

**BAKALÁŘSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE
BIOLOGICKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**



Sledování dynamiky imunitní odpovědi vůči infekci *Eimeria intestinalis* a *Eimeria flavescens* u králíků metodou blastické transformace

Vypracoval: Tomáš Vodička
Vedoucí práce: RNDr. Michal Pakandl, CSc.

České Budějovice, 2007

Vodička, T., 2007: Sledování dynamiky imunitní odpovědi vůči infekci *Eimeria intestinalis* a *Eimeria flavescens* u králíků metodou blastické transformace. [Following of immune response dynamics to *Eimeria intestinalis* and *Eimeria flavescens* infection in rabbits by the blastic transformation method. Bc. Thesis, in Czech] – 25 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Dynamics of immune response to coccidia was studied in rabbits by the blastic transformation method and by the following of gains in weight of mesenteric lymph nodes and spleens. The study was performed by using two of the most pathogenic species of coccidia: *Eimeria intestinalis* (highly immunogenic, parasitizing the small intestine) and *E. flavescens* (weekly immunogenic, located in the large intestine). Experiments were conducted on rabbits that were 6-7 weeks old and on sucklings. The lymphocyte proliferation in 6-7 weeks old rabbits was assessed at 7, 14 and 21 days after infection. The sucklings were infected at 14, 16, 19, 22, 25, 29 and 34 days of their life. Development of immune response in the dependence on their age was followed up.

Tato práce je součástí projektu financovaného grantem GAČR Imunitní odpověď vůči kokcidióze v závislosti na věku králíkat. Reg. č. 524/05/2328.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou diplomovou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích dne

Vodička Tomáš

Především bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Michalovi Pakandlovi, CSc. za všechny čas, který mi věnoval v průběhu celého období tvorby této práce, za všechny rady a připomínky, které vedly k finální verzi této práce a rovněž všem ostatním členům Laboratoře kokcidií za milý a přátelský přístup.

Dále mé poděkování patří paní Řezníčkové za její vedení a trpělivost během mých začátků sterilní práce v kultivačním boxu a za přípravu potřebných médií a RNDr. Jiřímu Salátovi PhD. za pomoc se statistickým zpracováním výsledků.

A nakonec děkuji svým rodičům za jejich morální podporu.

OBSAH

1.	Úvod	1
2.	Přehled problematiky	2
2.1.	Kokcidie	2
2.2.	Vývojový cyklus	2
2.2.1.	Exogenní vývoj	2
2.2.2.	Excystace a penetrace do buněk hostitele	2
2.2.3.	Merogonie	3
2.2.4.	Gamogonie	3
2.3.	Jednohostitelské kokcidie králíků	3
2.4.	Vývojový cyklus <i>E. flavescens</i>	4
2.5.	Vývojový cyklus <i>E. intestinalis</i>	4
2.6.	Patogeneze	4
2.6.1.	Klinické příznaky	6
2.6.2.	Prevence	6
2.7.	Základní funkce imunitního systému	6
2.8.	Orgány imunitního systému	7
2.8.1.	Thymus	7
2.8.2.	Lymfatické uzliny	7
2.8.3.	Slezina	8
2.8.4.	Slizniční lymfatická tkáň (MALT)	8
2.9.	Hlavní imunitní mechanismy králíků proti kokcidiím	9
2.10.	Indukce slizniční imunity	9
2.11.	Efaktorová místa slizniční imunity	10
2.12.	Dynamika imunitní odpovědi	10
3.	Materiály a metody	12
3.1.	Zvířata	12
3.2.	Parazit	12
3.3.	Pomnožení kokcidií, sběr a purifikace oocyst	12
3.4.	Sporulace	13
3.5.	Příprava antigenu	13
3.5.1.	Oocystový antigen	13
3.5.2.	Sporozoitový antigen	13

3.6.	Inokulace pokusných zvířat.....	14
3.7.	Uspořádání pokusů.....	14
3.8.	Odběr orgánů.....	15
3.9.	Test proliferace lymfocytů	15
3.10.	Statistická analýza	16
4.	Výsledky	17
4.1.	MLN a slezina u odrostlých králíků.....	17
4.1.1.	MLN a slezina u mláďat.....	18
4.2.	Test proliferace lymfocytů u odrostlých králíků.....	19
4.2.1.	Test proliferace lymfocytů u mláďat.....	20
5.	Diskuse	21
6.	Závěr	22
7.	Literatura	23

1. Úvod

Kokcidiózy u králíků jsou způsobeny intracelulárními parazity rodu *Eimeria*. 10 druhů způsobuje střevní a 1 druh jaterní kokcidiózu. Mladí králíci jsou vůči parazitovi obzvláště citliví v době odstavu, tj. ve věku 5 - 6 týdnů. Kokcidie způsobují u těchto králíků rozsáhlé destrukce buněk epitelu střeva vyvolávající těžké záněty. Postupně dochází k atrofii klků, těžkým poruchám trávení a průjmům, což vede u těchto králíků k rychlému vyčerpání a rozsáhlým úhynům.

Účelem této studie bylo sledovat dynamiku imunitní odpovědi u králíků při primární infekci dvěma druhy kokcií, a to *Eimeria intestinalis* - vysoce patogenním druhem kokcie parazitujícím v ileu a rovněž vysoce patogenním, avšak málo imunogenním druhem *E. flavescens* parazitujícím v céku. U zvířat starých kolem 6 - 7 týdnů byla sledována dynamika imunitní odpovědi, dále pak její závislost na věku v den infekce.

2. Přehled problematiky

2.1. Kokcidie

Kokcidie jsou početnou skupinou obligátně intracelulárních jednobuněčných parazitů. Nejpočetnější čeleď *Eimeriidae* zahrnuje druhy s obligátně monoxenním typem vývojového cyklu. Dosud bylo popsáno 11 druhů králíčních kokcidií; 10 druhů (*E. coecicola*, *E. perforans*, *E. exigua*, *E. vej dovskyi*, *E. media*, *E. magna*, *E. piriformis*, *E. irresidua*, *E. intestinalis*, *E. flavescens*) způsobuje střevní kokcidiózu a 1 druh (*E. stiedai*) jaterní kokcidiózu.

2.2. Vývojový cyklus

Obecně je charakterizován střídáním pohlavních a nepohlavních generací. Vývojový cyklus obligátně monoxenních zástupců čeledi je možno rozdělit do čtyř hlavních částí (exogenní vývoj, excystace a penetrace do buněk, merogonie, gamogonie).

2.2.1. Exogenní vývoj

Exogenní vývoj zahrnuje část vývojového cyklu probíhající ve vnějším prostředí – sporulaci oocyst (sporogonii). Délka sporulace je druhově charakteristická a závisí především na teplotě. Na počátku sporulace je celá oocysta vyplněna sporontem. Později sporont kondenzuje a vzniká kulovitý útvar. Následuje jaderné dělení, po kterém ze sporonta vznikají čtyři sporoblasty. Obvykle je sporoblast nejdříve kulovitý, poté se však prodlužuje a na jednom konci vzniká Stiedovo tělísko. Uvnitř každé sporocysty se začnou formovat dva sporozoiti (Hamond, 1973). Sporont (mladá oocysta) je jediné diploidní stádium, zbytek cyklu je haploidní.

2.2.2. Excystace a penetrace do buněk hostitele

Po požití oocysty vhodným hostitelem dochází k uvolnění sporozoitů z oocyst - excystaci. Mezi faktory podmiňující excystaci patří tělesná teplota hostitele, koncentrace CO₂, působení trypsinu a žluči. Působením těchto faktorů dochází k dezintegraci stěny oocysty, rozpuštění Stiedova tělíska stěny oocysty a k uvolnění pohyblivých sporozoitů do lumen střeva. Volní sporozoiti penetrují do hostitelských buněk. U králíčních kokcidií bylo na rozdíl od jiných hostitelů prokázáno, že sporozoiti nejdříve penetrují do epitelu duodena (Pakandl a

kol., 2006), tj. části střeva u většiny druhů vzdáleného od místa specifického vývoje. Později přecházejí z absorpčních epiteliálních buněk do intraepiteliálních lymfocytů, jimiž jsou transportováni do lamina propria. Nakonec se objevují v místech specifických pro vývoj daného druhu (Pakandl, 1995, Drouet-Viard, 1994). Proces penetrace do buněk obvykle trvá několik sekund. Sporozoiti, stejně jako pozdější stádia merozoiti, jsou pro průnik do buněk hostitele vybaveni složitým souborem organel zvaným apikální komplex.

2.2.3. Merogonie

Sporozoiti se po penetraci do buněk hostitele zakulacují a mění na jednojaderný meront. Uvnitř merontu dochází k mnohočetnému mitotickému dělení - merogonii, jejímž výsledkem jsou rohlíčkovitá stádia – merozoiti, schopni penetrovat do další hostitelské buňky. Počet asexuálních generací je stálý a charakteristický pro jednotlivé druhy.

2.2.4. Gamogonie

Merozoiti se po penetraci do hostitelské buňky transformují na pohlavní stadia, gamonty. Zatímco někteří merozoiti dávají vzniknout samčím mikrogamontům, jiní se transformují na samičí makrogamonty. Jádro mikrogamontu se mnohočetně dělí a následně se tvoří početné mikrogamety. Mikrogamety jsou protáhlé buňky vybavené dvojicí bičíků, které jim po uvolnění se z hostitelské buňky umožňují pohyb při vyhledávání makrogamontů. Makrogamonti neprodělávají dělení, pouze rostou a po oplodnění mikrogametou se mění na zygotu (mladou oocystu) opouštějící hostitelskou buňku a posléze i tělo hostitele.

2.3. Jednohostitelské kokcidie králíků

Kokcidie u králíků jsou kosmopolitně rozšířené a diagnostikují se prakticky v každém chovu domácích králíků. Pravidelným nálezem jsou i u divokých králíků. Hlavním zdrojem nákazy pro mladé králíky jsou dospělé samice, které většinou neonemocní. Šíření je možné různými cestami - kontaminací krmiva, vody apod. Přenos je možný zeleným krmivem, hnojením ploch králíčím trusem s následným krmením zelenou pící, nákupem zvířat z jiných chovů atd. Predispoziční faktory pro vypuknutí klinické kokcidiózy v chovech jsou zejména náhlé změny krmiva, výkyvy teploty, zvýšená vlhkost a jakékoliv jiné oslabující faktory. Oocysty pravděpodobně mohou být pasivně přenášeny v trusu nespecifických hostitelů nebo hmyzem. U starších králíků se postupem času spontánně vyvíjí imunita.

2.4. Vývojový cyklus *E. flavescens*

Životním cyklem této kokcidie se zabývali Norton, Catchpole a Joyner (1979). Nalezli první generaci v jejunu a ileu, další čtyři generace pozorovali v tlustém střevě. Ojediněle nacházeli mnohojaderné merozoity, jejich místo v životním cyklu však považují za nejasné. Dále se endogenním cyklem *E. flavescens* zabýval (Pakandl a kol., 2003). Byl studován v SPF (specific pathogen-free králících) pomocí histologie a transmisní elektronové mikroskopie. Bylo pozorováno celkem 5 asexuálních generací a dva typy merontů (typy A, B) byly nalezeny v každé generaci. Typ A dával vznik menšímu počtu větších mnohojaderných merozoitů, ze kterých vznikají dceřiní merozoiti endomerogonií, zatímco meronti typu B vytvářejí jednojaderné merozoity procesem zvaným ektomerogonie. První generace merontů byla nalezena v epitelu krypt jejunu a ilea 80 - 90 h.p.i., vývoj druhé, třetí a čtvrté generace byl lokalizován ve svrchním epitelu tlustého střeva (cékum, červovitý přívěsek a kolon). Poslední pátá generace se vyskytuje v kryptách tlustého střeva, rovněž tak u gamogonie je lokalizace stejná.

2.5. Vývojový cyklus *E. intestinalis*

Životní cyklus *E. intestinalis* byl studován světelnou a elektronovou mikroskopií (Licois a kol., 1992). Byly pozorovány čtyři generace merontů. První generace byla zaznamenána 36 až 144 hodin po inokulaci (HPI), druhá mezi 64 a 168 HPI, třetí mezi 96 a 192 HPI a čtvrtá mezi 168 a 240 HPI. Gamogonie začíná 144 HPI. Proto je možné, aby gamonti pocházeli ze třetí i čtvrté generace merontů. Pozorování elektronovým mikroskopem ukázalo, že gamonti vznikli odvozením především z merozoitů čtvrté generace. Během penetrace do střeva byli sporozoiti pozorováni v intraepiteliálních lymfocytech. Všechny asexuální generace, kromě čtvrté, byly charakterizovány dvěma typy merontů. První typ považovaný za samičí vytvářel jednojaderné merozoity a druhý považovaný za samčí obsahoval mnohojaderné merozoity.

2.6. Patogeneze

Králíci jsou vůči kokcidióze obzvláště citliví v době odstavu, tj. kolem 5. týdne života. Jednotlivé druhy kokcidií parazitující v trávicím traktu králíků mají rozdílnou patogenitu, vesměs se však v chovech jedná o smíšené infekce několika druhy. Na závažnosti onemocnění se podílí i jiné faktory. Uplatňuje se i sekundární infekce, především bakterií

Escherichia coli. K nejvíce patogenním druhům střevních kokcií se počítají *Eimeria intestinalis* a *E. flavescens* (Tabulka 1). Rozsáhlé destrukce buněk epitelu střeva vyvolávají těžké záněty, při zvláště silných infekcích i hemoragie. Postupně dochází k atrofii klků, k těžkým poruchám trávení v důsledku posunu pH do alkalického prostředí, což podmiňuje patogenní uplatnění *E. coli*. Zvláště u mladých králíků vedou tyto procesy k rychlému vyčerpání a rozsáhlým úhynům. Patologický obraz střevní kokciózy se projevuje především překrvením a zánětlivou infiltrací sliznice, jejíž stěna je zesílená. Pravidelným nálezem při střevní kokcióze jsou bělošedá, případně šedožlutá ložiska velikosti až několik milimetrů. Při jaterní kokcióze (*E. stiedai*) dochází v důsledku napadení a rozpadu buněk epitelu žlučovýchodů a následného zvýšení tvorby pojivové tkáně ke značnému zesílení stěny žlučovýchodů. Celý proces vede ke zbytnění jater, těžkým poruchám ve tvorbě a vylučování žluči, následným zažívacím poruchám a těžkému celkovému onemocnění.

Tabulka 1. Rozdělení druhů kokcií na základě jejich patogenity (Coudert a kol., 1995)

Patogenita	Druh	Příznaky
Nepatogenní	<i>E. coecicola</i>	Bez zjevných příznaků
Lehce patogenní	<i>E. perforans</i> <i>E. exigua</i> <i>E. vej dovskyi</i>	Mírný pokles, bez průjmů
Mírně patogenní nebo patogenní	<i>E. media</i> <i>E. magna</i> <i>E. piriformis</i> <i>E. ir residua</i>	Pokles růstu, občas výskyt průjmů, mortalita závislá na množství oocyst
Vysoce patogenní	<i>E. intestinalis</i> <i>E. flavescens</i>	Velký pokles růstu, silný průjem, vysoká mortalita
Patogenita závislá na množství oocyst	<i>E. stiedai</i>	Mírný pokles růstu, ztráta váhy a mortalita při infekčních dávkách > 1×10^5

2.6.1. Klinické příznaky

Nejvíce náchylnější k onemocnění jsou králíci v době odstavu, tj. ve věku kolem 5 týdnů. Infikují se však již mladší králíčata při sání. Příznaky jsou zejména nechut' k příjmu potravy, apatie, rychle se vyvíjející tympanie a při akutním průběhu průjem, někdy i s příměsí krve. Tyto příznaky jsou doprovázeny bolestivostí v břišní krajině, žíznivostí a často i záněty spojivek a zvýšenou salivací. Při jaterní kokcidióze jsou symptomy podobné, v těžkých případech se přidává i žloutenka, poruchy jaterních funkcí, zažívání, tympanie a celková vyčerpanost. Trvalý kontakt s infekcí, případně překonání onemocnění kokcidiózou vede u mladých kusů k určitému stupni imunity v dospělosti, která zpravidla zabrání novému vzplanutí onemocnění. Dospělé kusy onemocní střevní kokcidiózou zřídka kdy (při oslabení), naproti tomu jaterní kokcidióza může být příčinou úhynu i u dospělých kusů.

2.6.2. Prevence

Mezi chemoprophylaktika patří např. salinomycin, Lerbek nebo robenidin. Robenidin je světově nejvíce používané kokcidiostatikum. Tato kokcidiostatika jsou králíkům podávána v krmění. Nejstarší antikokcidika jsou sulfonamidy. V našich podmínkách se používá zejména Sulfacox, což je sulfadimidin potencovaný sulfadiveridinem, králíkům je podáván s vodou. Další možností je vakcinace živými oslabenými liniemi kokcidií, které byly odvozeny od 5 patogenních druhů (Drouet-Viard a kol., 1995). V praxi tato možnost není dosud využívána. Samozřejmě základním, i když ne vždy zcela postačujícím předpokladem prevence proti kokcidióze, je udržování patřičné hygieny v chovech.

2.7. Základní funkce imunitního systému

Základní funkcí imunitního systému je rozlišování mezi cizím a vlastním a eliminace cizího. Cílem je zachování integrity organismu, obrana proti infekci a imunitní dohled, tj. likvidace vlastních degradačních produktů, nádorových buněk atd.

2.8. Orgány imunitního systému

Dělí se na primární a sekundární. Nezralé lymfocyty získávají svou antigenní specifitu v primárních lymfatických orgánech (kostní dřeň, thymus). V sekundárních lymfatických orgánech se imunokompetentní buňky setkávají s antigenem.

B buňky diferencují v kostní dřeni. U králíků je místem diference B buněk též apendix.

2.8.1. Thymus

Je to plochý laločnatý orgán situovaný nad srdcem. Vazivovými septy je rozdělen do lalůček. Každý lalůček je rozdělen do dvou oblastí - vnější kůry, která obsahuje 85 - 90% thymocytů a vnitřní dřeň řídké osídlené thymocyty. Nezralé T lymfocyty se začínají množit v kůře, kde jich však většina též hyne. Malá subpopulace zralejších thymocytů pak migruje do dřeně, kde dále zraje a opouští thymus krevním řečištěm. Thymus obsahuje síť epitelálních, interdigitujících dendritických buněk a makrofágů, které přispívají ke zrání thymocytů. Zrající T lymfocyty procházejí pozitivní selekcí umožňující další vývoj jen těm, které rozpoznávají cizí peptidy ve spojení s vlastními molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Ostatní jsou eliminovány apoptózou. Při negativní selekci jsou dále eliminovány thymocyty rozpoznávající samotné vlastní MHC molekuly nebo tyto molekuly v komplexu s vlastním antigenem. Celkem 95 - 99% thymocytů v thymu uhyne.

2.8.2. Lymfatické uzliny

Zajišťují filtraci intersticiální tělní tekutiny a lymfy. Lymfa teče z intercelulárních prostorů v tkáních do lymfatických kapilár, lymfatických cév až do hrudního mízovodu, který spojuje lymfatický systém s krevním oběhem. Při své cestě z tkání je lymfa filtrována přes lymfatické uzliny, ve kterých fagocyty a dendritické buňky zachycují antigen nesený lymfou. Lymfatická uzlina se dělí na tři oblasti - kůru, parakortex a dřeňovou oblast. Vnější kůra obsahuje hlavně B buňky a makrofágy uspořádané do shluků zvaných primární folikuly. Po stimulaci antigenem se primární folikuly vyvíjejí na sekundární folikuly s germinálními centry obsahujícími lymfoblasty a plazmatické buňky. Parakortex obsahuje hlavně T lymfocyty a dendritické buňky, které sem migrují z tkání. Tato oblast se na rozdíl od kůry označuje jako závislá na thymu. V dřeni je málo lymfocytů, většinou jde o plazmatické buňky produkující protilátky.

2.8.3. Slezina

Sekundární lymfatický orgán uložený v břišní dutině. Na rozdíl od lymfatických uzlin filtruje krev a zachycuje přítomné antigeny. Ve slezině jsou dva druhy tkáně: červená pulpa, která se uplatňuje při likvidaci zestárých erytrocytů a bílá pulpa tvořená lymfatickou tkání. Většina lymfatické tkáně je uspořádána kolem centrálních arterií jako lymfocytární pochva. Pochva obsahuje T a B lymfocyty tvořící primární resp. sekundární folikuly s germinálními centry.

2.8.4. Slizniční lymfatická tkáň (MALT)

Hlavními úkoly MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) je zabránit průniku patogenních mikroorganismů a zachycování antigenů, které přes slizniční membrány pronikly, bránit rozvoji sebepoškozujících zánětlivých imunitních reakcí proti patogenům, ale hlavně proti neškodným antigenům a poskytovat podmínky pro diferenciaci lymfocytů. Jsou to místa interakce lymfocytů s antigenem. Lymfatická tkáň je různě složitě organizována od volných shluků buněk po organizované struktury.

Rozlišují se 4 typy lymfatické tkáně slizničního imunitního systému:

- Peyerovy plaky (organizovaná lymfatická tkáň).
- Difuzně rozptýlené lymfocyty v *lamina propria*.
- M-buňky rozptýlené v epitelové vrstvě, patří mezi antigen prezentující buňky.
- Intraepiteliální lymfocyty (IEL) ležící mezi epitelovými buňkami sliznice. Většinou jsou tvořené T-lymfocyty.

Slizniční imunitní systém vytváří vysoce organizované sekundární lymfoidní tkáně:

- BALT (Bronchoalveolar Associated Lymphoid Tissue) v případě dýchacího traktu.
- GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) v případě trávicího traktu.

GALT zahrnuje červovitý přívěsek slepého střeva, *sacculus rotundus*, Peyerovy plaky, intraepiteliální lymfocyty a lymfocyty slizničního vaziva.

Pro králíky je charakteristický značně vyvinutý červovitý přívěsek slepého střeva (*apendix vermiformis*). Apendix hraje hlavní roli v imunitním systému zajícovitých. Z hlediska struktury a funkce se liší od ostatních savců. Tento orgán plní roli primárního lymfoidního orgánu u mladých králíků, u starších zvířat funguje jako sekundární lymfoidní orgán a tak

zasahuje v indukci specifické imunitní odpovědi. B buňky, které diferencují v apendixu při kontaktu se střevní mikroflórou (Fuschuotti a kol., 1997; Lanning a kol., 2000) poté migrují do jiných částí střeva, především do Peyeroých plaků. Apendix je nezbytný pro diverzifikaci repertoáru protilátek a pro vývoj slizničního imunitního systému (Dasso a Howell, 1997; Vajdy a kol., 1998). Sacculus rotundus má u králíků velmi podobnou strukturu i funkci jako apendix.

Organizované struktury MALT obsahují podobně jako lymfatické uzliny folikuly s germinálními centry a T buněčné oblasti.

2.9. Hlavní imunitní mechanismy králíků proti kokcidiím

Existují početné důkazy, že velmi významnou roli v obraně proti kokcidiím hraje buněčná imunita (Wakelin a Rose, 1990; Rose, 1996; Lillehoj, 1998; Yun a kol., 2000). Ukázalo se, že CD4⁺ T-lymfocyty (pro některé druhy kokcidií CD8⁺) jsou významné v imunitní odpovědi, které omezuje parazita v případě primární infekce. Při následných infekcích je reprodukce parazita limitována CD8⁺ subpopulací T lymfocytů, CD4⁺ se uplatňuje v menší míře (Wakelin a Rose, 1990; Ovington a kol., 1995; Rose, 1996; Lillehoj, 1998). Ve většině parazitických infekcí je imunitní odpověď zprostředkována Th1 subpopulací lymfocytů. Tato subpopulace produkuje IL-2 a IFN- γ , který hraje zásadní roli v ochraně proti patogenům. Role buněčné imunity v ochraně proti kokcidiím byla důkladně studována zejména na myších a kuřatech a nedávno i na králících (Renaux a kol., 2001). S imunitou hostitele je spojena složitá regulace prostřednictvím cytokinů (Ovington a kol., 1995; Lillehoj, 1998).

Velmi významnou roli hraje slizniční imunita. Je obecně přijímáno, že lokální imunitní odpověď zprostředkovaná GALT hraje významnější roli v imunitě proti kokcidióze než systémová odpověď (Ovington a kol., 1995; Rose, 1996; Yun a kol., 2000; Renaux a kol., 2003).

2.10. Indukce slizniční imunity

První bariéra, na kterou patogeny narážejí při vstupu do těla intestinální cestou, je střevní epitel. Hlavní indukční místa imunitní odpovědi jsou Peyerovy plaky a červovitý přívěsek slepého střeva (*apendix vermiformis*). Antigeny jsou ve sliznici střeva pohlceny a zpracovány buňkami prezentujícími antigen (APC). Vystavením degradovaných částí

antigenů na povrchu APC jsou aktivovány různé subpopulace T-lymfocytů, jak ty, které tvoří prozánětlivé cytokiny, tak imunosupresivní Th3 lymfocyty tvořící TGF- β .

Imunita v těchto orgánech je zajišťována Th2 (produkce IL-4, IL-5 a IL-10) a Th3 (produkce TGF- β) subpopulací T lymfocytů a je směřována k produkci IgA a ke stimulaci buněk indukující toleranci antigenů ve smyslu výrazně snížené reakce imunitního systému na antigeny potravy a antigeny nepatogenních bakterií kolonizujících střevo.

2.11. Efektorová místa slizniční imunity

Základní částí střevní sliznice je *lamina propria*, tvořená pojivovou tkání infiltrovanou lymfatickými buňkami, které mají primárně funkci pomocných buněk (Trout a Lillehoj, 1996). Většina lymfoidních buněk se nachází v *lamina propria* a epitelu střeva. Imunitní odpověď se tak může vyvinout v celém střevním traktu. Střevní epitel je v zásadě tvořen dvěma typy buněk, proliferujícími málo diferencovanými buňkami střevních krypt a diferencovanými enterocyty klků tenkého střeva a povrchu tlustého střeva. Kromě toho Panethovy buňky lokalizované v kryptech tenkého střeva obsahují sekreční granula bohatá na lysozym se silnou bakteriolytickou aktivitou a antibiotické peptidy, např. kryptidin. Tím přispívají k udržení gastrointestinální bariéry. Hostiteli poskytují ochranu proti mikroorganismům. Enterocyty tvoří asi 90 % střevního epitelu. Tyto buňky mimo jiné zajišťují přenos IgA syntetizovaného plazmocyty *lamina propria* až do lumen střeva. IgA převládající na povrchu slizničních membrán zabraňují uchycení mikroorganismů na povrch epitelu (Gebbers a Laissue, 1989). Enterocyty exprimují MHC molekuly umožňující specifickou odpověď a také produkují některé cytokiny. Přítomnost granul v cytoplasmě bohatých na perforin, granzymy a Fas-Ligand je důkazem cytotoxické aktivity IEL.

2.12. Dynamika imunitní odpovědi

Hlavními modely pro studium aspektů imunitní odpovědi vůči kokcidióze jsou myši a kuřata. Králíci nejsou tak často využíváni jako modelová zvířata v imunologii, proto mnoho reagií jako rekombinantní cytokiny a protilátky proti těmto cytokinům a většina povrchových markerů leukocytů není dostupných.

Existuje velmi málo dat týkajících se dynamiky imunitní odpovědi proti kokcidiím u králíků. Jednu z mála prací sledujících dynamiku buněčné imunity provedla Renaux a kol. (2003). Vývoj imunitní odpovědi byl sledován 3, 7, 14 a 21 dní po infekci (DPI). Infikovaní

králíci vykazovali zvyšující se procento CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů v mezenterických lymfatických nodech (MLN) a tenkém střevě, dále rozsáhlou infiltraci CD8⁺ lymfocytů do *lamina propria* tenkého střeva, zvýšenou parazit-specifickou proliferaci MLN buněk a zvýšený titr IgG v krvi. Tyto experimenty byly prováděny u králíků starých nejméně 6 týdnů. Sající králíčata nemohou být infikována kokcidiemi před přibližně 20. dnem věku. Povaha tohoto jevu je nejasná, ale jev byl pozorován i u králíků držených v prostředí bez kokcidií po několik generací. Proto musejí být brány v úvahu i faktory nesouvisející s imunitou, např. absence kyseliny listové v potravě. Drouet-Viard a kol. (1996) zjistili, že králíci v době odstavu (5-6 týdnů), nejsou chráněni imunitou získanou od matky.

Imunogenita oslabených linií *E. intestinalis*, *E. magna* a *E. media* byla prokázána (Licois a kol., 1990, 1994, 1995), ale tyto experimenty byly prováděny s 6 až 7 týdenními králíky. Imunizace mladších kusů (25 - 29 dní) byla prováděna pouze s oslabenými liniemi *E. magna* (Drouet-Viard a kol., 1997a, 1997b) a vznik protektivní imunity byl potvrzen pomocí zátěžové infekce původními kmeny. Nepraktičtější a nejčastěji používaná kritéria pro hodnocení patogenního působení kokcidií a imunitního stavu králíků jsou přírůstky hmotnosti a vylučování oocyst. Pro hlubší pochopení vzniku imunitní odpovědi je však nutné i použití imunologických metod.

V této práci je sledována dynamika imunitní odpovědi vůči infekci dvěma nejvíce patogenními druhy, *E. intestinalis* (vysoce imunogenní, parazitující v tenkém střevě) a *E. flavescens* (slabě imunogenní, parazitující v tlustém střevě) metodou blastické transformace lymfocytů a sledováním změn hmotností slezin a MLN. Podstatou metody blastické transformace lymfocytů je jejich uvedení do aktivního stavu prostřednictvím stimulace nespecificky působícími mitogeny nebo specifickými antigeny. Lymfocyty na tuto stimulaci reagují proliferací, jejíž intenzita se sleduje. Dále byla těmito metodami sledována imunitní odpověď v závislosti na věku králíčat v den inokulace.

3. Materiály a metody

3.1. Zvířata

K pokusům byli použiti SPF (specific patogen-free) králíci hmotnostní kategorie 1 - 1,5 kg, tedy věku kolem 6 - 7 týdnů. Králíci byli odebíráni od firmy ANLAB (Praha).

Klece v chovné místnosti, ve kterých byli králíci prosti kokcidií drženi, jsou umístěny na nerezových stolech pod laminárními jednotkami NU-114-630E (výrobce Nuaire, USA – dodavatel Nymro, s. r. o., Brno).

Krmiva, voda a klece jsou sterilizovány, což umožňuje držet králíky prosté kokcidií a také odchovávat mláďata prosté kokcidií. Nepřítomnost parazita u mláďat byla potvrzena koprologickým vyšetřením.

3.2. Parazit

V pokusech jsem pracoval se dvěma druhy kokcidií, *Eimeria intestinalis* získané z Francie (Unité de Pathologie du Lapin, INRA, BASE, Tours, France) a *E. flavescens*. Čistý kmen této kokcidiie byl získán v Laboratoři kokcidií Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR.

3.3. Pomnožení kokcidií, sběr a purifikace oocyst

Králíkům bylo podáno 3000 oocyst *E. intestinalis* nebo 1000 oocyst *E. flavescens*. Výtěžek oocyst činil přibližně 10^9 u *E. intestinalis* 10^8 u *E. flavescens*. Prepatentní perioda obou druhů je 9 dní. Králík byl proto za účelem získání oocyst utracen 10 dní po inokulaci (DPI).

Králíci byli krmeni a napájeni *ad libitum*, podávání pevného krmení bylo ukončeno 24 hodin před odebíráním oocyst. Tímto způsobem eliminujeme ztráty oocyst, které by vyšly s trusem. Také předejdeme výskytu větších rostlinných částecek v žaludku a slepém střevě. Sběr oocyst je možný dvěma způsoby - a sice z trusu nebo slepého střeva a žaludku. Druhý způsob je preferován z důvodu minimální pravděpodobnosti kontaminace a také kvůli nepřítomnosti větších rostlinných zbytků (Coudert a kol., 1995). Obsah žaludku a slepého střeva byl rozředěn v 200 - 300 ml vody obsahující několik kapek detergentu (tekuté mýdlo) a

po 1 hodině přefiltrován přes sítko (150 µm). Zbytek materiálu v sítku byl znovu rozředěn a zfiltrován. Filtrát (600 - 800 ml) byl centrifugován při 800 - 1000 g po dobu 3 až 5 minut. Pelet byl resuspendován v roztoku síranu hořečnatého (MgSO₄) o hustotě 1,14 g/ml, který je k oocystám šetrnější než chlorid sodný (NaCl). Následovala opět centrifugace (10 minut při 1000 g). Poté byl odebrán supernatant a promyt nejprve 3krát v destilované vodě a pak ošetřen v chlornanu sodném (NaClO), který jednak eliminuje nežádoucí bakterie a také zamezí shlukování oocyst, takže podmínky sporulace jsou pak standardní. Chlornan byl odstraněn čtyřmi promytími ve vodě.

3.4. Sporulace

Suspenze byla inkubována na rotační třepačce při pokojové teplotě po dobu 72 hodin pro *E. intestinalis* i *E. flavescens*. Nádoba se suspenzí byla zaplněna maximálně do 30% objemu. Oocysty byly ve 2,5% roztoku dichromanu draselného. Množství oocyst nepřesahovalo 3×10^6 /ml suspenze.

3.5. Příprava antigenu (Ag)

3.5.1. Oocystový Ag

Vyčištěné oocysty byly důkladně promíchány se skleněnými kuličkami o průměru 1 mm a třepány s použitím třepačky (beadbeater), sonikovány a centrifugovány při 13500 ot./min. Po změření koncentrace proteinu byl supernatant rozdělen do alikvót a zamrazen.

3.5.2. Sporozoitový Ag

Oocysty byly rozbity v homogenizátoru, získané sporocysty byly dány do excystačního media. Uvolnění sporozoiti byli promyti v PBS (phosphate buffer solution) a vyčištěni přes filtr o velikosti pórů 5 µm. Ag byl připraven čtyřmi cykly zmrazení v tekutém dusíku, rozmrazení a sonikací.

3.6. Inokulace pokusných zvířat

Počet oocyst potřebný k inokulaci byl spočítán ve 40 sloupcích McMasterovy počítací komůrky a vynásoben ředěním. Daný výsledek je roven počtu oocyst v 1 ml. Suspenze oocyst byla naředěna tak, aby potřebné inokulum bylo maximálně v 200 μ l. Králíci byli inokulováni 2000 oocyst *E. intestinalis* nebo stejným počtem oocyst *E. flavescens*. U mláďat byla rovněž dávka oocyst pro inokulaci 2000 u obou druhů kokcií. Oocysty byly králíkům podány perorálně. Inokulace byla prováděna pomocí mikropipety, jejíž špička byla vložena pod jazyk králíka.

3.7. Uspořádání pokusů

Králíci (1 - 1,5 kg) byli inokulováni a utráceni po 7, 14 a 21 dnech. Počty pokusných zvířat a antigeny, které byly použity ke stimulaci lymfocytů jsou uvedeny v tabulce 2.

Počty mláďat inokulovaných ve věku 14, 16, 19, 22, 25, 29 a 34 dní života (v případě *E. flavescens* od 19. dne) a antigeny použité ke stimulaci lymfocytů jsou uvedeny v tabulce 3. Mláďata byla utrácena 14 dní po inokulaci (DPI). Tuto dobu jsme zvolili na základě výsledků s odrostlými králíky, u kterých test proliferace lymfocytů dával spolehlivé výsledky 14 DPI. Počty kontrolních mláďat odpovídaly počtu inokulovaných v jednotlivých věkových intervalech.

Tabulka 2

	DPI			
	K	7	14	21
Počet zvířat infikovaných <i>E. intestinalis</i> , buňky stimulované oocyst. Ag	10	7	6	6
Počet zvířat infikovaných <i>E. intestinalis</i> , buňky stimulované sporoz. Ag	7	5	5	5
Počet zvířat infikovaných <i>E. flavescens</i> , buňky stimulované oocyst. Ag	7	5	4	5
Počet zvířat infikovaných <i>E. flavescens</i> , buňky stimulované sporoz. Ag	7	4	4	6

Tabulka 3

	Stáří mláďat v době inokulace (dny)						
	14	16	19	22	25	29	34
Počet zvířat infikovaných <i>E. intestinalis</i> , buňky stimulované oocyst. Ag	3	3	3	3	4	3	4
Počet zvířat infikovaných <i>E. intestinalis</i> , buňky stimulované sporoz. Ag	3	3	3	3	4	3	4
Počet zvířat infikovaných <i>E. flavescens</i> , buňky stimulované oocyst. Ag	-	-	3	3	4	4	4
Počet zvířat infikovaných <i>E. flavescens</i> , buňky stimulované sporoz. Ag	-	-	3	3	4	4	4

3.8. Odběr orgánů

Sterilně, za pomoci sterilních nástrojů a chirurgických rukavic, byly vypreparovány všechny mezenterické lymfatické uzliny (MLN) a slezina, jejichž hmotnosti byly zváženy. Dále bylo odebráno tlusté střevo (v případě inokulace *E. flavescens*) nebo ileum a zadní jejunum (po inokulaci *E. intestinalis*). V případě kontrolních zvířat obojí.

3.9. Test proliferace lymfocytů

Lymfocyty byly získány ze sterilně vypreparovaných MLN. MLN byly protlačeny přes sítko do media RPMI-1640 (bez séra) a tak byly získány jednotlivé buňky. Vzniklá suspenze byla převedena do zkumavky a zcentrifugována (1000 ot./min, 4°C). Buňky byly celkem 3krát promyty v mediu. Tento postup umožnil odstranění nežádoucích složek, např. částec tuku.

Po promytí byly buňky resuspendovány v 1 ml media RPMI-1640, obsahující 10% bovinního fetálního séra (BOFES), L-glutamin, penicilin, streptomycin a 2-merkptoethanol. Poté byly buňky spočítány v Bürkerově komůrce a jejich životnost zhodnocena na základě vyloučení trypanové modři. Spočítané buňky byly naředěny mediem tak, aby vzniklá buněčná suspenze obsahovala 10^6 buněk/100 μ l. Takto připravená suspenze byla rozkapána do 96-jamkového

mikrotitračního panelu (TRP) s plochými dny jamek po 100 µl/jamku. Nеспецифická stimulace byla vyvolána mitogeny konkanavalinem A (ConA) a fytohemaglutininem (PHA) (Sigma). Výsledná koncentrace v jamce byla 5 µg/ml. Dále byly použity antigeny připravené z oocyst a sporozoitů. Pro kontrolu a každou hodnotu koncentrace byly použity tři jamky.

Jednotlivé trojice jamek s nasazenou buněčnou suspenzí byly převrstveny 100 µl čistého media (kontrola), 100 µl media s koncentracemi Ag upravenými tak, aby výsledná koncentrace Ag v příslušných jamkách byla 10, 5, 1 a 0,2 µg/ml. Takto nasazené buňky byly kultivovány v termostatu (37°C a 3,5% CO₂) po dobu 3 dnů. Po této kultivaci bylo z každé jamky odebráno 100 µl a přeneseno do nového panelu a poté do každé jamky přidáno 10 µl reagentie Cell-counting kit 8 (CCK-8, Fluka) a na 4 hodiny uloženo do termostatu. Tato reagentie umožňuje snadnou analýzu vzorku využívající ve vodě rozpustné tetraazoliové soli WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H tetraazolum sodná sůl], která vytváří při redukci v přítomnosti elektronových přenašečů ve vodě rozpustné barvivo formazan. Test je vyhodnocen změřením absorbance pomocí ELISA readeru při vlnové délce 450 nm. Z naměřených hodnot byly spočítány stimulační indexy jako podíly absorbance v jamkách s nejvyšší hodnotou (zpravidla 10 nebo 5 µg antigenu/ml) ku hodnotě v jamkách, kde nebyl přidán antigen. Výsledky byly statisticky zpracovány a na jejich základě vytvořeny grafy uvedené v sekci Výsledky. Práce s buňkami probíhala za sterilních podmínek v kultivačním boxu.

3.10. Statistická analýza

Výsledky byly zpracovány v programu STATISTICA .

Pro zhodnocení změn hmotností MLN a slezin u odrostlých králíků a testu proliferace lymfocytů u odrostlých králíků byla použita jednocestná ANOVA.

Rozdíly v hmotnostech MLN a slezin u mlád'at ve srovnání s příslušnou kontrolou byly hodnoceny pomocí Studentova *t*-testu. Test proliferace lymfocytů u mlád'at byl hodnocen stejným způsobem.

4. Výsledky

U odrostlých králíků byla produkce oocyst v řádu 10^8 (*E. flavescens*) a 10^9 (*E. intestinalis*) na zvíře.

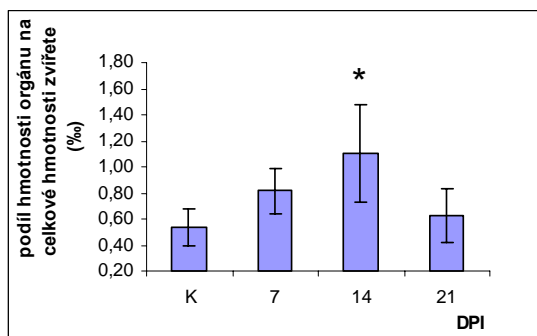
Inokulovaná mláďata vylučovala oocysty v malém počtu od 19 dní stáří v den inokulace, pozdější produkce oocyst se pohybovala v řádech milionů na zvíře.

Výsledky (hmotnost MLN a sleziny a proliferační test) jsou shrnuty v grafech 1- 4.

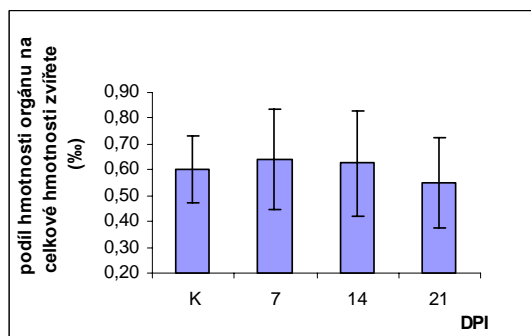
4.1. MLN a slezina u odrostlých králíků

Graf 1: Hmotnost MLN a sleziny vyjádřená jako promile celkové hmotnosti zvířete v závislosti na DPI

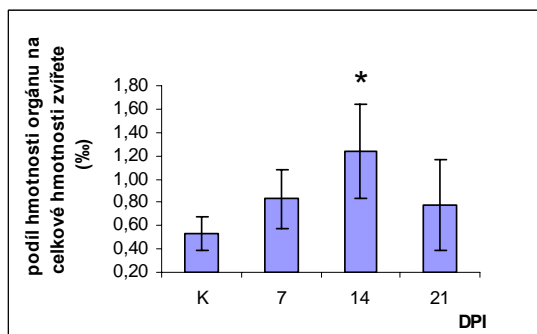
A)



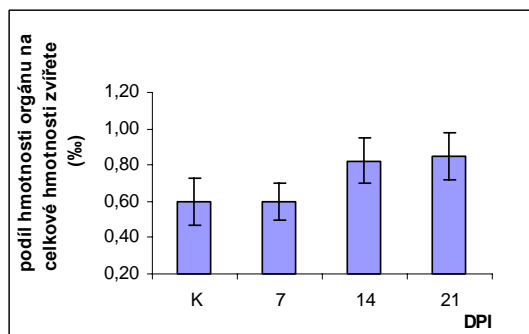
B)



C)



D)



- A) podíl hmotnosti MLN na celkové hmotnosti zvířete inokulovaného *E. intestinalis*
- B) podíl hmotnosti sleziny na celkové hmotnosti zvířete inokulovaného *E. intestinalis*
- C) podíl hmotnosti MLN na celkové hmotnosti zvířete inokulovaného v *E. flavescens*
- D) podíl hmotnosti sleziny na celkové hmotnosti zvířete inokulovaného *E. flavescens*

* na základě ANOVA testu skupina statisticky signifikantně odlišná od kontroly a DPI 21 pro $p < 0,05$

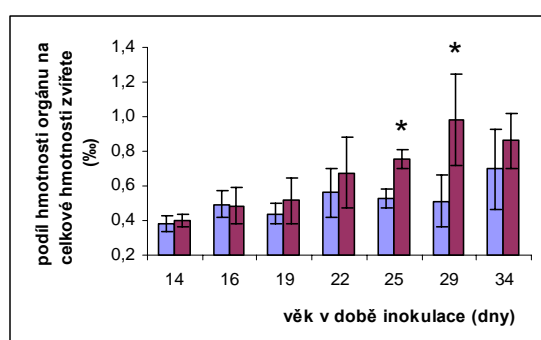
Z výsledků je patrné, že v případě MLN došlo ke statisticky významnému zvětšení 14 DPI v případě obou druhů kokcií.

Hmotnost slezin inokulovaných zvířat se statisticky nelišila od zvířat kontrolních bez ohledu na to, jakým druhem kokcií byli králíci inokulováni.

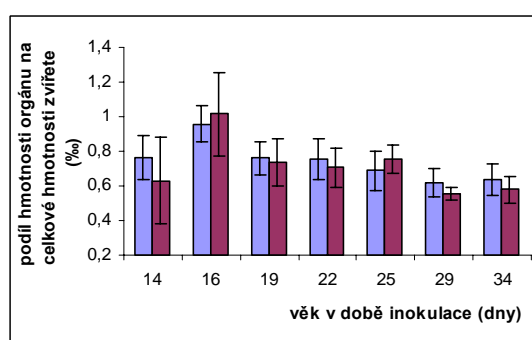
4.1.1. MLN a slezina u mlád'at

Graf 2: Hmotnost MLN a sleziny vyjádřená jako promile celkové hmotnosti zvířete v závislosti na jeho věku v den inokulace

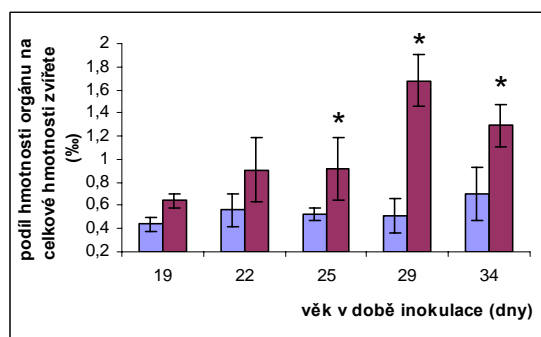
A)



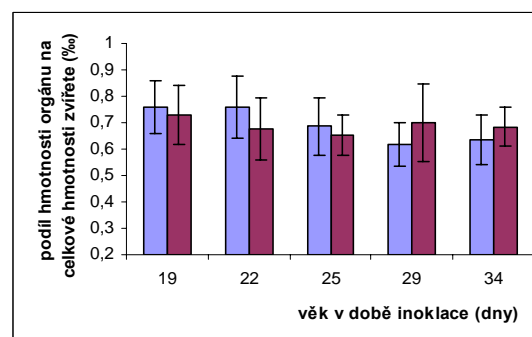
B)



C)



D)



■ kontrolní ■ inokulovaní

- A) podíl hmotnosti MLN na celkové hmotnosti zvířete inokulovaného v daném věku *E. intestinalis*
- B) podíl hmotnosti sleziny na celkové hmotnosti zvířete inokulovaného *E. intestinalis*
- C) podíl hmotnosti MLN na celkové hmotnosti zvířete inokulovaného v *E. flavescens*
- D) podíl hmotnosti sleziny na celkové hmotnosti zvířete inokulovaného *E. flavescens*

* na základě Studentova *t*-testu významné rozdíly mezi kontrolními a inokulovanými zvířaty pro $p < 0,05$

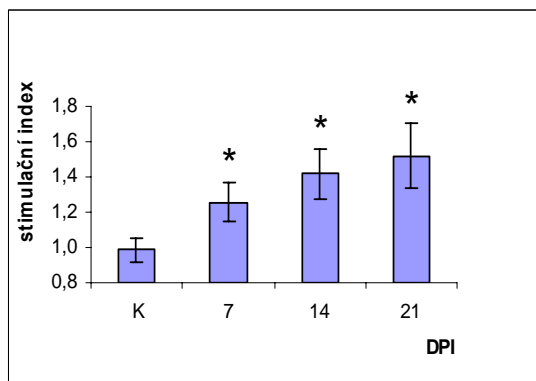
Výsledky ukazují, že v průběhu infekce nedochází ke zvětšení slezin bez ohledu na to, jakým druhem kokcií byla zvířata inokulována.

V případě MLN jsme pozorovali statisticky významné zvětšení při věku 25 dní v době inokulace a později. V případě 2A nebyl při věku 34 dní v době inokulace nárůst hmotnosti MLN oproti kontrole statisticky významný.

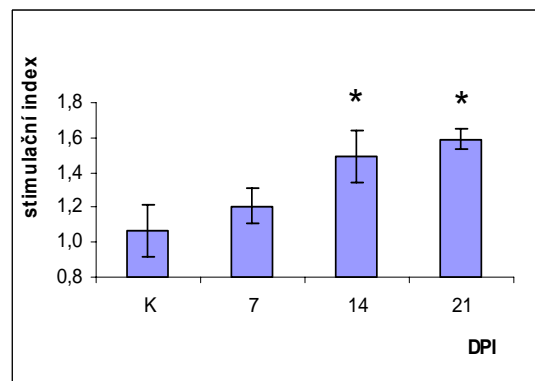
4.2. Test proliferace lymfocytů u odrostlých králíků

Graf 3: Závislost proliferace lymfocytů na DPI

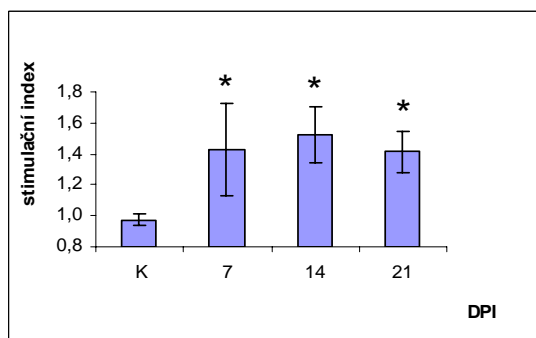
A)



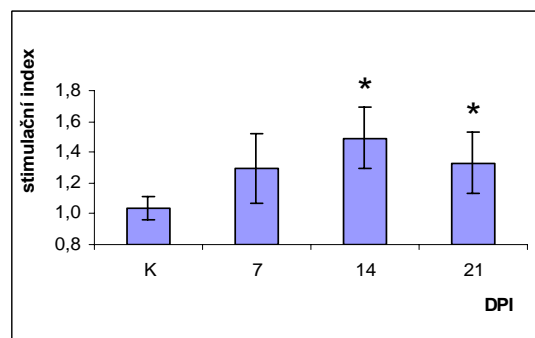
B)



C)



D)



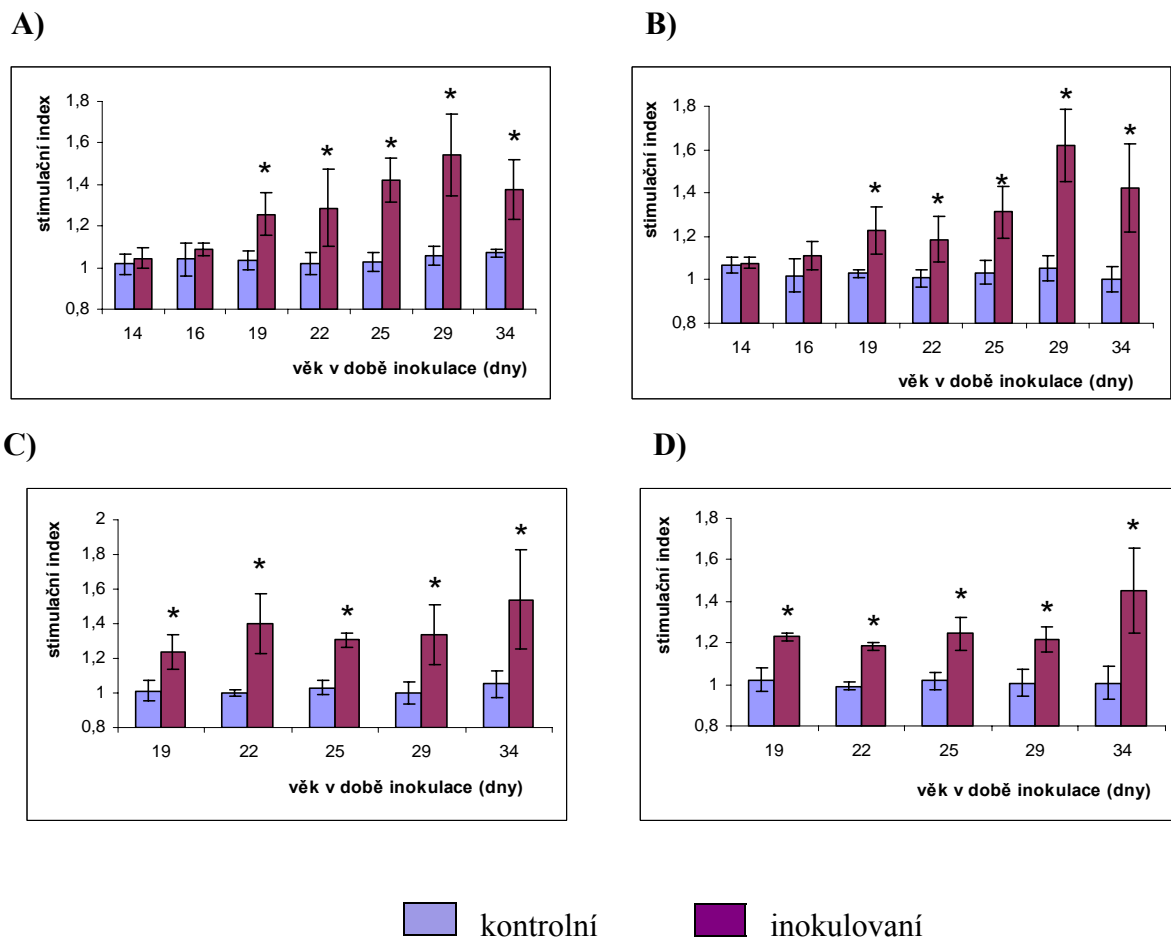
Zvířata byla inokulována: A) oocystovým Ag připraveným z *E. intestinalis*
 B) sporozoitovým Ag z *E. intestinalis*
 C) oocystovým Ag z *E. flavescens*
 D) sporozoitovým Ag z *E. flavescens*

* na základě ANOVA testu skupina statisticky signifikantně odlišné od kontroly pro $p < 0,05$

Výsledky ukazují, že v případech 3A a 3C dochází ke zvýšení proliferace lymfocytů ve srovnání s kontrolními zvířaty již 7 DPI a totéž bylo zjištěno 14 i 21 DPI. V případech, kdy byl použit sporozoitový Ag, se statisticky významná proliferace objevuje až 14 DPI.

4.2.1 Test proliferace lymfocytů u mláďat

Graf 4: Závislost proliferace lymfocytů na věku králíčat v době inokulace



T- lymfocyty stimulované : **A)** oocystovým antigenem *E. intestinalis*
B) sporozoitovým antigenem *E. intestinalis*
C) oocystovým antigenem *E. flavescens*
D) sporozoitovým antigenem *E. flavescens*

* na základě Studentova *t*-testu významné rozdíly mezi kontrolními a inokulovanými zvířaty pro $p < 0,05$

Výsledky ukazují, že od 19. dne věku dochází u obou druhů kokcií ke stimulaci lymfocytů antigenem jak oocystovým tak sporozoitovým. Z grafů se zdá, že vrchol proliferace lymfocytů u zvířat inokulovaných *E. intestinalis* se pohybuje okolo 29. dne života, nicméně to nebylo statisticky potvrzeno.

U zvířat inokulovaných *E. flavescens* nebyla pozorována dynamika imunitní odpovědi tak výrazná jako v případě inokulace *E. intestinalis*.

5. Diskuse

Existují početné studie prokazující dominantní roli buňkami zprostředkované imunitní odpovědi proti infekci kokcidiemi u kuřat a myši (Lillehoj, 1998; Rose a Long, 1970; Wakelin a Rose, 1990). Role T lymfocytů je potvrzena jejich proliferací v přítomnosti parazitárních antigenů (Martin a kol., 1993, 1995; Rose a kol., 1988b; Wakelin a kol., 1993). Podobných studií zabývajících se touto tematikou u králíků existuje doposud velmi málo.

Podobně jako u myši (Rose a kol., 1990) byla u králíků proliferace lymfocytů stimulovaných specifickým antigenem detegována v MLN za 7 DPI a signifikantní se stala 14 DPI (Renaux a kol., 2003). Z hlediska životního cyklu 7 DPI u obou druhů parazita probíhá poslední merogonie. 14 DPI už jsou přítomni jen gamonti, jejichž počet v hostiteli je už nízký. Přesto je proliferace v tomto období nejvýraznější díky již vytvořeným paměťovým lymfocytům.

V naší studii jsme kromě starších zvířat sledovali také vývoj imunitní odpovědi u mláďat, počínaje 14. dnem života. Na základě výsledků dosažených u odrostlých králíků byla proliferace lymfocytů u mláďat testována 14 DPI. Blastická transformace byla vyvolána in vitro antigeny připravenými z oocyst nebo sporozoitů. U mláďat byla poprvé proliferativní odpověď zaznamenána při inokulaci v 19. dni života, což platí pro oba sledované druhy kokcidií. Produkce oocyst byla u těchto zvířat velmi nízká. Nicméně i malý počet stádií parazita vedl k navození buněčné imunitní reakce. Mezi stimulacemi oocystovým a sporozoitovým antigenem připraveným z dané kokcidie nebyl pozorován signifikantní rozdíl. U slezin nebyl ani v jednom z hodnocených případů pozorován statisticky významný nárůst hmotnosti. Naproti tomu MLN dosáhly maximálního zvětšení 14 DPI. U mláďat došlo ke zvětšení MLN oproti kontrolním zvířatům při inokulaci oběma druhy kokcidií ve věku 25 dní. Protože naprostou většinu buněk v MLN tvoří lymfocyty, lze předpokládat, že je zde přímý vztah mezi počtem buněk a jejich hmotností. Zvýšení počtu lymfocytů v MLN je zřejmě projevem lokální imunitní odpovědi.

Srovnání obou druhů kokcidií ukázalo, že jejich imunogenita nemá zásadní vliv na výsledek testu proliferace lymfocytů. Organismus jako celek je však nesrovnatelně složitější systém, takže i přes schopnost antigenů stimulovat proliferaci lymfocytů je stupeň získané imunity po primární infekci různými druhy kokcidií zásadně odlišný.

6. Závěr

Dynamika imunitní odpovědi vůči infekci *Eimeria intestinalis* (vysoce patogenní, vysoce imunogenní) a *E. flavescens* (vysoce patogenní, málo imunogenní) byla studována metodou blastické transformace u SPF (specific pathogen-free) králíků, metodou testu proliferace lymfocytů a sledováním změn hmotností MLN a slezin. Obě metody byly prováděny u odrostlých králíků (1 - 1,5 kg) a mláďat.

V hmotnostech slezin nebyl mezi kontrolními a inokulovanými zvířaty zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl ani v jednom ze sledovaných intervalů. Zjištěné hodnoty byly velmi podobné u mladých i odrostlých králíků bez ohledu na to, jakým druhem kokcidie byli inokulováni. Naproti tomu hmotnost MLN inokulovaných zvířat se od kontroly lišila už 7 DPI, maxima dosáhla 14 DPI. U mláďat inokulovaných v různém věku se hmotnost MLN začala zvyšovat u zvířat inokulovaných v 19. dni života. Průběh infekce byl velmi podobný u obou druhů kokcií.

Test proliferace lymfocytů u odrostlých králíků vykazoval přibližně stejné výsledky 14 a 21 DPI u obou druhů kokcií. U mláďat inokulovaných vysoce imunogenní *E. intestinalis* byla proliferativní odpověď vyšší u inokulovaných než u kontrolních zvířat od 19. dne života. U mláďat inokulovaných méně imunogenní *E. flavescens* byly hodnoty stimulačního indexu poněkud nižší než v případě *E. intestinalis*. Imunitní odpověď podle druhu použitého antigenu (oocystového nebo sporozoitového) se nelišila.

7. Literatura

- CATCHPOLE, J., NORTON, C.C. (1975). Coccidiosis in rabbits: experimental infection with *E. intestinalis*. J. Protozool. 22: 49A .
- COUDERT, P., LICOIS, D., DROUET-VIARD, F. (1995). *Eimeria* species and strains of the rabbits. In: Eckrt, J., Braun, R., Shitley, M.W., Coudert, P. 1995. Guidelines on techniques in coccidia research. European Commission, Directorate-General XII, Science, Research and Development Environment Research Programme, pp. 52-71.
- DASSO, J.F., HOWELL, M.D. (1997). Neonatal appendectomy impairs mucosal immunity in rabbits. Cell Immunol. 182: 29-37.
- DROUET-VIARD, F., COUDERT, P., LICOIS, D., BOIVIN, M. (1997a). Vaccination against *Eimeria magna* coccidiosis using spray dispersion of precocious line oocysts in the nest box. Vet. Parasitol. 70: 61-66.
- DROUET-VIARD, F., COUDERT, P., LICOIS, D., BOIVIN, M. (1997b). Acquired protection of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) against coccidiosis using a precocious line of *Eimeria magna*, effect of vaccine dose and age at vaccination. Vet. Parasitol. 69: 1997-2001.
- DROUET-VIARD, F., COUDERT, P., ROUX, C., LICOIS, D., BOIVIN, M. (1996). Etude de la résistance acquise par la lapin reproductrice immunisée avec une lignée précoce d' *Eimeria magna* et de sa transmission à sa portée. World Rabbit Sci. 4: 159-163.
- DROUET-VIARD, F., FORTUNE-LAMOTHE, L. (2002). The organisation and functioning of the rabbit immune system: Particular features of the rabbit. World rabbit Sci. 10: 15-23.
- DROUET-VIARD, F., LICOIS, D., PROVOT, F., COUDERT, P. (1994). The invasion of the rabbit intestinal tract by *Eimeria intestinalis* sporozoites. Parasitol. Res. 80: 706-707.
- FUSCHIOTI, P., FITTS, M.G., POSPISIL, R., WEINSTEIN, P.D., MAGE, R.G. (1997). RAG 1 and RAG 2 in developing rabbit appendix subpopulations. J. Immunol. 158: 55-64.
- GEBBERS, J.O., LAISSUE, J.A.. (1989). Immunologic structures and functions of the gut. Schweiz Archiv für Tierheilkunde. 131: 221-238.
- HAMMOND, D.M.(1973). Life cycles and development of coccidia. In: Hammond, D.M., Coccidia. University Park Press, Baltimore and Butterworth & Co., pp. 45-79.

- LANNING, D., SETHUPATHI, P., RHEE, K.J., ZHAI, S.K., KNIGHT, K.L. (2000). Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J. Immunol.* 165: 2012-2019.
- LICOIS, D., COUDERT, P., BAHAGIA, S., ROSSI, G.L. (1992). Characterisation of *Eimeria* species in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): endogenous development of *Eimeria intestinalis* Cheissin, 1948. *J. Parasitol.* 78: 1041-1048.
- LICOIS, D., COUDERT, P., BOIVIN, M., DROUET-VIARD, F., PROVOT, F., (1990) Selection and characterisation of precocious line of *Eimeria intestinalis*, an intestinal rabbit coccidium. *Parasitol. Res.* 76: 192-198.
- LICOIS, D., COUDERT, P., DROUET- VIARD, F., BOIVIN, M.(1994). *Eimeria media*: selection and characterization of a precocious line. *Parasitol. Res.* 80: 48-52.
- LICOIS, D., COUDERT, P., DROUET- VIARD, F., BOIVIN, M.(1995). *Eimeria magna*: pathogenicity, immunogenicity and selection of precocious line. *Vet. Parasitol.* 60: 27-35.
- LILLEHOJ, H.S. (1998). Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *Int. J. Parasitol.* 28: 1071-1081.
- NORTON, C.C., CATCHPOLE, J., JOYNER, L. (1979). Redescriptions of *Eimeria irresidua* Kessel & Jankiewicz, 1931 and *E. flavescens* Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. *Parasitology* 79: 231-248.
- OVINGTON, K.S., ALLEVA, L.M., KERR, E.A. (1995). Cytokines and immunological control of *Eimeria* sp. *J. Parasitol.* 25: 1331-1351.
- PAKANDL, M., ČERNÍK, F., COUDERT , P. (2003). The rabbit coccidium *Eimeria flavescens* Marotel and Guilhon, 1941: an electron microscopic study of its life cyklus. *Parasitol. Res.*, 304-311.
- PAKANDL, M., DROUET-VIARD, F., COUDERT, P. (1995). How do sporozoites of rabbit *Eimeria* species reach their target cells? Comtes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie. 318: 1213-1217.
- PAKANDL, M., SEWALD, B., DROUET-VIARD, F. (2006). Invasion of the intestinal tract by sporozoites of *Eimeria intestinalis* in naive immune rabbits. *Parasitol. Res.* 98: 310-316.
- RENAUX, S., DROUET-VIARD, F., CHANTELOUP, N.K., LE VERN, Y., KERBOEUF, D., PAKANDL, M., COUDERT, P. (2001). Tissues and cells involved in the invasion of the rabbit intestinal tract by sporozoites of *Eimeria coecicola*. *Parasitol. Res.* 87: 98-106.

- RENAUX, S., QUERE, P., BUZONI-GATEL, D., SEWALD, B., LE VERN, Y., COUDERT, P., DROUET-VIARD, F. (2003). Dynamics and responsiveness of T-lymphocytes in secondary lymphoid organs of rabbits developing immunity to *Eimeria intestinalis*. *Vet. Parasitol.* 110: 181-195.
- ROSE, M.E., (1996): Immunity to coccidia. In: Davidson, T.F., Morris, T.R., Payne, L.N., Eds.: Poultry immunology. Poultry Sci. Symp. Series, Volume 24, pp. 265-279.
- TROUT, J.M., LILLEHOJ, H.S. (1996). T lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53: 163-172.
- VAJDY, M., SETHUPATHI, P., KNIGHT, K.L. (1998). Dependence of antibody somatic on diversification gut-associated lymphoid tissue in rabbits. *J. Immunol.* 160: 2725-2729.
- WAKELIN, D., ROSE, M.E. (1990). Immunology to coccidiosis. In: Coccidiosis of man and domestic animals. Long Pl (ed), CRC Press, Florida: pp. 281-306.
- YUN, C.H., LILLEHOJ, H.S., LILLEHOJ, E.P. (2000a). Intestinal immune response to coccidiosis. *Dev. Comp. Immunol.* 24: 303-324.