst kryptosporidií a cyst giardií byla sledována na druhích *Dreissena polymorpha* a *Corbicula fluminea*. Bezprostředně 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, přičemž slávička *D. polymorpha* se projevila jako účinnější filtrátor než korbikula *C. fluminea* [13]. Na základě těchto i následných experimentů pak byly slávičky *D. polymorpha* navrženy jako vhodné indikátory kontaminace povrchových vod kryptosporidien [14].

Také experimentálně bylo potvrzeno, že mlži filtrují účinně kryptosporidie a ty na jejich žábřích dlouhodobě přežívají [15]. Některé druhy mlžů, zvláště ústřice, často požívány v syrovém stavu, což z nich činí potenciální přenašeče nákazy. Kromě oocyst kryptosporidií byly na žábrech ústřic zjištěny i oocysty *Toxoplasma gondii* a cysty *G. intestinalis* [16]. V experimentech na ústřicích (*Ostrea edulis*) a tapeskách (*Tapes decussatus*) byl pozorován prudký pokles viability zachycených kryptosporidií, což autoři vysvětlují působením enzymů z hepatopankreatu mlžů a činností hepatocytů, které kryptosporidie fagocytují [17]. To vyvolalo úvahy možném odstraňování oocyst kryptosporidií pomocí mlžů. Graczyk se spolupracovníky kvantifikovali oocysty filtrované ústřicemi a zjistili, že po čase životaschopnost poklesla a počet přeživších oocyst nepostačí pravděpodobně k infekci zdravého člověka [18]. Naopak, v podrobné histologické studii s tapeskami *Tapes decussatus* byly zjištěny životaschopné kryptosporidie ve střevě, v žaberním slizu, a mezi žaberními filamenti, což vedlo k závěru, že některé oocysty prošly zaživačím traktem živé a byly vyvrženy a opakovaně filtrovány [19].

V našich experimentech jsme jako modelové organismy zvolili slávičku mnohotvarou (*D. polymorpha*) a škebli čínskou (*Sinanodonta woodiana*). V obou případech jde o introdukované mlže, kteří se v přírodě agresivně šíří a nejsou tedy na rozdíl od většiny ostatních velkých mlžů chráněni. Navíc, slávička se vyskytuje ve velkém množství ve vodních nádržích, které slouží jako zdroje pro úpravu pitné vody (např. Želivka). Výsledky prokázaly, že oba druhy mlžů účinně ze systému odstraňují oocysty kryptosporidií, ale jde o dlouhodobý proces. Ještě 15. den po přidání oocyst byly ze žaber a te střeva izolovány kryptosporidie schopné infikovat sající myšky a k úplnému odstranění ze systému došlo až po 22 dnech. Rychlost odstraňování klesaly s klesající teplotou [20].

Mlži tedy mohou být díky svým filtračním schopnostem využíváni jako indikátory kontaminace vody kryptosporidien, ale též je sice pomalu, ale účinně z vody odstraňují. Jako zdroj lidských infekcí se v našich podmínkách neuplatňují, protože u nás nejsou obvykle požívány, zvláště ne syroví. Pokud jde o přítomnost sláviček ve vodárenských nádržích, je třeba kromě negativních vlivů ocenit i jejich roli při odstraňování patogenů.

Literatura

1. 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.

2. Fayer R., Trout J. M., Walsh E., Cole R., 2000: Rotifer ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *EUKARYOT. MICROBIOL* 47: 161- 163.
3. Brůčková P., 2007: Role vířníků při filtraci oocyst kryptosporidií ve vodním sloupci. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 33 s.
4. 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 *Giardia lamblia*. *APPL. ENV. MICROBIOL.* 76: 7277- 7282.
5. Rousková L., 2008: Role perlooček jako filtrátorů oocyst kryptosporidií ve vodním sloupci. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 31 s.
6. 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
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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. *LETT. APPL. MICROBIOL.*, 25: 380- 384.
11. 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. ENVIRON. MICROBIOL.:* 4367- 4370.
12. 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.
13. 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 calms (*Corbicula fluminea*). *PARASITOL. RES.* 89: 107- 112.
14. 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- 39.1
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Graczyk T. K., Lewis E. J., Glass G., Dasilva A. J., Tamang L., Girouard A. S., Curriero F. C., 2007: Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* loaded in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *PARASITOL. RES.* 100: 247- 253.
19. Gómez- Couso H., Freire-Santos F., Hernandez-Cordova G. A., Ares-Mazás M. E., 2005: A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). *INTER. J. FOOD MICROBIOL.* 102: 57- 62.
20. Ryvolová K., 2005: Interakce mezi mlži a kryptosporidiemi. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 43 s.