

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Bakalářská diplomová práce**

**Imunitní odpověď myši na infekci  
žaludečnými kryptosporidii**

**Marie Jalovecká**

Školitel: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.  
Školitel specialista: RNDr. Jiří Salát, Ph.D.

České Budějovice, 2009

**Jalovecká M.**, 2009: Imunitní odpověď myši na infekci žaludečními kryptosporidiiemi [The immune response of mice to gastric cryptosporidium infections]. 49 pp., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE:

The immune response in stomach mucosa during the primary infection and re-infection of *Cryptosporidium muris* (TS03 and CB03) and *C. andersoni* in immunocompetent BALB/c mice was observed in this study. No significant differences in the induction of a cellular response were observed in mice infected with the two strains of *C. muris*. Significantly elevated migration of T-lymphocytes (more than 1000-fold), especially CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, to the stomach mucosa was described during primary infection. Moreover, the persisting severalfold increased level of T-lymphocytes in stomach epithelium was observed 2 months after recovery from the primary cryptosporidiosis. Very low level of IFN- $\gamma$  production in *ex vivo* cultures of splenocytes was recorded during the course of the primary infection (0.5 ng/ml), whereas during reinfection the concentration of IFN- $\gamma$  rapidly increased 22-fold (10.7 ng/ml). After infection of BALB/c mice with *C. andersoni* LI03, migration of T-lymphocytes and production of INF- $\gamma$  in *ex vivo* splenocyte primary cultures was also observed, even though this isolate of *C. andersoni* does not infect *Mus musculus*. These results imply that the CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes are involved in the immune response to gastric cryptosporidiosis and could play an important role in the elimination of *C. muris* infection in mice.

Práce je součástí programu Laboratoře lékařské a veterinární parazitologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GA AV KJB 500960701 (řešitel doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.)

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím literatury uvedené v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne .....

Marie Jalovecká

.....

## PODĚKOVÁNÍ:

Děkuji především mému školiteli Martinu Kváčovi za vedení mé práce, trpělivost a ochotu mi kdykoliv pomoci. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře oportunních parazitů Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za vstřícné a přátelské prostředí a cenné rady. Poděkování patří také mému školiteli specialistovi Jiřímu Salátovi za pomoc s imunologickou částí mé práce a cenné připomínky. Děkuji rovněž všem pracovníkům Oddělení imunologie parazitů PaU BC AV ČR za umožnění přístupu do jejich laboratoří.

Velký dík patří také mým rodičům, kteří mě vždy a ve všem podporovali, a mým přátelům za cenné rady a připomínky.

# OBSAH:

1. ÚVOD.....	1
1.1 Biologie rodu <i>Cryptosporidium</i> .....	1
1.1.1 Systematika a hostitelská specifita .....	1
1.1.2 Vývojový cyklus.....	2
1.1.3 Klinické projevy kryptosporidiózy a epidemiologie .....	3
1.2 Žaludeční kryptosporidie savců .....	4
1.2.1 <i>Cryptosporidium andersoni</i> Lindsay a kol., 2000 .....	4
1.2.2 <i>Cryptosporidium muris</i> Tyzzer, 1907.....	5
1.3 Imunitní odpověď hostitele při kryptosporidióze.....	7
1.3.1 Přírozená imunita.....	7
1.3.2 Diferenciace k buněčné nebo humorální imunitě .....	8
1.3.3 Imunita zprostředkovaná T-lymfocyty .....	8
1.3.3.1 Úloha T-lymfocytů ve vývoji protektivní imunity .....	8
1.3.3.2 T-cell receptor (TCR) $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ .....	9
1.3.3.3 CD4+ a CD8+ T-lymfocyty.....	10
1.3.3.4 Intraepiteliální lymfocyty .....	11
1.3.3.5 Paměťové T-lymfocyty.....	12
1.3.4 Cytokinová kontrola imunitní odpovědi .....	12
2. CÍLE PRÁCE.....	14
3. MATERIÁL A METODIKA.....	15
3.1 Materiál.....	15
3.1.1 Paraziti .....	15
3.1.2 Experimentální zvířata.....	15
3.2 Metody .....	15
3.2.1 Purifikace oocyst.....	15
3.2.2 Průběh experimentu .....	17
3.2.3 Parazitologické vyšetření.....	18
3.2.4 Histologické vyšetření .....	19
3.2.5 Imunofluorescenční test.....	21

3.2.6 Izolace intraepiteálních lymfocytů (IELs) .....	21
3.2.7 Izolace splenocytů.....	22
3.2.8 Průtoková cytometrie (Fluorescent activated cell cytometer/cytometry, FACC).....	23
3.2.9 Detekce cytokinů .....	25
3.2.10 Statistické zpracování .....	27
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Experimentální infekce BALB/c myši <i>Cryptosporidium muris</i> CB03 a TS03.....</b>	<b>28</b>
4.1.1 Primární infekce.....	28
4.1.1.1 Průběh infekce .....	28
4.1.1.2 Vyšetření žaludečních IELs .....	29
4.1.1.3 Vyšetření splenocytů a detekce cytokinů.....	29
4.1.2 Reinfekce .....	31
4.1.2.1 Průběh infekce .....	31
4.1.2.2 Vyšetření žaludečních IELs .....	32
4.1.2.3 Vyšetření splenocytů a detekce cytokinů.....	32
<b>4.2 Experimentální infekce BALB/c myši <i>Cryptosporidium andersoni</i> LI03 .....</b>	<b>33</b>
4.2.1 Primární infekce.....	33
4.2.1.1 Průběh infekce .....	33
4.2.1.2 Vyšetření žaludečních IELs .....	33
4.2.1.3 Vyšetření splenocytů a detekce cytokinů.....	33
<b>5. DISKUSE .....</b>	<b>35</b>
<b>6. ZÁVĚRY.....</b>	<b>39</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>40</b>

# 1. ÚVOD

## 1.1 Biologie rodu *Cryptosporidium*

### 1.1.1 Systematika a hostitelská specifita

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření jednobuněční intracelulární oportunní paraziti infikující gastrointestinální trakt (GIT) ryb, plazů, ptáků i savců včetně člověka a hospodářských či domácích zvířat (O'Donoghue 1995).

Rod *Cryptosporidium* je považován za jednu ze základních linií kmene Apicomplexa, původně patřící do třídy Coccidea (Corliss 1994, Fayer a kol. 1997). V současné době je rod *Cryptosporidium* řazen do třídy Gregarinea (Carreno a kol. 1999) na základě společné nepřítomnosti plastidového genomu (Zhu a kol. 2000) a antigenní příbuznosti zjištěné pomocí monoklonálních protilátek (Bull a kol. 1998).

První zdokumentovaná zmínka o kryptosporidiích pochází z roku 1907 (Tyzzer 1907). Druh nazvaný *Cryptosporidium muris* byl nalezen ve žlázkaté části žaludku myši a k detailnímu popsání všech morfologických stádií došlo v roce 1910 (Tyzzer 1910). O dva roky později byl popsán další druh v tenkém střevě laboratorní myši a pojmenován *C. parvum* (Tyzzer 1912). Od té doby byly popsány další druhy patřící do rodu *Cryptosporidium*, jejichž seznam je uveden v Tabulce 1.

V rámci rodu *Cryptosporidium* lze rozlišovat dvě monofyletické, morfologicky odlišné linie podle lokalizace oocyst v hostiteli – žaludeční a střevní kryptosporidie (Xiao a kol. 2004). Druhy infikující žaludek mají větší oválné oocysty (např. *C. andersoni* 7,4×5,5 μm; Lindsay a kol. 2000), kryptosporidie s lokalizací ve střevě mají oocysty menší a kulaté (např. *C. parvum* 5×4,5 μm; Tyzzer 1912). Výjimku tvoří *C. baileyi* infikující ptáky, který má morfologii podobnou žaludečním kryptosporidiím, ale jeho lokalizace je v dýchacím ústrojí a v burze Fabricii (Current a kol. 1986, Morgan a kol. 2001).

**Tabulka 1.** Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*

<b>Druh</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Lokalizace</b>
<i>C. andersoni</i> Lindsay a kol., 2000	skot	slez
<i>C. baileyi</i> Current a kol., 1986	drůbež	bursa Fabricii
<i>C. bovis</i> Fayer a kol., 2005	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i> Fayer a kol., 2001	psi	tenké střevo
<i>C. fayeri</i> Ryan a kol., 2008	klokani	střevo
<i>C. felis</i> Iseki, 1979	kočky	tenké střevo
<i>C. fragile</i> Jirků a kol., 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan a kol., 2002	člověk	tenké střevo
<i>C. galli</i> Pavlásek, 1999	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. meleagridis</i> Slavin, 1955	ptáci	tenké střevo
<i>C. molnari</i> Alvarez-Pellitero a Sitjá-Bobadilla, 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i> Tyzzer, 1907	hlodavci	žaludek
<i>C. parvum</i> Tyzzer, 1912	savci	tenké střevo
<i>C. ryanae</i> Fayer a kol., 2008	skot	střevo
<i>C. saurophilum</i> Koudela a Modrý, 1998	ještěrky	žaludek, tenké střevo
<i>C. scophthalmi</i> Alvarez-Pellitero a kol., 2004	platýs	střevo
<i>C. serpentis</i> Levine a kol., 1980	plazi	žaludek
<i>C. suis</i> Ryan a kol., 2004	prasata	žaludek, tlusté střevo
<i>C. varanii</i> Pavlásek a kol., 1995	plazi	žaludek, tenké střevo
<i>C. wrairi</i> Vetterling a kol., 1971	morčata	tenké střevo

### 1.1.2 Vývojový cyklus

Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní (Fayer a kol. 1997, Thompson a kol. 2005) a probíhá v GIT hostitele (Current a Blagburn 1990). Oocysty jsou přenášeny fekálně-orální cestou a po jejich spolknutí (popř. inhalaci) dochází k jejich excystaci díky působení žluči proteolytických enzymů ve střevě (serinové a cysteinové endopeptidázy, aminopeptidázy) (Chappell a kol. 2003). Z oocysty uvolnění sporozoiti infikují střevní epitel. Zde se inkorporují do buněk, kde jsou lokalizovány extracytoplazmaticky, a mění se na trofozoity, kteří se uzavírají do tzv. parazitoforní vakuoly (Elliott a kol. 2001). Zde dochází k dělení jádra a asexuálnímu rozmnožování, merogonii. Postupně vznikají dva typy merontů (Current a kol. 1986) s výjimkou *C. baileyi*, který tvoří tři typy merontů (Current a kol. 1986).

Meronti I. typu se dále množí asexuálně, zatímco meronti II. typu vstupují do sexuální fáze (gametogonie). Vytváří dvě sexuální stádia, vícejaderné mikrogamonty, které dále vytváří mikrogametocyty, a jednojaderné makrogamonty, které dávají vznik makrogametocytům. Z mikrogametocytů se uvolňují mikrogamety, které migrují a



splynou s makrogametami vzniklými přeměnou makrogametocytů a vzniká zygota. Zygota prochází fází sporogonie (endogenní sporulace), kdy se mění v oocystu, ve které se tvoří čtyři sporozoiti. Vzniklé oocysty jsou dvojího typu – tenkostěnné a silnostěnné. Silnostěnné oocysty (80%) opouští tělo hostitele trusem a jsou schopny infikovat další hostitele. Tenkostěnné oocysty excystují v původním hostiteli a infikují další buňky GIT (Current 1988).

Vývojový cyklus žaludečních kryptosporidií je odlišný, protože pozřené (popř. inhalované) oocysty excystují již v žaludku, ovšem podrobnosti dosud nejsou známy.

### **1.1.3 Klinické projevy kryptosporidiózy a epidemiologie**

Klinické projevy kryptosporidiózy se odvíjí od imunitního stavu hostitele a od lokalizace parazita v hostiteli. U imunokompetentních jedinců je hlavním symptomem infekce kryptosporidiemi s lokalizací v tenkém střevě akutní vodnatý průjem, který je způsoben poškozením střevních buněk (Sterling a kol. 1986). Dalšími příznaky mohou být křečovitě bolesti břicha, nechutenství, zvracení, horečka, malátnost, únava a zvýšené pocení (Fayer 2003, Thompson 2005). Při nákaze střevními kryptosporidiemi s lokalizací v tlustém střevě probíhá onemocnění bez typických symptomů (Vítovec a kol. 2006). Kryptosporidióza způsobená žaludečními kryptosporidiemi probíhá asymptomaticky, pouze v několika málo případech byly popsány příznaky spojené s kachexií (Anderson 1987, Pospischil a kol. 1987).

U imunodeficientních jedinců bývá onemocnění chronické, infekce často diseminuje do dalších orgánů, např. do respiračního traktu, slinivky, močového měchýře a žlučovodů (Current a Garcia 1991, Fayer a kol. 1997). Konečný průběh infekce je závislý na stupni imunodeficiency (Flanigan a kol. 1992); bez vhodné terapie může dojít následkem dehydratace a malnutrice až ke smrti, obzvláště u HIV pozitivních pacientů (Navin a Hardy 1987, Blanshard a kol. 1992).

Možnost přenosu oocyst je omezena hostitelskou specifitou parazita. K přenosu oocyst může dojít, buď přímým kontaktem s nakaženým jedincem, nebo po pozření kontaminované potravy či vody z fekáliemi znečištěné půdy (Fayer a kol. 2000).

Oocysty jsou velmi odolné a mají vysokou životaschopnost, jsou schopny přežívat ve venkovní vodě až 140 dní (Ramirez a kol. 2004), a odolávají i klasickým dezinfekčním úpravám vody, jako je chlorování (Dolejš 2004).

## 1.2. Žaludeční kryptosporidie savců

### 1.2.1. *Cryptosporidium andersoni* Lindsay a kol., 2000

Kryptosporidie osidlující žlázy slezu u skotu (*Bos taurus*) popsali poprvé Upton a Current (1985). Protože oocysty kryptosporidií získané z trusu skotu jsou morfologicky shodné s *C. muris*, které Anderson (1991) vyizoloval z trusu velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*), byly tyto pro myši neinfekční kryptosporidie nazvány *C. muris*-like. Na základě molekulární analýzy a hostitelské specifity byly tyto dva izoláty odlišeny, druh infikující slez skotu byl pojmenován jako *C. andersoni* (Lindsay a kol. 2000), druhu infekčnímu pro myši zůstal název *C. muris*. Vnímavost myších hostitelů k *C. muris* byla považována za spolehlivý znak k odlišení obou druhů žaludečních kryptosporidií až do popsání *C. andersoni* Kawatabi, který se ukázal být infekční pro myši (Matsubayashi a kol. 2004, Koyama a kol. 2005, Matsubayashi a kol. 2005).

Souhrnný seznam hostitelů *C. andersoni* je uveden v Tabulce 2.

**Tabulka 2.** Přehled hostitelů *Cryptosporidium andersoni*

<b>Hostitel</b>	<b>Přirozená infekce</b>
<b>Primates</b>	
<i>Homo sapiens</i>	Guyot a kol. 2001
<b>Rodentia</b>	
<i>Mastomys coucha</i>	Kváč a kol. 2007*
<i>Mus musculus</i>	Matsubayashi a kol. 2004*
<i>Meriones unguiculatus</i>	Koudela a kol. 1998*
<i>Meriones tristrami</i>	Ondráčková a kol. 2007*
<i>Gerbillus gerbillus</i>	Ondráčková a kol. 2007*
<i>Sekeetamys calurus</i>	Ondráčková a kol. 2007*
<i>Marmonta bobac</i>	Ryan a kol. 2003
<b>Artiodactyla</b>	
<i>Camelus bactrianus</i>	Anderson 1991
<i>Bison bonasus</i>	Ryan a kol. 2003
<i>Bos taurus</i>	Lindsay a kol. 2000
<i>Ovis aries</i>	Kváč a kol. 2008*

\* Experimentální infekce

V rámci druhu *C. andersoni* je rozlišováno několik kmenů/izolátů získaných z různých hostitelů a lišících se v molekulární charakteristice v části malé ribozomální podjednotky (SSU) (Tabulka 3).

**Tabulka 3.** Přehled známých kmenů/izolátů *C. andersoni* a *C. muris* a jejich variabilita v části malé ribozomální podjednotky (SSU)

Druh/izolát	Hostitel	Číslo v GenBank	Lokalizace mutací v genu SSU rRNA *										
			40	52	410	422	429-31	443	462	467-69	521	608	
<i>C. muris</i> RN 66	<i>Rattus norvegicus</i>	EU24505	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-	
<i>C. muris</i> 22	<i>Camelus bactrianus</i>	AF093497	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-	
<i>C. muris</i> 34	<i>Procapra capensis</i>	AF093498	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-	
<i>C. muris</i> CB03	<i>Camelus bactrianus</i>	EU245044	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-	
<i>C. muris</i> TS03	<i>Tachyoryctes splendens</i>	EU245043	T	A	C	T	TA	A	T	TTA	A	-	
<i>C. muris</i>	<i>Felis catus</i>	DQ836341	C	G	C	T	TA	A	T	-	-	-	
<i>C. muris</i>	<i>Canis familiaris</i>	EU549784	?	?	C	T	TA	A	T	-	-	-	
<i>C. muris</i>	<i>Phoca hispida</i>	EU156446	C	A	C	T	TA	G	A	-	-	-	
<i>C. muris</i> Kawatabi	<i>Apodemus speciosus</i>	AY642591	T	A	C	C	AT	A	-	-	-	G	
<i>C. muris</i> GC07	<i>camelopardalis reticulata</i>	FJ883577	C	C	T	C	AT	A	-	-	-	-	
<i>C. andersoni</i> Kawatabi	<i>Bos taurus</i>	AB089285	C	C	T	C	AT	A	-	-	-	-	
<i>C. andersoni</i> LI03	<i>Bos taurus</i>	EU245042	C	C	T	C	AT	A	-	-	-	-	
<i>C. andersoni</i> 21	<i>Ovis aries</i>	FJ608605	C	A	C	T	TA	A	T	-	-	-	

\* Pozice nukleotidů v alignmentu. Pozice v jednotlivých sekvencích se liší kvůli gapům vzniklých v alignovaných sekvencích (781 bp).; ? chybějící data; - gap

Infekce *C. andersoni* není obecně provázena klinickými příznaky, pouze u skotu může být příčinou nižších váhových přírůstků a menší produkci mléka (Esteban a Anderson 1995).

Při morfologickém studiu byla pozorována velikost oocyst *C. andersoni* především 7,4 (6,6-7,9) × 5,6 (5,3-6,5) μm (Upton a Current 1985). Lindsay a kolegové (2000) pak popisují také existenci větších oocyst 8,4 (6,5-10) × 6,2 (4,0-8,0) μm.

### 1.2.2 *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907

*Cryptosporidium muris* byla vůbec první popsanou kryptosporidií (Tyzzer 1907). Typickými hostiteli *C. muris* jsou hlodavci (Rodentia), hlavně z čeledi myšovitých (Muridae). Ovšem další studie, včetně experimentálních, ukázaly velké množství rozličných hostitelů, jejichž přehled je uveden v Tabulce 4.

**Tabulka 4.** Přehled hostitelů *Cryptosporidium muris*

<b>Hostitel</b>	<b>Přirozená infekce</b>
<b>Primates</b>	
<i>Homo sapiens</i>	Katsumata a kol. 2000
<i>Macaca fascicularis</i>	Dubey a kol. 2002**
<b>Rodentia</b>	
<i>Cavia porcellus</i>	Aydin a Özkul 1996*
<i>Dolichotis patagonum</i>	Xiao a kol. 2004
<i>Macrotis lagotis</i>	Warren a kol. 2003
<i>Tachyoryctes splendens</i>	Kváč a kol. 2008
<i>Cla hrionomys glaerolus</i>	Chalmers a kol. 1997
<i>Microtus brandtii</i>	Hoffmanová (nepublikováno)*
<i>Mesocricus auratus</i>	Rhee a kol. 1999*
<i>Phodopus roborovskii</i>	Pavlásek a Lávička 1995
<i>Acomys cahirinus</i>	Kváč (nepublikováno)*
<i>Apodemus sylvaticus</i>	Chalmers a kol. 1997
<i>Mastomys nataliensis</i>	Neumayerová a Koudela 2008*
<i>Mastomys coucha</i>	Kváč a kol. 2007*
<i>Mus domesticus</i>	Chalmers a kol. 1997
<i>Mus musculus</i>	Tyzzer 1907
<i>Rattus norvegicus</i>	Iseki a kol. 1989
<i>Meriones unguiculatus</i>	Koudela a kol. 1998*
<i>Eutamias sibiricus</i>	Hůrková a kol. 2003
<i>Sciurus caroliensis</i>	Feng a kol. 2007
<b>Lagomorpha</b>	
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Aydin a Özkul 1996*
<b>Carnivora</b>	
<i>Felis catus</i>	Iseki a kol. 1989
<i>Canis familiaris</i>	Aydin a Özkul 1996*, Lupo a kol. 2008
<i>Canis latrans</i>	Trout a kol. 2006
<b>Pinnipedia</b>	
<i>Phoca hispida</i>	Santín a kol. 2005
<b>Hyracoidea</b>	
<i>Procravia capensis</i>	Esteban a Anderson 1995
<b>Artiocadtyla</b>	
<i>Camelus bactrianus</i>	Ryan a kol. 2005
<i>Capra hircus</i>	Rhee a kol. 1998
<i>Oreamnos americanus</i>	Valigurová a kol. 2007
<i>Gazella cuvieri</i>	Pospischil a kol. 1987**
<i>Ovis aries</i>	Rhee a kol. 1998, Ryan a kol. 2005
<i>Sus crofa</i>	Zintl a kol. 2007
<i>Giraffa camelopardalis reticulata</i>	Kodádková 2007
<i>Odocoileus heminus</i>	Deng a Cliver 1999**

\* Experimentální infekce

\*\* Popsaný druh kryptosporidie byl označen jako *C. muris*-like a dosud není jasno, zda se jedná o druh *C. muris* nebo *C. andersoni*

Velikost plně vysporulovaných oocyst *C. muris* uvádí Iseki a kolegové (1986) 8,4 (7,5-9,8) × 6,3 (5,5-7,0) μm. Velikost oocyst izolátů *C. muris* CB03 a TS03 použitých v této práci naměřil Kváč (nepublikováno) 8,9 (8,2-9,3) × 5,9 (5,5-6,6) (CB03) a 8,8 (8,1-9,2) × 6,2 (5,7-6,9) μm (TS03).

V rámci druhu *C. muris* je také rozlišováno několik kmenů/izolátů, lišících se molekulární charakteristikou v části malé ribozomální podjednotky (SSU), získaných z různých hostitelů (Tabulka 3).

## **1.3 Imunitní odpověď hostitele při kryptosporidiióze**

### **1.3.1 Přirozená imunita**

Složky vrozené imunity jako první registrují patologické změny v organismu a jsou zodpovědné za prvotní nespecifickou obrannou odpověď hostitele. Jednou z hlavních složek jsou NK (natural killer) buňky, které jsou charakterizovány produkcí cytokinů vyvolávajících zánět a stimulujících antimikrobiální obranu buňkami v místě infekce. Rovněž mohou působit cytotoxicky na patologicky změněné buňky organismu. Produkované cytokiny aktivují makrofágy, neutrofile a eosinofily. Produktem všech těchto buněk jsou mediátory zánětu, který patří mezi hlavní efekторы nespecifické imunity. Mezi složky nespecifické imunity rovněž řadíme neimunologické buňky, jako jsou například epiteliální buňky, které rovněž disponují schopností sekrece cytokinů. Výhodou nespecifické imunity je rychlost odpovědi, která se řádově počítá na minuty, avšak tento typ imunity nedisponuje tvorbou paměťových buněk (Janeway a kol. 2005).

Při infekci kryptosporidiiemi hrají podstatnou roli NK buňkami sekretované cytokiny, za klíčový je považován IFN-γ (viz 1.3.4). Rovněž cytotoxická aktivita NK buněk je považována za jeden z účinných obranných mechanismů při kryptosporidiióze. Při infekci myši s tzv. beige mutation, která je charakterizována nedostatečnou cytotoxickou aktivitou NK buněk (Roder a Duwe 1979) byl pozorován těžší průběh infekce *C. parvum* oproti zdravým myším (Enriquez a Sterling 1991).

Protože kryptosporidie infikují přímo epiteliální buňky, významná je při infekci produkce chemokinů, které aktivují zánětlivou odpověď. Při infekci *C. parvum* byl zjištěn důležitý chemokin PGE<sub>2</sub>, který stimuluje produkci mucinu a reguluje T-buněčnou odpověď na infekci (Laurent a kol. 1998). Další produkované chemokiny ovlivňují migraci imunitních buněk do střeva. Navíc antimikrobiální peptidy, jako jsou např. defensiny, hrají roli při vývoji adaptivní imunity (Bowdish a kol. 2006).

Role eosinofilů, neutrofilů a monocytů, popř. makrofágů, při kryptosporidiové infekci není dosud zcela objasněna, ačkoliv bylo popsáno zvýšení periferních monocytů a makrofágů během imunitní odpovědi na infekci *C. muris* (Miller a kol. 2007). Rovněž během střevní kryptosporidiózy myši byla pozorována masivní migrace eosinofilů, neutrofilů a makrofágů do místa infekce (Svezhova 1997). Na základě těchto poznatků se předpokládá účast těchto buněk v imunitní odpovědi při infekci kryptosporidiiemi.

Funkce komplementu v imunitní odpovědi během kryptosporidiové infekce je zatím také neznámá, pouze studie Kelly a kolegů (2000) prokázala adhezi molekul účastnících se aktivace komplementu (mannose binding lectin (MBL) a C4) k povrchu sporozoitů, což naznačuje, že MBL může zamezovat připojení parazita k epiteliálním buňkám.

### **1.3.2 Diferenciace k buněčné nebo humorální imunitě**

V závislosti na povaze antigenu indikují CD4+ T<sub>H</sub>-lymfocyty (helper cells) buď T<sub>H1</sub> nebo T<sub>H2</sub> odpověď. Tato diverzita je způsobena rozdílnou sekrecí specifických cytokinů produkovaných T-lymfocyty a antigen prezentujícími buňkami (APC). Při T<sub>H1</sub> odpovědi se aktivuje buněčná imunita a klíčovým cytokinem je IL-2, který spouští proliferaci T<sub>H</sub> i T<sub>C</sub>-lymfocytů (cytotoxic cells). Dalším důležitým cytokinem je IL-12 produkovaný makrofágy a dendritickými buňkami, který indukuje produkci IFN $\gamma$  T-lymfocyty. Zároveň se u tohoto typu imunitní odpovědi rozvíjí aktivita CD8+ T<sub>C</sub>-lymfocytů (viz 1.3.3.1). T<sub>H2</sub> odpověď je spojená s produkcí IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13 a aktivuje humorální imunitu, založenou na sekreci protilátek B-lymfocyty (Janeway a kol. 2005). Ačkoliv se při infekci kryptosporidiiemi vyskytují v séru hostitele protilátky vůči kryptosporidiiím (Ungar a kol. 1986, Hill a kol. 1990, Peeters a kol. 1992), bylo zjištěno, že humorální imunita má jen omezenou schopnost redukovat infekci a rozhodně není hlavním faktorem eliminace parazita a vytvoření rezistence hostitele při infekci kryptosporidiiemi (Taghi-Kilani a kol. 1990, McDonald a kol. 1992, Chen a kol. 2003).

### **1.3.3 Imunita zprostředkovaná T-lymfocyty**

#### **1.3.3.1 Úloha T-lymfocytů ve vývoji protektivní imunity**

Morfologická studie prokázala, že během infekce střevními kryptosporidiiemi docházelo k poškození sliznice střeva (atrofie mikrovilů a hyperplázie krypt), což může

být důkaz patologického působení T-lymfocytů (MacDonald a Spencer 1992). Infekce *C. parvum* vedla k významnému zvýšení subpopulací T-lymfocytů v mukózním epitelu (Boher a kol. 1994, Abrahamsen a kol. 1997). U myši bez thymu vedla infekce *Cryptosporidium* spp. k chronické infekci a její průběh byl často letální (Heine a kol. 1984). Chronické infekce dospělých SCID a nude myši byly pozorované při nákazách *C. muris* a *C. parvum* (Ungar a kol. 1990, Mead a kol. 1991, McDonald a kol. 1992). Deplece T-lymfocytů z imunokompetentních myši zabránila vyléčení z infekce *C. muris* (McDonald a kol. 1992). Výsledky těchto experimentů vedou k závěru, že buněčná imunita a T-lymfocyty jsou hlavním ochranným faktorem proti kryptosporidiovým infekcím.

### 1.3.3.2 T-buněčný receptor (cell receptor, TCR) $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$

T-lymfocyty vystavují na svém povrchu dva typy TCR, TCR $\alpha\beta$  nebo TCR $\gamma\delta$ . T-lymfocyty s TCR $\alpha\beta$  tvoří většinu populace a jsou hlavním efektozem v buněčné imunitní odpovědi na infekci (Janeway a kol. 2005). Naproti tomu, T-lymfocyty s receptorem TCR $\gamma\delta$  jsou běžné v epitelích některých savců, hlavně hlodavců, ale celkově tvoří pouze 5-10 % lymfocytární populace (Hayday a Tigelaar 2003, Born a kol. 2006). Funkce TCR $\gamma\delta$  T-lymfocytů není zcela objasněna, ovšem je známo, že může být spojena s vrozenou či adaptivní imunitou, s prezentací antigenu dalším T-lymfocytům nebo může regulovat záněty (Born a kol. 2006).

Rozdílná role TCR $\alpha\beta$  a TCR $\gamma\delta$  T-lymfocytů v imunitě proti infekci *C. parvum* byla sledována na transgenních myších s nedostatkem jednoho nebo druhého typu TCR. Prokázalo se, že dospělé myši s nedostatkem TCR $\gamma\delta$  byly stejně odolné k infekci jako zdravé myši, infikované myši s nedostatkem TCR $\alpha\beta$  měly ale prodlouženou patentní periodu (Waters a Harp 1996). Následkem podání anti-TCR $\gamma\delta$  protilátek myším s nedostatkem TCR $\alpha\beta$  T-lymfocytů se po infikování *C. parvum* výrazně zhoršil průběh infekce (Eichleberger a kol. 2000). U skotu infikovaného *C. parvum* byly hladiny všech subpopulací IELs ve střevě zvýšené oproti neinfikovanému skotu (TCR $\gamma\delta$  T-lymfocyty se v průměru zvýšily o 70 %, TCR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty o 150 % a TCR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty o 60 %) a korespondující s množstvím vylučovaných oocyst (Abrahamsen a kol. 1997)

### 1.3.3.3 CD4+ a CD8+ T-lymfocyty

T-lymfocyty TCR $\alpha\beta$  exprimují na svém povrchu ještě další znaky (CD, cluster of differentiation), podle kterých jsou rozlišovány jednotlivé typy těchto lymfocytů. CD4+ T-lymfocyty jsou prekurzory T<sub>H</sub> lymfocytů, jsou aktivovány rozpoznáním antigenu prezentovaného MHC II (major histocompatibility complex). MHC jsou glykoproteiny nacházející se na povrchu různých buněk organismu. MHC II jsou exprimovány na APC, jako jsou dendritické buňky, monocyty, makrofágy a B-lymfocyty (Gao a kol. 2002, Janeway a kol. 2005). CD4+ T-lymfocyty jsou charakterizovány produkcí cytokinů, které dále řídí průběh imunitní odpovědi. Druhý typ TCR $\alpha\beta$  T-lymfocytů, exprimující na svém povrchu molekulu CD8, rozpoznává antigen prezentovaný MHC I (prezentován všemi jadernými buňkami organismu) (Gao a kol. 2002, Janeway a kol. 2005). CD8+ T-lymfocyty jsou zodpovědné za přímé zabíjení infikovaných buněk cytotoxickou cestou.

Důkazy o protektivní roli CD4+ T-lymfocytů přinesla řada experimentů. Myši s nedostatkem MHC II se nebyly schopny vyléčit z infekce *C. parvum* (Aquirre a kol. 1994). Podání protilátek proti CD4+ antigenu významně zhoršilo průběh infekce (Ungar a kol. 1991, McDonald a kol. 1994). Depleční pokusy na SCID myších ukázaly, že myši byly po přidání suspenze lymfocytů schopny kontrolovat infekci, ovšem když byly CD4+ T-lymfocyty ze suspenze odstraněny, myši nebyly schopny se vyléčit (Chen a kol. 1993, McDonald a kol. 1994).

Význam CD8+ T-lymfocytů pro zvládnutí kryptosporidiové infekce dosud není objasněn, ovšem tyto lymfocyty nejsou považovány za nezbytné a při vyléčení kryptosporidie pravděpodobně nehrají zásadní roli. K těmto závěrům vedly mnohé experimenty. Myši s deficience MHC I měly srovnatelnou hladinu infekce s neinfikovanými myši (Acquirre a kol. 1994). Podání suspenze splenocytů zbavené CD8+ T-lymfocytů SCID myším infikovaným *C. parvum* vedlo k jejich úplnému uzdravení (Chen a kol. 1993). Podobná studie jiných autorů avšak ukázala prodloužení patentní periody u takto rekonstituovaných myší ve srovnání s kontrolními imunokompetentními myši (McDonald a Bancroft 1994). Ošetření imunokompetentních myší infikovaných *C. parvum* anti-CD8 a anti-CD4 protilátkami prokázalo výrazné zvýšení intenzity infekce oproti infikovaným imunokompetentním myším, kterým protilátky podány nebyly. Podání protilátek anti-CD4 sice intenzitu infekce zvýšilo oproti infikovaným myším, kterým protilátky podány nebyly, avšak ne v takovém rozsahu, jako u myší po podání obou anti-CD8 a anti-CD4 protilátek.



Naproti tomu, podání samotných anti-CD8 protilátek nemělo na průběh infekce žádný vliv (Ungar a kol. 1990). Stejných výsledků bylo dosaženo i pomocí experimentu s *C. muris*, kde podání anti-CD8 protilátek sice mírně zvýšilo intenzitu infekce, ovšem podání anti-CD4 protilátek zvýšilo intenzitu infekce mnohem výrazněji (McDonald a kol. 1994).

Překvapivě, studie infekce myši *C. parvum* prokázala výraznou migraci CD8+ T-lymfocytů do sliznice tenkého střeva a jejich možnou roli ve vyléčení z této infekce díky sekreci IFN- $\gamma$  CD8+ T-lymfocyty (Leav a kol. 2005).

#### 1.3.3.4 Intraepiteliální lymfocyty

Pokud je infekce situována do epiteliálních povrchů, účastní se imunitní odpovědi tzv. intraepiteliální lymfocyty (IELs), které jsou představovány hlavně T-lymfocyty, jež jsou z větší části zastoupeny TCR $\gamma\delta$  a CD8+ T-lymfocyty; CD4+ T-lymfocyty jsou zde přítomny v menší míře (McDonald 1999). Funkce těchto buněk dosud není zcela objasněna, ovšem je známo, že hlavní imunitní roli zde hrají CD8+ T-lymfocyty, které mohou cytotoxickou cestou zabít infikované epiteliální buňky. Zároveň IELs mohou regulovat zánětlivou odpověď při infekci a v tomto procesu mohou hrát významnou roli TCR $\gamma\delta$  T-lymfocyty (Hayday a Tigelaar 2003).

Kryptosporidiová infekce je charakterizována napadením epiteliálních buněk GIT a důležitost IELs, které s největší pravděpodobností hrají podstatnou roli při rozvoji imunitní odpovědi při kryptosporidioze, byla potvrzena řadou experimentálních studií. Při infekci myši střevním druhem *C. parvum* došlo ke zvýšení počtu TCR $\gamma\delta$  T-lymfocytů v IELs (Eichelberger a kol. 2000). Studie s *C. muris* prokázaly, že SCID myši, kterým byly podány střevní IELs z imunizovaných imunokompetentních myši byly schopny zvládnout infekci. Vyšetření IELs izolovaných z těchto SCID myši také prokázalo vyšší zastoupení CD8+ T-lymfocytů ve srovnání s CD4+ T-lymfocyty. Ovšem při depleci a následném adoptivním přenosu střevních IELs bylo prokázáno, že imunita je zajištěna pouze CD4+ T-lymfocyty (McDonald a kol. 1996).

Také při experimentální infekci dobytka druhem *C. parvum* bylo pozorováno zvýšené množství intraepiteliálních CD4+ a CD8+ T-lymfocytů ve střevě (Fayer a kol. 1998), stejně tak během vyléčení (Wyatt a kol. 1999). Při reinfekci dobytka byla rovněž sledována zvýšená migrace pouze CD8+ T-lymfocytů do střevního epitelu (Abrahamsen a kol. 1997).

### 1.3.3.5 Paměťové T-lymfocyty

Při vývoji imunitní odpovědi, ať už buněčné nebo humorální, se diferencuje část lymfocytů v tzv. paměťové, které zůstávají v organismu různě dlouhou dobu a hrají roli při reinfekcích (Janeway a kol. 2005).

Tvorba paměťových T-lymfocytů byla potvrzena experimenty s reinfekcemi myších hostitelů. Velmi silná a rychlá buněčná imunitní odpověď se vyvinula při reinfekci imunokopetentních myší do 30 dnů po vyléčení z primární infekce ve srovnání s kontrolními myšmi (McDonald a kol. 1992). Studie založená na adoptivním přenosu splenocytů z myši infikované před více než třemi měsíci do SCID myši prokázala ochranný efekt, který byl zajištěn hlavně CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty (McDonald a kol. 1994). Protektivní imunita byla rovněž přenesena pomocí IELs z myší infikovaných před 8 měsíci, avšak tyto buňky měly menší ochranný efekt než IELs získané z myší pouze 3 měsíce po infekci, což ukázalo, že imunologická paměť T-lymfocytů se po kryptosporidiové infekci časem zeslabuje (McDonald a kol. 2000).

### 1.3.4 Cytokinová kontrola imunitní odpovědi

Jako nejdůležitější cytokin hrající roli ve vyléčení kryptosporidiózy je považován IFN- $\gamma$ . Producentem IFN- $\gamma$  při kryptosporidióze jsou CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty (Harp a kol. 1994, Tilley a kol. 1995), CD8<sup>+</sup> subpopulace IELs (Leav a kol. 2005) a pravděpodobně i NK buňky (McDonald a kol. 2000). Význam IFN- $\gamma$  potvrzuje studie, při které myši deficientní pro IFN- $\gamma$  měly mnohem těžší průběh infekce *C. parvum* než kontrolní myši (Hayward a kol. 2000). Pomocí RT-PCR a ELISA bylo zjištěno, že infekce *C. parvum* také stimulovala tvorbu mRNA a následnou expresi proteinu IFN- $\gamma$  ve střevě myši (Kapel a kol. 1996, Urban a kol. 1996). Hlavním producentem IFN- $\gamma$  během kryptosporidiózy byly označeny CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty. Stimulace splenocytů z infikovaných myší antigenem z oocyst kryptosporidií indukovala proliferaci CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů a produkci IFN- $\gamma$  (Harp a kol. 1994, Tilley a kol. 1995). Další důkaz přinesl experiment s adoptivním přenosem IELs do SCID myši, kdy pro vyléčení z infekce *C. muris* byla zapotřebí současná přítomnost CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů a produkce IFN- $\gamma$  (McDonald a kol. 1996, Culshaw a kol. 1997). Naproti tomu, opačného výsledku bylo dosaženo v případě infekce myši *C. parvum* (Leav a kol. 2005), která dokazuje, že IFN- $\gamma$  potřebný pro vyléčení z infekce je produkován v místě infekce migrujícími CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty. Infekcí skotu bylo také

dokázáno, že pro vyléčení je klíčová produkce IFN- $\gamma$  IELs (Fayer a kol. 1998, Wyatt a kol. 2001). Terapeutický efekt IFN- $\gamma$  během kryptosporidiózy ovšem nebyl pozorován (Kuhls a kol. 1994, McDonald a Bancroft 1994).

Imunitní odpovědi během kryptosporidiózy se také kromě IFN- $\gamma$  účastní další T<sub>H1</sub> cytokiny, jako je např. IL-2, který ovšem nebyl sledán jako nezbytný pro vyléčení hostitele (Ungar a kol. 1991, Enriquez a Sterling 1993, McDonald a Bancroft 1994, Tilley a kol. 1995). Jinými experimenty byla prokázána velmi silná spojitost IFN- $\gamma$  a dalšího T<sub>H1</sub> cytokinu, IL-12, který zmírňuje průběh infekce a zároveň je zodpovědný za aktivaci produkce IFN $\gamma$  (Urban a kol. 1996, McDonald a kol. 2004, Ehigiator a kol. 2005).

## 2. CÍLE PRÁCE

- Sledovat migraci CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů do žaludku a popsat změny v množství těchto lymfocytů ve slezině při primární infekci a reinfekci *Cryptosporidium muris* CB03 a TS03
- Analyzovat produkci cytokinů IL-10 a INF- $\gamma$  v *ex-vivo* kulturách splenocytů v průběhu primární infekce a reinfekce
- Srovnat imunitní odpověď BALB/c myši při infekci dvěma různými izoláty *C. muris* (CB03 a TS03)
- Výsledky z bodů 1-3 porovnat s imunitní odpovědí myši proti *Cryptosporidium andersoni* LI03.

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Paraziti

- *Cryptosporidium muris* izolát TS03 získaný z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyorectes splendens*). Udržován v laboratoři v kryse malé (*Mastomys coucha*).
- *Cryptosporidium muris* izolát CB03 získaný z přirozeně infikovaného velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*). Udržován v laboratoři v kryse malé (*M. coucha*).
- *Cryptosporidium andersoni* izolát LI03 získaný z tura domácího (*Bos taurus*).

#### 3.1.2 Experimentální zvířata

Imunokompetentní myši BALB/c (Charles River, Germany).

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Purifikace oocyst

Trus s oocystami *C. muris* CB03, TS03 nebo *C. andersoni* LI03 byl zhomogenizován v třecí misce, přečištěn na sacharózovém gradientu (Arrowood a Sterling 1987) a následně dočištěn pomocí cesium chloridového gradientu. Pro minimalizaci kontaminace byl purifikát přefiltrován přes sítko s velikostí ok 10 µm a vyčištěné oocysty byly promyty v roztoku 5% chlornanu sodného.

**Sacharózový gradient** (Arrowood a Sterling 1987)

- Použité roztoky a chemikálie:
  - Sheaterův cukerný roztok (259 ml deionizované vody (dH<sub>2</sub>O); 405 g cukru; 7,29 g fenolu)
  - 1 % Tween 20 v PBS (phosphate buffered saline), (1% PBS TWEEN)
- Pracovní Sheaterovy roztoky:
  - roztok A: 1+2 (1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly 1% PBS TWEEN)
  - roztok B: 1+4 (1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly 1% PBS TWEEN)

- Postup:
  - vzorek trusu přecedit přes hrubé sítko
  - 15 ml suspenze oocyst v destilované vodě navrstvit na sacharózové gradienty 30 ml roztoku A a 30 ml roztoku B
  - centrifugovat 30 min při 1370 g a 4 °C
  - odsát horní 1/3 objemu, supernatant přenést do čisté zkumavky a doplnit dH<sub>2</sub>O
  - centrifugovat 20 min při 1370 g a 4 °C
  - 1/3 objemu odsát, objem doplnit dH<sub>2</sub>O a opět centrifugovat 20 min při 1370 g a 4 °C
  - 1/2 objemu odsát, opět doplnit dH<sub>2</sub>O a centrifugovat 20 min při 1370 g a 4 °C
  - pelet s oocystami uchovávat ve tmě při 4 °C v dH<sub>2</sub>O

### **Cesium chloridový gradient**

- Použité roztoky a chemikálie:
  - roztok cesium chloridu (21,07 g CsCl + 100 ml dH<sub>2</sub>O)
  - 10× ředěný PBS (pH 7,2)
- Postup:
  - vzorek trusu po přečištění na sacharózovém gradientu centrifugovat 10 min při 1450 g a 4 °C
  - odebrat supernatant a sediment obsahující oocysty resuspendovat v 0,5 ml PBS
  - do čisté mikrozkušavky přidat 1 ml CsCl a převrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS
  - centrifugovat 3 min při 16 000 g a 20 °C
  - odebrat 1 ml supernatantu s oocystami a naředit v nadbytku PBS
  - centrifugovat 3 min při 16 000 g a 20 °C
  - odebrat supernatant a vzorek opět centrifugovat 3 min při 16 000 g a 20 °C
  - přečištěné oocysty skladovat v dH<sub>2</sub>O při 4 °C

## Odstranění bakterií v suspenzi oocyst pomocí 5% chlornanu sodném

- Použité roztoky a chemikálie:
  - 5% chlornan sodný (Savo)
- Postup:
  - oocysty přečištěné na CsCl gradientu přefiltrovat přes sítko s oky o velikosti 10 µm
  - zkumavku s filtrátem vložit do ledu a přidat 5 ml 5% chlornanu sodného
  - magnetickým míchadlem jemně míchat 15 min
  - vzorek naředit dH<sub>2</sub>O a centrifugovat 20 min při 1370 g a 4 °C, po centrifugaci supernatant odebrat
  - předchozí bod 3× zopakovat, aby došlo k odstranění 5% chlornanu sodného
  - oocysty skladovat v dH<sub>2</sub>O při 4 °C

### 3.2.2 Průběh experimentu

#### Infekce imunokompetentních BALB/c myši *Cryptosporidium muris*

Dvě skupiny myši (každá 39 jedinců) byly perorálně infikovány oocystami *C. muris* izolát TS03 nebo CB03 v počtu  $1 \times 10^6$  oocyst na zvíře. Všechna zvířata byla denně od 1. dne po infekci (DPI) vyšetřována na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu po dobu 42 dnů. Každý sedmý den (7, 14, 21, 28, 35 a 42 DPI) byly tři myši usmrceny zlomením vazy, byly jim odebrány sleziny a žaludky, ve kterých byly detekovány imunologickými metodami subpopulace T-lymfocytů (viz 3.2.6, 3.2.7 a 3.2.8). Histologickými metodami (viz 3.2.4) a imunofluorescenčním testem (viz 3.2.5) byly vyšetřeny žaludeční sliznice na přítomnost oocyst kryptosporidií. Neinfikované myši (negativní kontrola, 3 jedinci / kontrolní den) byly usmrceny a vyšetřeny stejnými metodami 0 DPI a 42 DPI.

Zbylé myši (21 jedinců v každé skupině) byly reinfikovány 90. DPI stejnou dávkou oocyst *C. muris* izolát TS03 nebo CB03 oocyst/myš a byly analyzovány stejnými postupy 0, 3, 5, 7, 11, 14 a 21 dní po reinfekci (DPRI).

#### Infekce imunokompetentních BALB/c myši *Cryptosporidium andersoni*

Skupina 18 myši BALB/c byla perorálně nainfikována oocystami *C. andersoni* LI03 ( $1 \times 10^6$  na zvíře). Jako negativní kontrola bylo použito šest myši

stejného kmene. Pro kontrolu infekčnosti použitých oocyst byly nainfikováni 3 pískomilové (*Meriones unguiculatus*), kteří jsou vnímaví k infekci *C. andersoni*. Všechna zvířata byla denně od 1. DPI vyšetřována na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu po dobu 42 DPI. Každý sedmý den po infekci byly po dobu šesti týdnů vždy tři infikované myši humánně usmrceny zlomením vazů a byly jim odebrány žaludky a sleziny. Žaludky byly vyšetřeny histologickými a imunologickými metodami (viz 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6 a 3.2.8), sleziny byly vyšetřeny imunologickými metodami (viz 3.2.7 a 3.2.8). Výsledky byly porovnány s neinfikovanými zvířaty, které byly stejnými postupy vyšetřeny v 0 DPI a 42 DPI.

### 3.2.3 Parazitologické vyšetření

Trus byl odebírán individuálně denně ve stejný čas po celou dobu primární infekce (42 DPI) a sekundární infekce (21 DPRI). Hmotnost trusu byla získána jako rozdíl hmotnosti preparátu (trusu natřeného na sklíčku) a hmotnosti čistého sklíčka. Nátěr trusu byl barven metodou dle Miláčka a Vítovce (1985) a prohlížen světelným mikroskopem (Olympus IX 70), při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Při nízké intenzitě byly počítány všechny oocysty nalezené na preparátu, při vysoké intenzitě byl počítán počet oocyst ve 30 náhodných zorných polích. Ze zjištěných údajů (hmotnost trusu, počet zorných polí a počet oocyst na sklíčku) byla odhadnuta intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG, oocysts per gram) (Kváč a kol. 2007).

#### **Barvení dle Miláčka a Vítovce (1985):**

- Použité roztoky a chemikálie:
  - roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml etanolu, 70 ml dH<sub>2</sub>O)
  - 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - roztok tartrazinu (1% tartrazin v 1% kyselině octové)
- Postup:
  - tenký nátěr trusu na podložním sklíčku fixovat metanolem v plameni
  - barvit roztokem methylvioleti 30 min
  - opláchnout vodovodní vodou a diferencovat 2% kyselinou sírovou přibližně 30 sekund
  - opláchnout vodovodní vodou a dobarvit roztokem tartrazinu přibližně 1 min



### 3.2.4 Histologické vyšetření

Žlázatá část žaludku z usmrcené myši byla fixována 24 hodin ve fixačním roztoku Davidson, poté přendána do zásobního roztoku Davidson, kde byly vzorky uchovávány do dalšího zpracování. Každý vzorek byl nabarven hematoxylin-eosinem (barvení prokazující zánět ve tkáni, vidíme jádra buněk fialově v růžové cytoplazmě) a barvením dle Wolbacha (barvení prokazující infekci kryptosporidii, oocysty vidíme fialově v modře zbarvené tkáni).

#### Příprava řezů:

- Použité roztoky a chemikálie:
  - Davidson zásobní roztok (1 díl glycerinu, 2 díly konc. formolu, 3 díly 96% alkoholu, 3 díly dH<sub>2</sub>O)
  - Davidson fixační roztok (9 dílů zásobního roztoku, 1 díl kyseliny octové)
  - I. vzestupná alkoholová odvodňovací řada (70% alkohol, 80% alkohol, 96% alkohol, 96% alkohol, aceton, xylen a xylen)
  - parafinová řada (3 následné roztoky parafínu)
  - alkoholová sestupná zavodňovací odparafinovací řada (xylen, xylen, xylen, 96% alkohol, 96% alkohol, 80% alkohol, 70% alkohol, dH<sub>2</sub>O a dH<sub>2</sub>O)
  - II. vzestupná odvodňovací řada (70% alkohol, 80% alkohol, 96% alkohol, 96% alkohol, karbolxylen, karbolxylen, xylen, xylen a xylen)
  - kanadský balzám
- Postup:
  - vzorky odvodňovat I. vzestupnou alkoholovou řadou, vždy po 60 min vyměnit roztok, v posledním roztoku nechat 90 min
  - prosytit parafínem (2-4 hod v parafínu I, 4-6 hod v parafínu II, 8-12 hod v parafínu III)
  - vzorky zalít do čistého parafínu, vytvořit bločky, zhotovit 5 µm silné histologické řezy a připravit preparáty na podložních sklíčkách
  - preparáty ponechat 24 hod na plotně o teplotě 42 °C
  - preparáty odparafinovat alkoholovou sestupnou zavodňovací řadou vždy po 5 min

- vzorky nabarvit (barvení hematoxylin-eosin, barvení dle Wolbacha)
- po nabarvení pokračovat v odvodňování II. alkoholovou vzestupnou řadou vždy po 5 min, v karbolxylenech ponechat pouze 1 min
- vzorky zamontovat do kanadského balzámu a nechat usušit při teplotě 42 °C
- prohlížet světelným mikroskopem (Olympus IX70) pod vhodným zvětšením

### **Barvení hematoxylin-eosin**

- Použité roztoky a chemikálie:
  - hematoxylin (0,5 g hematoxylinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 500 ml dH<sub>2</sub>O + 25 g síranu hlinito-amonného + 0,1 g jodičnanu sodného + 20 ml kyseliny octové)
  - eosin (0,5 g eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 250 ml dH<sub>2</sub>O + 10 ml kyseliny octové)
- Postup:
  - vzorky barvit 10 min v hematoxylinu
  - 10 min oplachovat pod tekoucí vodou
  - 5 min barvit vzorky v eosinu
  - opláchnout v dH<sub>2</sub>O

### **Barvení dle Wolbacha**

- Použité roztoky a chemikálie:
  - roztok Giemsa (zásobní roztok: 4 ml Giemsa, 5 ml metanolu, 0,4 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> do 100 ml dH<sub>2</sub>O; pracovní roztok: zásobní roztok ředit dH<sub>2</sub>O 1:10)
  - diferenciální roztok kalafuny (zásobní roztok: 10 g kalafuny do 100 ml 96% etanol, pracovní roztok: 1 ml zásobního roztoku do 100 ml 96% etanolu)
- Postup:
  - barvit pracovním roztokem Giemsa přes noc
  - opláchnout deionizovanou vodou
  - opláchnout 96% etanolem

- ponořit do pracovního diferenciálního roztoku kalafuny na několik sekund
- opláchnout 96% etanolem
- pokračovat II. vzestupnou alkoholovou odvodňovací řadou, začínat až na 96% etanolu

### 3.2.5 Imunofluorescenční test

Histologické řezy zpracované následujícím postupem byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 40× a vlnové délce 520 nm.

**Cryptosporidium IF Test** (Crypto Cel, Medac, GmbH, Wedel, Germany)

- Použité roztoky a chemikálie:
  - Crypto Cel Reagent
  - Mounting Fluid
  - PBS
- Postup:
  - na preparát nanést 10 µl Crypto Cel Reagent
  - inkubovat 30 min ve vlhké komůrce při 37 °C
  - omývat 1 min v PBS, osušit
  - nanést 25 µl Mounting Fluid
  - přiložit krycí sklíčko

### 3.2.6 Izolace intraepiteliálních lymfocytů (IELs) (Kearsey a Stadnyk 1996)

Z usmrcených myší byly vyjmuty žaludky, vyčištěny od zbytků potravy a zpracovány dle následujícího postupu. Vyizolované IELs byly poté analyzovány pomocí průtokové cytometrie (viz 3.2.8).

- Použité roztoky a chemikálie:
  - RPMI 1640 základ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
  - RPMI obsahující 2 % BOFES (bovinní fetální sérum, Zvos, Hustopeče, ČR), (2% RPMI)
  - sterilní PBS
  - HEPES-buffered HBSS (0,49 g HBSS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) do 50 ml dH<sub>2</sub>O, sterilizováno přes filtr 0,2 µm, přidat 50 µl 1 mM

DTT (DiThioTreitol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 2,5 ml BOFES.

- PBS obsahující 1% BOFES (1% PBS)
- Percoll
  - 100% Percoll (1 díl 10× koncentrovaného PBS, 9 dílů Percoll stock (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 7,2 – 7,4
  - 75% Percoll (3 díly 100% Percoll, 1 díl 2% RPMI)
  - 45% Percoll (4,5 dílu 100% Percoll, 6,5 dílu 2% RPMI)
  - 30% Percoll (3 díly 100% Percoll, 7 dílů 2% RPMI)
- Postup:
  - žaludky očištěné od zbytků potravy proplachovat ve dvou lázních čistého PBS po dobu 3 min při 4 °C
  - přenést do 2% RPMI a nechat proplachovat ½ hod při 4 °C
  - přenést do předehřátých sterilních kádinek obsahujících 6 ml HBSS, inkubovat ve vodní lázni 1 hod při 37 °C
  - suspenzi přenést do čistých zkumavek
  - nechat 5 min stát, aby se usadily největší nečistoty
  - supernatant přenést do čistých zkumavek, centrifugovat 10 min při 150 g a 4 °C
  - pelet rozmíchat přidáním 5 ml 30% Percollu, centrifugovat 15 min při 150 g a 4 °C
  - pelet rozmíchat přidáním 4 ml 45% Percollu a navrstvit na 3 ml 75% Percollu (v čisté zkumavce)
  - centrifugovat 30 min při 150 g a 4 °C
  - odebrat IELs (v interfázi), přenést do 1% PBS, centrifugovat 10 min při 150 g a 4 °C
  - sediment resuspendovat v 1% PBS, opět centrifugovat 10 min při 150 g a 4 °C
  - sediment naředit 1% PBS na 200 µl

### **3.2.7 Izolace splenocytů**

Sleziny odebrané z usmrcených myší byly zpracovány dle následujícího postupu. Poté byly suspenze splenocytů analyzovány průtokovým cytometrem (viz 3.2.8).

- Použité roztoky a chemikálie:
  - RPMI 1640 (RPMI základ)
  - RPMI obsahující 10% BOFES (10% RPMI)
  - 1% PBS
- Postup:
  - slezinu protlačit přes sterilní sítko pomocí pístu stříkačky
  - vzniklou suspenzi naředit v RPMI základ a centrifugovat 10 min při 150 g a 4 °C
  - sediment resuspendovat v RPMI základ, opět centrifugovat 10 min při 150 g a 4 °C
  - tento postupu zopakovat 2×
  - sediment naředit 10% RPMI na 1 ml
  - 10 µl z této suspenze smíchat s 500 µl trypanové modři a 500 µl 10% RPMI, spočítat splenocyty v Bürkerově komůrce (mikroskop Olympus BX 51, zvětšení 40×)
  - z původní suspenze odebrat 2 miliony lymfocytů do čisté zkumavky
  - zlyzovat červené krvinky přidáním 3,5 ml 0,84% NH<sub>4</sub>Cl 3 min ve vodní lázni při 37 °C
  - lyzování zastavit přidáním 3,5 ml 1% PBS
  - centrifugovat 10 min při 150 g a 4 °C
  - pelet rozmíchat v nadbytku 1% PBS a opět centrifugovat 10 min při 150 g a 4 °C
  - pelet naředit na 200 µl 1% PBS

### **3.2.8 Průtoková cytometrie (Fluorescent activated cell cytometer/ cytometry, FACC)**

Vyizolované IELs a splenocyty byly převedeny do plastových zkumavek (disposable culture tubes polypropylene, Sigma-Aldrich, GmbH, Schnelldorf, Germany) a pomocí specifických značených monoklonálních protilátek (MAbs, PharMingen, San Diego, CA, USA) byly obarveny sledované subpopulace lymfocytů; možnost nespecifického navázání protilátek na povrch buněk byla odstraněna srovnáním s izotypovými kontrolami (PharMingen, San Diego, CA, USA) a negativní

kontrolou. Značené populace buněk byly poté analyzovány průtokovým cytometrem (FACC, Epics XL Flow Cytometer, Beckman Coulter, Fullertown, CA, USA) vybaveným 15-mW argonovým laserem o vlnové délce 488 nm. Analýza byla provedena v softwaru System II (Beckman Coulter, Fullertown, CA, USA).

- Použité roztoky a chemikálie:

- monoklonální protilátky proti specifickým receptorům subpopulací T-lymfocytů (MAbs):

- anti-CD4 MAb (FITC anti-mouse CD4, clone H 129.19, 0,5 mg/ml)
- anti-CD8 MAb (PE anti-mouse CD8a, clone 53-6.7, 0,2 mg/ml)
- anti- $\delta\gamma$ TCR MAb (FITC anti-mouse gamma delta TCR, clone GL3, 0,5 mg/ml)
- anti-CD45 MAb (PE-Cy5-conjugated anti-mouse CD45, clone 30-F11, 0,2 mg/ml)

- Izotypové kontroly:

- Rat IgG2a (PE, 0,2 mg/ml)
- Rat IgG2b (FITC, 0,5 mg/ml)
- Armenian Hamster IgG (FITC, 0,5 mg/ml)

- 1% PBS

- Postup:

- 50  $\mu$ l suspenze IELs nebo splenocytů ( $0,5 \times 10^6$  buněk) přendat do plastových zkumavek

- k suspenzím přidat MAbs dle následujícího schématu (vždy množství na jednu zkumavku):

- barvení I: 0,5  $\mu$ l FITC anti-mouse CD4  
0,5  $\mu$ l PE anti-mouse CD8  
0,3  $\mu$ l PE-Cy5-conjugated anti-mouse CD45
- barvení II: 0,5  $\mu$ l FITC anti-mouse gamma delta TCR  
0,5  $\mu$ l PE anti-mouse CD8  
0,3  $\mu$ l PE-Cy5-conjugated anti-mouse CD45

- u každého typu barvení udělat příslušnou izotypovou kontrolu (zvlášť pro IELs a splenocyty, vždy množství na jednu zkumavku):

- barvení IZO I: 0,5  $\mu$ l Rat IgG2a (PE)

- 0,5 µl Rat IgG2b (FITC)
- 0,3 µl CD45 (CY)
- barvení IZO II: 0,5 µl Rat IgG2a (PE)
- 0,5 µl Armenian Hamster IgG (FITC)
- 0,3 µl CD45 (CY)
- jeden vzorek IELs nebo splenocytů nechat neobarven – negativní kontrola
- všechny vzorky jemně rozvortexovat a nechat barvit 30 min ve tmě při 4 °C
- zkumavky doplnit nadbytkem 1% PBS a centrifugovat 10 min při 150 g a 4 °C
- k sedimentu splenocytů přidat 500 µl 1% PBS
- k sedimentu IELs přidat 300 µl 1% PBS a 50 000 fluorescenčně značených kuliček (Fluorospheres Flow-Count, Beckman Coulter, Fullertown, CA, USA), aby bylo možno spočítat absolutní počet intraepiteliálních lymfocytů
- vzorky rozvortexovat a analyzovat na FACC

### 3.2.9 Detekce cytokinů

Cytokiny (IFN $\gamma$  a IL-10) byly detekovány v kultivačním médiu splenocytů pomocí ELISA testu (antibody-sandwich enzyme-linked immunosorbent assays) specifickými monoklonálními protilátkami (MAbs) na spektrofotometru (Multiskan MCC 340, Labsystems Oy, Helsinki, Finland) při vlnové délce 490 nm.

#### Příprava vzorků

- splenocyty ( $1 \times 10^6$  splenocytů/200 µl 10% RPMI/jamka) kultivovat v 96 jamkovém panelu v termostatu při 37 °C a v atmosféře s 5% CO $_2$
- po 24 h přenést do odpovídajících jamek čistého panelu 100 µl supernatantu z kultur splenocytů
- supernatanty zamrazit při -80 °C

#### ELISA test

- Použité roztoky a chemikálie:
  - specifické monoklonální protilátky (MAbs, PharMingen, San Diego, CA, USA):

- purifikovaná MAb anti-IL-10 (klon JES5-2A5, 10 µg/ml)
- biotinilovaná MAb anti-IL-10 (klon SXC-1, 4 µg/ml)
- purifikovaná MAb anti-IFN $\gamma$  (klon R4-6A2, 2 µg/ml)
- biotinilovaná MAb anti-IFN $\gamma$  (klon XMG1.2, 2 µg/ml)
- o fosforečnanový pufr (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1:1, pH 6,0)
- o uhličitanový pufr (0,44 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,5 g NaHCO<sub>3</sub> do 100 ml dH<sub>2</sub>O, pH 9,6)
- o PBS obsahující 10 % BOFES (10% PBS)
- o roztoky kalibračního standartu (rekombinantní IFN $\gamma$  a IL-10, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- o streptavidin peroxidáza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- o orthophenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- o 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- o fosfát-citrátový pufr (57 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2,43 ml 0,1 M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> + 5 ml dH<sub>2</sub>O, pH 5,0)
- o 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- o 0,05 % Tween 20 v PBS (0,05% PBS TWEEN)
- Postup:
  - o do 96-jamkového panelu (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) nakoutovat 50 µl purifikované MAbs na jamku (purifikovanou MAb anti-IL-10 ředit v fosforečnanovém pufru na koncentraci 10 µg/ml, purifikovanou MAb anti-IFN $\gamma$  ředit v uhličitanovém pufru na koncentraci 2 µg/ml)
  - o inkubovat ve vlhké komůrce 24 hod při 4 °C
  - o 2× promýt v 0,05% PBS TWEEN, vyklepat do sucha
  - o přidat 200 µl 10% PBS na jamku
  - o inkubovat ve vlhké komůrce 1-2 hod při laboratorní teplotě
  - o 2× promýt v 0,05% PBS TWEEN, vyklepat do sucha
  - o přidat 50 µl rozmražených supernatantů z kultur splenocytů
  - o vytvořit kalibrační řadu (rekombinantní IFN $\gamma$  a IL-10, 8 jamek, nejvyšší koncentrace 10 ng/ml, ředit dvojkovou řadou v 10% PBS, poslední jamka samotný 10% PBS)
  - o inkubovat ve vlhké komůrce 24 hod při 4 °C
  - o 4× promýt v 0,05% PBS TWEEN, vyklepat do sucha



- přidat 50  $\mu$ l biotiniłované MAb na jamku (biotiniłovanou MAb anti-IL-10 ředit v 10% PBS na koncentraci 4  $\mu$ g/ml, biotiniłovanou MAb anti-IFN $\gamma$  ředit v 10% PBS na koncentraci 2  $\mu$ g/ml)
- inkubovat ve vlhké komůrce 45-60 min při laboratorní teplotě
- 4 $\times$  promýt v 0,05% PBS TWEEN, vyklepat do sucha
- přidat streptavidin peroxidázu (ředění 1:1000, 100  $\mu$ l na jamku)
- inkubovat ve vlhké komůrce 30-45 min při laboratorní teplotě
- 5 $\times$  promýt v 0,05% PBS TWEEN, vyklepat do sucha
- přidat substrátový roztok (4 mg OPD, 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 ml fosfát-citrátového pufru, 100  $\mu$ l na jamku)
- inkubovat ve tmě 10-45 min při laboratorní teplotě (do zabarvení vzorků)
- reakci zastavit přidáním 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100  $\mu$ l na jamku)
- změřit na spektrofotometru při 4901 nm

### 3.2.10 Statistické zpracování

Ke statistickému porovnání rozdílů mezi *C. muris* CB03, TS03 a *C. andersoni* LI03 použitých k infekci BALB/c myši a porovnání imunitních odpovědí experimentálních zvířat na základě migrace T-lymfocytů a produkce cytokinů byl použit neparametrický Mann-Whitney U-test, Statistica® 6.0 software (StatSoft ČR, Praha).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Experimentální infekce BALB/c myši *Cryptosporidium*

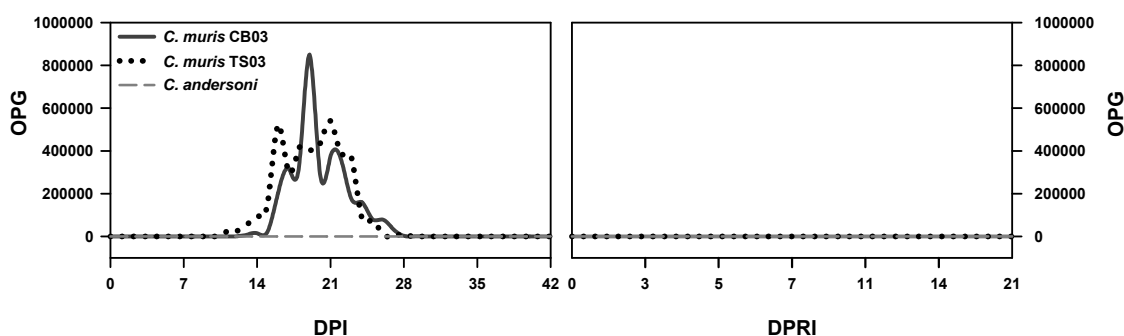
#### *muris* CB03 a TS03

##### 4.1.1 Primární infekce

###### 4.1.1.1 Průběh infekce

Vyšetření trusu BALB/c myši infikovaných *C. muris* CB03 a TS03 prokázalo přítomnost oocyst morfologicky a molekulárně shodných s kmeny *C. muris* použitých k infekci u všech experimentálních zvířat od 10. dne po infekci (DPI) s průměrem od  $11,7 \pm 1,3$  DPI u myši infikovaných *C. muris* CB03 a od  $11,1 \pm 0,7$  DPI při infekci *C. muris* TS03 ( $P > 0,05$ ). Přítomnost oocyst v trusu myši s infekcí *C. muris* CB03 byla pozorována  $16,9 \pm 1,9$  dní s maximem  $85 \times 10^4$  OPG (oocysts per gram) 19. DPI. Naproti tomu, myši infikované *C. muris* TS03 vylučovaly oocysty výrazně kratší dobu ( $P < 0,01$ ), pouze  $12,4 \pm 2,8$  dní a maximální přítomnost oocyst ( $54 \times 10^4$  OPG) byla zaznamenána 21. DPI (Graf 1).

Tyto výsledky korespondují se zjištěnými histopatologickými změnami ve sliznicích žlaznatých částí žaludků u všech experimentálních myši, které prokázaly přítomnost kryptosporidiové infekce. Histopatologické změny byly detekovány do 35. DPI a charakterizovány zánětem (metaplázie epitelu) a dilatací žlaznatých částí žaludku v důsledku přítomnosti vývojových stádií *C. muris*. Během infekce nebyly pozorovány žádné klinické příznaky a makroskopické změny u experimentálních zvířat.



**Graf 1.** Průběh infekce *C. muris* CB03, *C. muris* TS03 a *C. andersoni* LI03 u BALB/c myši; DPI – dny po primární infekci; DPRI – dny po reinfekci; OPG – počet oocyst na gram trusu.

#### 4.1.1.2 Vyšetření žaludečních IELs

Analýza průtokovým cytometrem prokázala přítomnost IELs v žaludcích neinfikovaných BALB/c myši (negativní kontrola) pouze ve velmi malém množství ( $30,0 \pm 15,3$  CD4+,  $16,7 \pm 7,5$  CD8+ a  $123,2 \pm 30,4$   $\gamma\delta$  T-lymfocytů) (Graf 2A a 3A).

V průběhu primární infekce došlo k výraznému ( $P < 0,01$ ) zvýšení množství CD4+ T-lymfocytů v žaludečním epitelu od 7. DPI a CD8+ T-lymfocytů od 14. DPI. Rovněž změny v poměrech CD4+ a CD8+ T-lymfocytárních populací byly pozorovány u obou kmenů myši, od 21. DPI u myši infikovaných *C. muris* TS03 a od 28. DPI u myšič s infekcí *C. muris* CB03. U tohoto kmene byl navíc zaznamenán vyšší počet CD8+ T-lymfocytů oproti CD4+ T-lymfocytům a nejvyšší přítomnost IELs ve sliznici žaludků byla pozorována 28. DPI, kdy bylo dosaženo množství  $25,3 \times 10^3$  CD8+ a  $16,3 \times 10^3$  CD4+ T-lymfocytů. V žaludcích myši s infekcí TS03 bylo největší množství IELs zaznamenáno rovněž 28. DPI ( $18,4 \times 10^3$  CD8+ a  $19,7 \times 10^3$  CD4+ T-lymfocytů), ačkoliv v tento den byla většina myši už z infekce vyléčena a žádné oocysty detekovány v trusu už nebyly (Graf 1). Množství  $\gamma\delta$  T-lymfocytů se také zvyšovalo od 7. DPI, signifikantní rozdíl oproti negativní kontrole byl prokázán pouze 28. a 35. DPI ( $P < 0,01$ ), jejich maximální přítomnost ve sliznicích žaludků myši infikovaných *C. muris* CB03 ( $1,3 \times 10^3$ ) a TS03 ( $2,2 \times 10^3$ ) byla pozorována rovněž 28. DPI (Graf 2A a 3A).

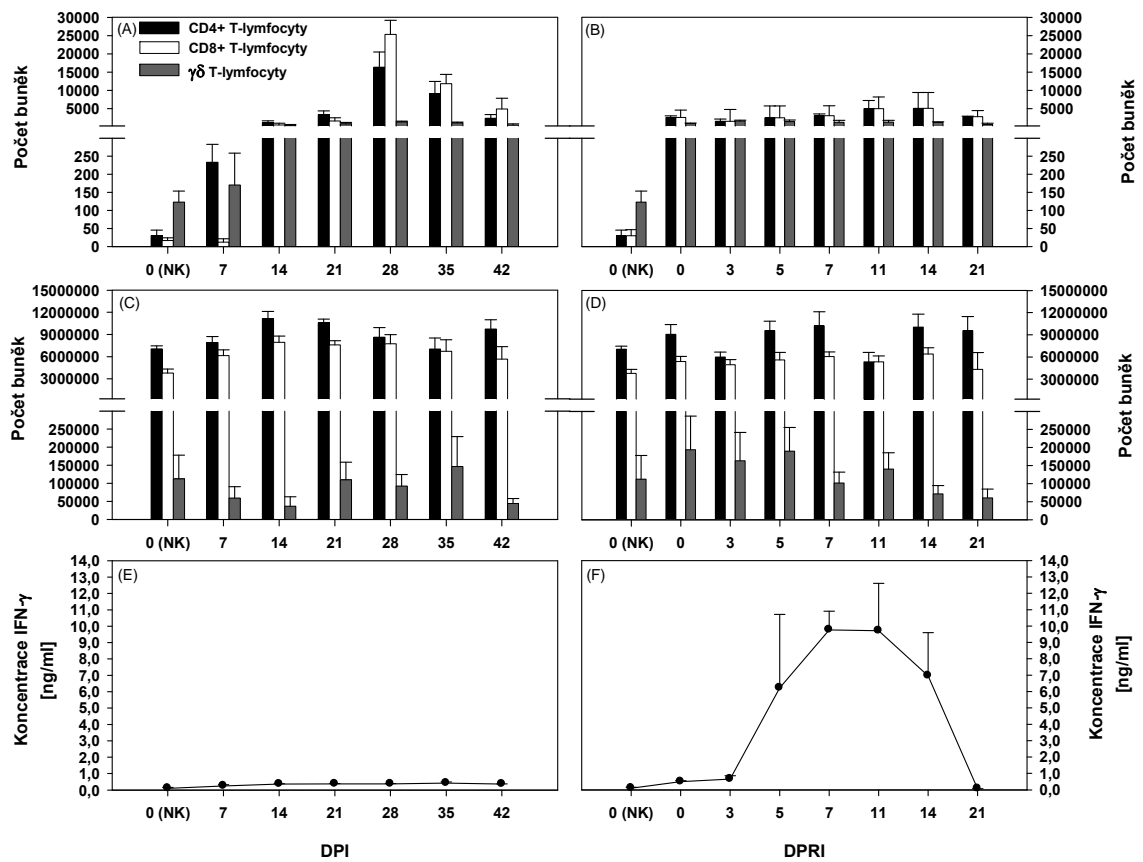
Během primární infekce nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi *C. muris* CB03 a TS03 v množstvích IELs v žaludcích infikovaných BALB/c myši.

#### 4.1.1.3 Vyšetření spenocytů a detekce cytokinů

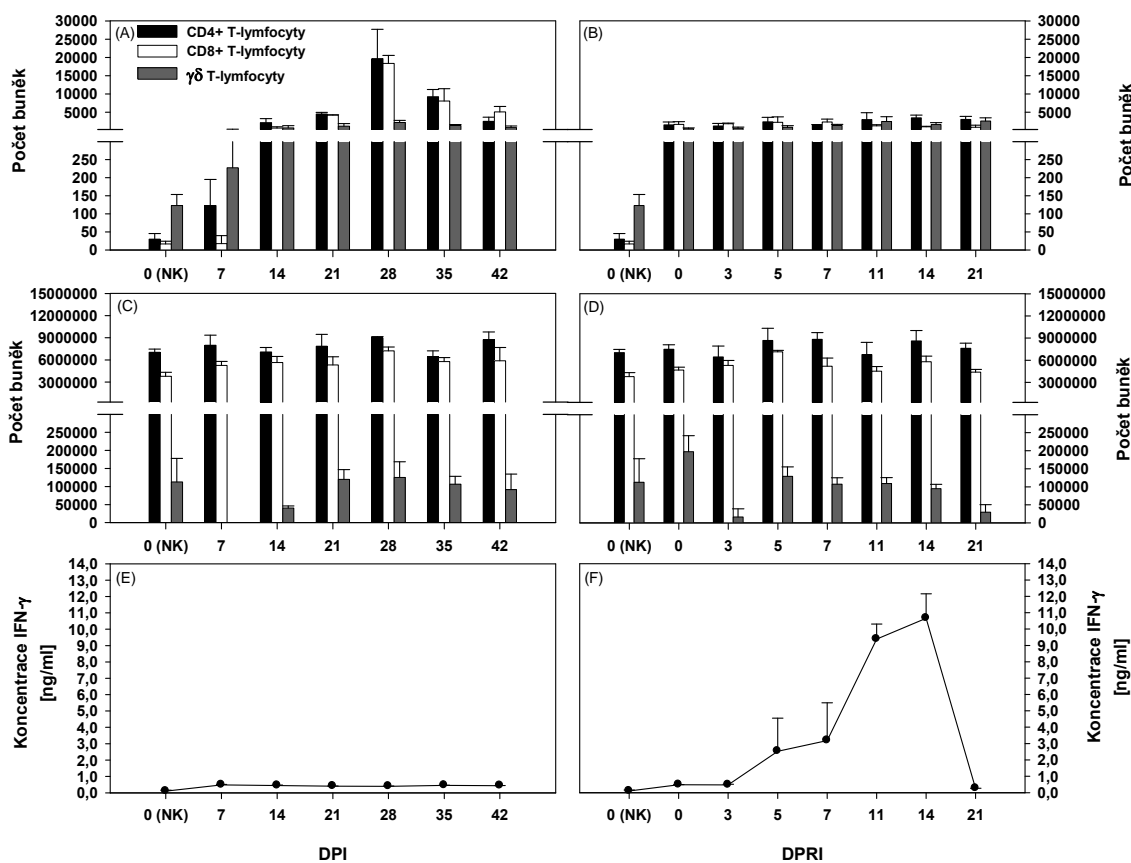
Ve slezinách neinfikovaných myši (negativní kontrola) byl průtokovým cytometrem detekován poměr mezi CD4+ a CD8+ T-lymfocyty 1,8:1 ( $7 \times 10^6$  CD4+ a  $3,8 \times 10^6$  CD8+ T-lymfocytů), který se během primární infekce myši oběma používanými kmeny *C. muris* změnil na 1,1:1 28. DPI. Maximální zaznamenané množství T-lymfocytů bylo u obou kmenů stejné ( $52 \times 10^6$  buněk). Přítomnost  $\gamma\delta$  T-lymfocytů ve slezině byla rovněž zaznamenána, ovšem jen ve velmi malém množství (Graf 2C a 3C).

ELISA test prokázal přítomnost IFN- $\gamma$  v primárních kulturách spenocytů. U neinfikovaných myši dosáhla naměřená hodnota koncentrace 0,1 ng/ml a během infekce myši *C. muris* CB03 a TS03 se její hodnota mírně zvýšila, avšak ani u jednoho

kmene nedošlo k překročení hodnoty 0,5 ng/ml (Graf 2E a 3E). Produkce IL-10 v *ex vivo* kulturách spenocytů nebyla zaznamenána.



**Graf 2.** Experimentální infekce BALB/c myši *Cryptosporidium muris* CB03; **(A)** Migrace T-lymfocytů do žaludeční sliznice v průběhu primární infekce; **(B)** Migrace T-lymfocytů do žaludku v průběhu reinfekce; **(C)** Počet T-lymfocytů ve slezině v průběhu primární infekce; **(D)** Počet T-lymfocytů ve slezině v průběhu reinfekce; **(E)** Koncentrace IFN-γ v *ex vivo* kulturách spenocytů v průběhu primární infekce; **(F)** Koncentrace IFN-γ v *ex vivo* kulturách spenocytů v průběhu reinfekce; **DPI** – dny po primární infekci; **DPRI** – dny po reinfekci; **NK** – negativní kontrola



**Graf 3.** Experimentální infekce BALB/c myši *Cryptosporidium muris* TS03; **(A)** Migrace T-lymfocytů do žaludeční sliznice v průběhu primární infekce; **(B)** Migrace T-lymfocytů do žaludku v průběhu reinfekce; **(C)** Počet T-lymfocytů ve slezině v průběhu primární infekce; **(D)** Počet T-lymfocytů ve slezině v průběhu reinfekce; **(E)** Koncentrace IFN- $\gamma$  v *ex vivo* kulturách splenocytů v průběhu primární infekce; **(F)** Koncentrace IFN- $\gamma$  v *ex vivo* kulturách splenocytů v průběhu reinfekce; **DPI** – dny po primární infekci; **DPRI** – dny po reinfekci; **NK** – negativní kontrola

## 4.1.2 Reinfekce

### 4.1.2.1 Průběh infekce

Koprologickým vyšetřením nebyla zaznamenána přítomnost oocyst v trusu BALB/c myši infikovaných *C. muris* CB03 a TS03, což ukazuje na získání rezistence experimentálních zvířat k reinfekci (Graf 1). Tyto výsledky byly potvrzeny i histologickým vyšetřením, které neprokázalo přítomnost vývojových stádií a makroskopické a mikroskopické změny ve sliznicích žlázatých částí žaludků.

#### 4.1.2.2 Vyšetření žaludečních IELs

Významně ( $P < 0,01$ ) zvýšená množství IELs oproti negativní kontrole byla pozorována v žaludečním epitelu 90. DPI (=0. DPRI). Avšak celkové množství migrujících CD4+ a CD8+ T-lymfocytů do žaludeční sliznice bylo během reinfekce nižší ve srovnání s množstvím  $\alpha\beta$  T-lymfocytů během primární infekce a rovněž nebylo zjištěno statisticky významné zvýšení přítomných  $\alpha\beta$  T-lymfocytů oproti 0. DPRI (Graf 2 a 3). Zatímco maximální přítomnost žaludečních IELs v žaludku *C. muris* CB03 infikovaných myší byla zaznamenána 14. DPRI ( $5,1 \times 10^3$  CD4+ a  $4,3 \times 10^3$  CD8+ T-lymfocytů), myši infikované *C. muris* TS03 dosáhly maximálního množství už 7. DPRI ( $5,3 \times 10^3$  CD4+ a  $2,4 \times 10^3$  CD8+ T-lymfocytů).

V kontrastu s primární infekcí, množství  $\gamma\delta$  T-lymfocytů se během reinfekce významně zvýšilo ( $P < 0,01$ ) od 7. DPRI a maximální přítomnost v žaludečním epitelu byla zaznamenána 14. DPRI ( $2,9 \times 10^3$  v *C. muris* CB03 a  $3,1 \times 10^3$  v *C. muris* TS03 infikovaných myší) (Graf 2B a 3B).

#### 4.1.2.3 Vyšetření splenocytů a detekce cytokinů

Zvýšená množství T-lymfocytů ve slezině zaznamenaná 42. DPI byla pozorována i 90. DPI (=0. DPRI) a během reinfekce nebyly pozorovány významné změny v zastoupení jednotlivých subpopulací T-lymfocytů. Poměr CD4+/CD8+ T-lymfocytů se změnil na 1,6:1 a zastoupení  $\gamma\delta$  T-lymfocytů bylo opět velmi nízké v celém průběhu reinfekce (Graf 2D a 3D)

Koncentrace IFN- $\gamma$  zaznamenaná 42. DPI přetrvávala až do 90. DPI (=0. DPRI) a výrazné ( $P < 0,01$ ) zvýšení produkce IFN- $\gamma$  bylo pozorováno od 5. DPRI s maximální dosaženou koncentrací 9,8 ng/ml 11. DPRI u myší reinfikovaných *C. muris* CB03 a 10,7 ng/ml 14. DPRI u experimentálních zvířat s reinfekcí *C. muris* TS03 (Graf 2F a 3F). Podobně jako během primární infekce, produkce IL-10 nebyla prokázána.

## 4.2 Experimentální infekce BALB/c myši *Cryptosporidium andersoni* LI03

### 4.2.1 Primární infekce

#### 4.2.1.1 Průběh infekce

Dle předpokladů nebyla zaznamenána přítomnost oocyst *C. andersoni* LI03 v trusu infikovaných BALB/c myši (Graf 1) a histologické vyšetření sliznic žlaznatých částí žaludků rovněž neprokázalo přítomnost vývojových stádií *C. andersoni* LI03. Tyto výsledky ukazují, že myši nebyly vnímavé k infekci izolátem *C. andersoni* LI03.

#### 4.2.1.2 Vyšetření žaludečních IELs

Ačkoliv tedy vůbec nedošlo k zachycení oocyst v žaludeční sliznici experimentálních myši, byl zaznamenán nárůst obou subpopulací  $\alpha\beta$  T-lymfocytů oproti kontrolním zdravým myším.

Zvýšená množství CD4+ T-lymfocytů v žaludeční sliznici byla statisticky průkazná ( $P<0,05$ ) pouze 21. a 28. DPI a nejvyššího množství těchto buněk v epitelu žaludku ( $5,3\times 10^3$ ) bylo dosaženo 35. DPI. Detekce CD8+ T-lymfocytů ukázala statisticky významnou migraci ( $P<0,05$ ) do žaludků 28. a 35. DPI a nejvyšší přítomnost ve sliznici žaludků byla zaznamenána také 35. DPI v množství  $1,5\times 10^3$  CD8+ T-lymfocytů (Graf 4).

Celkové množství  $\alpha\beta$  T-lymfocytů migrujících od žaludeční sliznice myši infikovanými oocystami *C. andersoni* LI03 dosahovalo statisticky výrazně nižších hodnot ( $P<0,05$ ) od 14. DPI až do konce primární infekce (42. DPI) v porovnání s infekcemi *C. muris* CB03 a TS03 .

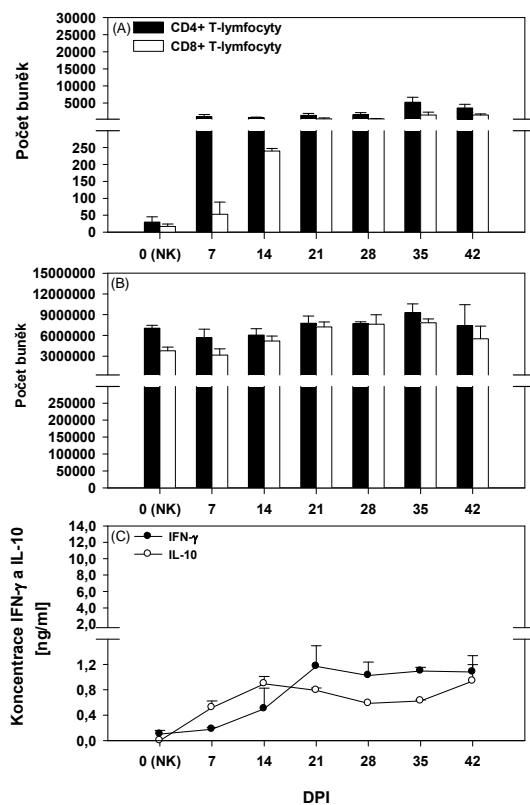
#### 4.2.1.3 Vyšetření splenocytů a detekce cytokinů

Poměr mezi CD4+ a CD8+ T-lymfocyty 1,8:1 ( $7\times 10^6$  CD4+ a  $3,8\times 10^6$  CD8+ T-lymfocytů), detekovaný ve slezinách neinfikovaných myši, se po podání oocyst *C. andersoni* LI03 změnil na 1,2:1 35. DPI. Nejvyšší naměřená hodnota T-lymfocytů ve slezině byla  $50\times 10^6$  buněk (Graf 4).

ELISA testem byla prokázána přítomnost IFN- $\gamma$  v primárních kulturách splenocytů kontrolních myši v koncentraci 0,1 ng/ml. Po infikování myši oocystami *C. andersoni* LI03 se jeho koncentrace průkazně ( $P<0,05$ ) zvýšila od 21. DPI až do 42. DPI. Nejvyšší koncentrace IFN- $\gamma$  byla naměřena 21. DPI a dosáhla hodnoty

1,2 ng/ml (Graf 4). Porovnání s naměřenými hodnotami koncentrací IFN- $\gamma$  v primárních kulturách splenocytů myši infikovaných *C. muris* CB03 a TS03 ukázalo statisticky významný rozdíl ( $P < 0,01$ ) od 21. DPI.

Překvapivě byla také v *ex vivo* kulturách splenocytů z myši infikovaných *C. andersoni* LI03 zaznamenána produkce IL-10, což výrazně kontrastuje s nepřítomností tohoto cytokinu v primárních kulturách splenocytů z myši infikovaných *C. muris* CB03 a TS03. V *ex vivo* kulturách splenocytů neinfikovaných myši nebyla zaznamenána přítomnost IL-10, ovšem u infikovaných myši byla od 7. DPI zjištěna produkce IL-10 a jeho nejvyšší koncentrace (0,9 ng/ml) byla naměřena 14. DPI (Graf 4).



**Graf 4.** Experimentální infekce BALB/c myši *Cryptosporidium andersoni* LI03; (A) Migrace T-lymfocytů do žaludeční sliznice v průběhu primární infekce; (B) Počet T-lymfocytů ve slezině v průběhu primární infekce; (C) Koncentrace IFN- $\gamma$  a IL-10 v *ex vivo* kulturách splenocytů v průběhu primární infekce; **DPI** – dny po primární infekci; **NK** – negativní kontrola



## 5. DISKUZE

Dosud jsou popsány pouze dva druhy kryptosporidií parazitující v žaludku saveců, *C. muris* a *C. andersoni*, u kterých ale předchozí studie prokázaly vnitrodruhovou variabilitu.

Délka prepatentní a patentní periody při infekci *C. muris* a *C. andersoni* je závislá na infekční dávce, hostiteli a kmenu či izolátu. Např. při infekci imunokompetentních myši kmenem *C. muris* RN 66 byla pozorována délka prepatentní periody 5 dní a patentní periody 34-75 dní (Iseki a kol. 1989). Podobně myši infikované izolátem *C. muris* MCR měly prepatentní periodu 5-12 dní a patentní periodu 34-75 dní (Rhee a kol. 1995, 1999). U druhu *C. andersoni* je situace složitější, protože většina izolátů *C. andersoni* je pro *Mus musculus* neinfekční (Lindsay a kol. 2000), zatímco izolát *C. andersoni* Kawatabi byl úspěšně použit k infekci *Mus musculus* SCID; prepatentní perioda v tomto případě trvala 14 dní a u experimentálních myši se rozvinula celoživotní chronická infekce (Sato a kol. 2003).

Ačkoliv předchozí experimenty odhalily různou hostitelskou specifitu a molekulární rozdíly mezi *C. muris* CB03 a TS03 (Kváč a kol. 2008) a tato studie potvrdila i průkazný rozdíl v délce patentní periody, žádné významné rozdíly v aktivaci buněčné imunitní odpovědi nebyly pozorovány mezi průběhy infekcí těmito dvěma izoláty na BALB/c myších.

Nezbytná úloha buněčné imunity v překonání infekce *C. parvum* je dobře zdokumentována (Heine a kol. 1984, Ungar a kol. 1990, 1991, Riggs 2002) a T-lymfocyty, zejména CD4+ T-lymfocyty, jsou považovány za nejdůležitější buňky ve vývoji imunity i v případě infekce *C. muris* (McDonald a kol. 1992, 1994, Tilley a kol. 1995). Výsledky deplečních studií (Ungar a kol. 1991, McDonald a kol. 1992) a experimenty na myších deficientních pro MHC II (Aguirre a kol. 1994) vedly k závěru, že schopnost myši kontrolovat infekci *C. muris* je spojena s přítomností CD4+ T-lymfocytů ve střevní sliznici a jejichž důležitou funkcí je produkce IFN- $\gamma$  v místě infekce (McDonald a kol. 1992, Culshaw a kol. 1997).

Přestože *C. muris* osidluje výhradně žlázatou část žaludku, vývoj imunitní odpovědi nikdy nebyl studován v této části GIT s výjimkou této práce. Infikované myši vyvíjely buněčnou imunitní odpověď, která vedla k jejich uzdravení během primární infekce a k jejich následné kompletní rezistenci k reinfekci stejným izolátem *C. muris*. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi (McDonald a kol. 1992,

Tilley a kol. 1995). Naše experimenty také ukázaly velmi blízký vztah mezi migrací T-lymfocytů do žaludečního epitelu a vývojem specifické imunity proti žaludečním kryptosporidím.

Vzhledem k neinfekčnosti *C. andersoni* LI03 pro myši nebyly dosud provedeny žádné experimenty popisující vývoj imunitní odpovědi k *C. andersoni*. V této studii bylo prokázáno, že se po podání oocyst imunokompetentním BALB/c myším vyvíjí buněčná imunita, i když migrace T-lymfocytů do žaludeční sliznice není tak masivní jako během primární infekce izoláty *C. muris* a průběh infekce myši *C. andersoni* LI03 byl o 7 DPI pomalejší. Aktivace imunitního systému v nevnímavém hostiteli může být způsobena proběhnutím části vývojového cyklu *C. andersoni* v žaludeční sliznici, který byl přerušen kvůli nevhodným podmínkám či imunitní odpovědi nevnímavého hostitele.

Oproti střevní sliznici, která obsahuje vysoké množství IELs (10-20 IELs/100 epitelálních buněk) (Janeway a kol. 2005) z důvodu přítomnosti Peyerových plaků, žaludek neinfikovaných kontrolních myši obsahoval velmi malé množství IELs (755,4±163,2 IELs/žaludek). V žaludeční sliznici myši infikovaných *C. muris* CB03 a TS03 byly během primární infekce pozorovány výrazné změny v poměru CD4+ a CD8+ T-lymfocytů v žaludečním epitelu až na 0,6:1 (*C. muris* CB03) a 1,1:1 (*C. muris* TS03). Zároveň se mnohonásobně zvýšila množství CD4+ a CD8+ T-lymfocytů (600× a 1300×) ve srovnání s negativní kontrolou.

Nejvýraznější změny poměru ve prospěch CD4+ T-lymfocytů vůči CD8+ T-lymfocytům (3,5:1) byly pozorovány po infikování myši *C. andersoni* LI03, avšak celková množství CD4+ T-lymfocytů se zvýšila pouze 180× a CD8+ T-lymfocytů dokonce pouze 90×.

Tyto data naznačují, že CD8+ T-lymfocyty přispívají k imunitní kontrole při žaludeční kryptosporidiióze. Tato hypotéza je podpořena i studií McDonalda a kolegů (1994), kde podání anti-CD8 protilátek BALB/c myším infikovaným *C. muris* vedlo ke zvýšení intenzity infekce oproti infikovaným myším, kterým podána protilátka nebyla. Naproti tomu, Leav a kolegové (2005) ukázali, že CD8+ T-lymfocyty pravděpodobně mají potenciální ochrannou roli v imunitní odpovědi imunokompetentních myši proti infekci *C. parvum* na základě migrace CD8+ T-lymfocytů do střevní sliznice.

Izolát *C. muris* shodný s izolátem použitým k primární infekci nebyl schopen reinfikovat imunokompetentní BALB/c myši, což odpovídá předešlým publikovaným výsledkům (McDonald a kol. 1992, 1994; Kváč a kol. 2009). Počet T-lymfocytů přítomných v žaludečním epitelu během reinfekce byl velmi nízký ve srovnání

s primární infekcí. Během reinfekce se množství T-lymfocytů v žaludečním epitelu zvýšilo pouze 2× (*C. muris* CB03) nebo 2,5× (*C. muris* TS03). Subpopulace  $\gamma\delta$  T-lymfocytů byla ale v žaludeční sliznici přítomna v 6,1× větším množství oproti primární infekci.

Funkce  $\gamma\delta$  T-lymfocytů není dosud zcela objasněná, předpokládá se, že by mohly být zapojeny ve zprostředkování vrozené i adaptivní imunity, prezentace antigenu jiným T-lymfocytům a že snižují zánětlivou odpověď (Born a kol. 2006). Jejich roli při kryptosporidióze sledoval Eichelberger a kolegové (2000) a dokázali, že po infikování myši, které byly deficientní pro  $\alpha\beta$  T-lymfocyty, se zvýší množství  $\gamma\delta$  T-lymfocytů v *lamina propria*, které přispějí k ochraně proti infekci *C. parvum*. Na základě tohoto experimentu se předpokládá, že  $\gamma\delta$  T-lymfocyty se účastní imunitní odpovědi proti kryptosporidióze, ale pro vyléčení jsou nezbytné CD4+ a CD8+ T-lymfocyty.

Detekcí cytokinů byla zaznamenána velmi nízká produkce IFN- $\gamma$  v průběhu primární infekce, zatímco během reinfekce došlo k výraznému zvýšení koncentrace IFN- $\gamma$  (22×), což může být způsobeno přítomností paměťových T-lymfocytů, které umožnily rychlejší specifickou imunitní odpověď. Po infikování myši *C. andersoni* LI03 bylo rovněž pozorováno zvýšení hladiny IFN- $\gamma$  v *ex vivo* kulturách splenocytů a jeho koncentrace byla 2,2× větší než u myši během primární infekce *C. muris* CB03 a TS03, což společně s faktem, že izolát *C. andersoni* LI03 není infekční pro myši vede k úvaze o významu IFN- $\gamma$  v imunitní odpovědi proti kryptosporidióze. Podobného výsledku bylo dosaženo experimenty na myších se zhoršenou funkcí IFN- $\gamma$ , které měly mnohem těžší, často letální, průběh kryptosporidiózy (Hayward a kol. 2000, Tessema a kol. 2009).

Možnost kontroly infekce *C. muris* vyžadující současnou přítomnost IFN- $\gamma$  a CD4+ T-lymfocytů byla prokázána adoptivními přenosy IELs (McDonald a kol. 1996, Culshaw a kol. 1997). Nicméně Leav s kolegy (2005) prokázali, že IFN- $\gamma$  produkovaný CD8+ T-lymfocyty v populaci střevních IELs zabraňuje rozmnožování *C. parvum* v počátečních stádiích infekce imunokompetentních myši.

Všechny výše uvedené poznatky vedou k závěru, že během kryptosporidiózy se vyvíjí buněčná imunitní odpověď založená na T-lymfocytech a T<sub>H1</sub> cytokinech, zejména IFN- $\gamma$ . Navíc, absence produkce IL-10, který patří mezi T<sub>H2</sub> cytokiny, v *ex vivo* kulturách splenocytů myši infikovaných *C. muris* CB03 a TS03 a pokles hladiny IL-10 po výrazném zvýšení koncentrace IFN- $\gamma$  během infekce *C. andersoni* LI03 ukazuje, že humorální odpověď založená na T<sub>H2</sub> cytokinech pravděpodobně nehraje důležitou roli

v eliminaci parazita a vytvoření rezistence hostitele proti kryptosporidiové infekci, což odpovídá předešlým poznatkům (Taghi-Kilani a kol. 1990, McDonald a kol. 1992, Chen a kol. 2003).

Na základě výsledků této studie lze konstatovat, že protektivní imunita proti žaludečním kryptosporidiím savců je založena na  $T_{HI}$  imunitní odpovědi a charakterizována zvýšenou migrací T-lymfocytů do sliznice žaludku a produkcí IFN- $\gamma$ . Navíc  $CD8^+$  T-lymfocytů hrají pravděpodobně v imunitní odpovědi proti kryptosporidiióze důležitější roli než se předpokládalo. Tuto hypotézu podporují i výsledky předběžných experimentů na  $CD8^{-/-}$  myších, které nebyly schopny překonat infekci *C. muris* v průběhu 90 dnů po infekci (nepublikovaná data).

Ovšem není dosud známo, jaký je přesný mechanismus působení T-lymfocytů na imunitní buňky.  $CD4^+$  T-lymfocyty, které mají podle dosud publikovaných poznatků zásadní význam pro kontrolu kryptosporidiiózy (Ungar a kol. 1991, McDonald a kol. 1992, 1994, Tilley a kol. 1995), mohou produkovat  $T_{HI}$  cytokiny a tím způsobovat infiltraci zánětlivých buněk. Jejich další možnou funkcí je aktivace  $CD8^+$  T-lymfocytů, které pravděpodobně specificky zabíjí infikované buňky. Avšak přesné působení  $CD8^+$  T-lymfocytů v imunitní odpovědi během kryptosporidiiózy je dosud nejasné, nejpravděpodobnějším mechanismem se jeví cytotoxické působení na infikovanou buňku a indukce apoptózy systémem perforin-granzymy, popř. působením přes Fas receptory. Jinou možností je opět produkce cytokinů (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ). Cytotoxicky ničit infikované buňky jsou také schopny  $CD4^+$  T-lymfocyty, které navozují lýzu buňky vazbou přes Fas receptory (Janeway a kol. 2005).

Všechny výše uvedené možnosti působení T-lymfocytů a cytokinů na buňky infikované žaludečními kryptosporidiiemi budou předmětem našeho dalšího studia.

## 6. ZÁVĚRY

Během primární infekce BALB/c myších infikovaných *C. muris* CB03 a TS03 byly zaznamenány histopatologické změny v žaludeční sliznici a přítomnost oocyst v trusu. Statisticky významné rozdíly v průběhu infekcí mezi těmito dvěma různými izoláty byly pozorovány pouze v délce patentní periody, prepatentní perioda nebyla odlišná. Během reinfekce nebyly zaznamenány žádné histopatologické změny v žaludeční sliznici a rovněž nedocházelo k vylučování oocyst.

V průběhu primární infekce BALB/c myši žaludečními kryptosporidii *C. muris* CB03 a TS03 probíhala výrazná migrace T-lymfocytů, zejména CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, do místa infekce. Při reinfekci byla migrace pozorována také, ale T-lymfocyty byly v žaludku přítomny v menším množství. Žádné statisticky významné rozdíly mezi infekcemi myši těmito dvěma izoláty nebyly zjištěny.

Nízká produkce INF- $\gamma$  byla zaznamenána během primární infekce v *ex vivo* kulturách splenocytů z myši infikovaných *C. muris* CB03 a TS03 během primární infekce, která se ale v průběhu reinfekce výrazně zvýšila. Statisticky významný rozdíl v produkci INF- $\gamma$  myšmi infikovanými izoláty *C. muris* CB03 a TS03 nebyl zjištěn. Produkce IL-10 v *ex vivo* kulturách splenocytů z myši infikovaných *C. muris* CB03 a TS03 nebyla zaznamenána.

Po infikování myši *C. andersoni* LI03 nebyla pozorována přítomnost oocyst v trusu ani histopatologické změny ve sliznici žaludku. Po podání oocyst *C. andersoni* LI03 BALB/c myším byla prokázána migrace T-lymfocytů do žaludečního epitelu, která byla statisticky významně nižší než u myši infikovaných *C. muris* CB03 a TS03.

Statisticky významně vyšší produkce INF- $\gamma$  byla zaznamenána v *ex vivo* kulturách splenocytů u myši infikovaných *C. andersoni* LI03 oproti myším během primární infekce *C. muris* CB03 a TS03. Překvapivě byla detekována i produkce IL-10 v *ex vivo* kulturách splenocytů u myši po infekci *C. andersoni* LI03.

## 7. LITERATURA

- Abrahamsen M.S., Lancto C.A., Walcheck B., Layton W., Jutila M.A. 1997.** Localization of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-infected tissues in naive and immune calves. *Infect. Immun.* 65: 2428-2433.
- Aguirre S.A., Mason P.H., Perryman L.E. 1994.** Susceptibility of major histocompatibility (MHC) class I and class II deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 62: 697-699.
- Anderson B.C. 1987.** Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24: 235-238.
- Anderson B.C., 1991.** Experimental infection in mice of *Cryptosporidium muris* isolated from a camel. *J. Protozool.* 38: 16-17.
- Arrowood B.C., Sterling C.R. 1987.** Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73: 314-319.
- Aydin Y., Özkul I.A. 1996.** Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Vet. Parasitol.* 66: 257-262.
- Blanshard C., Jackson A.M., Shanson D.C., Francis N., Gazzard B.G. 1992.** Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Q. J. Med.* 85: 813-823.
- Boher Y., Perez-Schael I., Caceres-Dittmar G., Urbina G., Gonzalez R., Kraal G., Tapia F.J. 1994.** Enumeration of selected leukocytes in the small intestine of BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 145-151.
- Born W.K., Reardon C.L., O'Brien R.L. 2006.** The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 31-38.
- Bowdish D.M., Davidson D.J., Hancock R.E. 2006.** Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 306: 27-66.
- Bull S., Chalmers R., Sturdee A.P., Curry A., Kennaugh J. 1998.** Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoklonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Vet. Parasitol.* 77: 195-197.
- Carreno R.A., Martin D.S., Barta J.R. 1999.** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85: 899-904.

- Corliss J.O. 1994.** An interim utilitarian ("user friendly") hierarchical classification and characterization of the protist. *Acta Protozool.* 33: 1-51.
- Culshaw R.J., Bancroft G.J., McDonald V. 1997.** Gut intraepithelial lymphocytes induce immunity against *Cryptosporidium* infection through a mechanism involving gamma interferon production. *Infect. Immun.* 65: 3074-3079.
- Current W.L. 1988.** The biology of *Cryptosporidium*. *Am. Soc. Microbiol. News.* 54: 605-611.
- Current W.L., Blagburn B.L. 1990.** *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. In Long P.L. (Ed.): *Coccidiosis of man and domestic animals.* CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 155-185.
- Current W.L., Garcia L.S. 1991.** Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 325-358.
- 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: 289-296.
- Deng M.Q., Cliver D.O. 1999.** Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. *Parasitol. Res.* 85: 733-736.
- Dolejš P. 2004:** *Cryptosporidium* a *Giardia*: přehled vodárenské problematiky za první desetiletí po událostech Milwaukee (USA). *Vodní hospodářství.* 54: 271-273.
- Dubey J.P., Markovits J.E., Killary K.A. 2002.** *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet. Pathol.* 39: 363-371.
- Ehigiator H.N., Romagnoli P., Borgelt K., Fernandez M., McNair N., Secor W.E., Mead J.R. 2005.** Mucosal cytokine and antigen-specific responses to *Cryptosporidium parvum* in IL-12p40 KO mice. *Parasite Immunol.* 27: 17-28.
- Eichelberger M.C., Suresh P., Rehg J.E. 2000.** Protection from *Cryptosporidium parvum* infection by gammadelta T cells in mice that lack alphabeta T cells. *Comp. Med.* 50: 270-276.
- Elliot D.A., Coleman D.J., Lane M.A., May R.C., Machesky L.M., Clark D.P. 2001.** *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerisation. *Infect. Immun.* 69: 5940-5942.

- Enriquez F.J., Sterling C.R. 1991.** *Cryptosporidium* infections in inbred strains of mice. J. Protozool. 38: 100S-102S.
- Enriquez F. J., Sterling C. R. 1993.** Role of CD4+ TH1- and TH2-cell-secreted cytokines in cryptosporidiosis. Folia Parasitol. 40: 307-311.
- Esteban E., Anderson B.C. 1995.** *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. J. Dairy Sci. 78: 1068-1072.
- Fayer R. 2003.** *Cryptosporidium*: From molecules to disease. In Thompson R.C.A., Armson A., Ryan U.M., (Eds.): *Cryptosporidium*: From molecules to disease. Elsevier. pp. 11-18.
- Fayer R., Gasbarre L., Pasquali P., Canals A., Almeria S., Zarlenga D. 1998.** *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. Int. J. Parasitol. 28: 49-56.
- Fayer R., Morgan U., Upton S.J. 2000.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. 30: 1305-1322.
- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. 1997:** The general biology of *Cryptosporidium*. In Fayer R. (Ed.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press. pp. 2-33.
- Feng Y., Alderisio K.A., Yang W., Blancero L.A., Kuhne W.G., Ndareski C.A., Reid M., Xiao L. 2007.** *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6475-6483.
- Flanigan T., Whalen C., Turner J., Soave R., Toerner J., Havlir D., Kotler D. 1992.** *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. Am. Intern. Med. 116: 840-842.
- Gao G.F., Rao Z., Bell J.I. 2002.** Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. Trends Immunol. 23: 408-313.
- Guyot K., Follet-Dumoulin A., Lelièvre E., Sarfati C., Rabodonirina M., Nevez G., Cailliez J.C., Camus D., Dei-Cas E. 2001.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. J. Clin. Microbiol. 39: 3472-3480.
- Heine J., Moon H.W., Woodmansee D.B. 1984.** Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. Infect. Immun. 43: 856-859.
- Harp J.A., Whitmire W.M., Sacco R. 1994.** In vitro proliferation and production of gamma interferon by murine CD4+ cells in response to *Cryptosporidium parvum* antigen. J. Parasitol. 80: 67-72.



- Hayday A., Tigelaar R. 2003.** Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 233-42.
- Hayward A.R., Chmura K., Cosyns M. 2000.** Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J. Infect. Dis.* 182: 1001-1004.
- Hill B.D., Blewett D.A., Dawson A.M., Wright S. 1990.** Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. *Res. Vet. Sci.* 48: 76-81.
- Hůrková L., Hajdušek O., Modrý D. 2003.** Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *J. Wildl. Dis.* 39: 441-444.
- Chalmers R.M., Sturdee A.P., Bull S.A., Miller A., Wright S.E. 1997.** The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol. Res.* 83: 478-482.
- Chappell C.L., Okhuysen P.C., White A.C. 2003.** *Cryptosporidium parvum*: Infectivity, pathogenesis and host-parasite relationship. In Thompson R.C.A., Armson A., Ryan U.M. (Eds.): *Cryptosporidium: From molecules to disease*. Elsevier. pp. 19-49.
- Chen W., Harp J.A., Harmsen A.G. 1993.** Requirements for CD4+ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infect. Immun.* 61: 3928-3932.
- Chen W., Harp J.A., Harmsen A.G. 2003.** *Cryptosporidium parvum* infection in gene-targeted B cell-deficient mice. *J. Parasitol.* 89: 391-393.
- Iseki M., Maekawa T., Moriya K., Uni S., Takada S. 1989.** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75: 218-222.
- Iseki M. 1986.** Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.* 35: 521-526.
- Janeway Ch.A., Travers P., Walport P., Shlomchik M.J. 2005.** *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Garland Science Publishing. 823 pp.
- Kapel N., Benhamou Y., Buraud M., Magne D., Opolon P., Gobert J.G. 1996.** Kinetics of mucosal ileal gamma-interferon response during cryptosporidiosis in immunocompetent neonatal mice. *Parasitol. Res.* 82: 664-667.

- Katsumata T., Hosea D., Ranuh I.G., Uga S., Yanagi T., Kohno S. 2000.** Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62: 70-72.
- Kearsey J.A., Stadnyk A.W. 1996.** Isolation and characterization of highly purified rat intestinal intraepithelial lymphocytes. J. Immunol. Methods. 194: 35.
- Kelly P., Jack D.L., Naeem A., Mandanda B., Pollok R.C., Klein N.J., Turner M.W., Farthing M.J. 2000.** Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. Gastroenterology. 119: 1236-1242.
- Kodádková A. 2007.** Žaludeční kryptosporidie exotických zvířat v ZOO. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 27 pp.
- Koudela B., Modrý D., Vítovec J. 1998.** Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. Vet. Parasitol. 76: 181-188.
- Koyama Y., Satoh M., Maekawa K., Hikosaka K., Nakai Y. 2005.** Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. Vet. Parasitol. 130: 323–326.
- Kuhls T.L., Mosier D.A., Abrams V.L., Crawford D.L., Greenfield R.A. 1994.** Inability of interferon-gamma and aminoguanidine to alter *Cryptosporidium parvum* infection in mice with severe combined immunodeficiency. J. Parasitol. 80: 480-485.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. 2007.** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). Vet. Parasitol. 143: 229-233.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Hofmannová L., Modrý D., Vítovec J., Xiao L. 2008.** Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. Vet. Parasitol. 153: 363-367.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Secor W.E. 2009.** Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Vet. Parasitol. In press.
- Laurent F., Kagnoff M.F., Savidge T.C., Naciri M., Eckmann L. 1998.** Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. Infect. Immun. 66: 1787-1790.

- Leav B.A., Yoshida M., Rogers K., Cohen S., Godiwala N., Blumberg R.S., Ward H. 2005.** An early intestinal mucosal source of gamma interferon is associated with resistance to and control of *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infect. Immun.* 73: 8425-8428.
- Lindsay D.S., Upton S.J., Owens D.S., Morgan U.M., Mead J.R., Blagburn B.L. 2000.** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apikomlexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 47: 91-95.
- Lupo P.J., Langer-Curry R.C., Robinson M., Okhuysen P.C., Chappell C.L. 2008.** *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78: 917-921.
- MacDonald T.T., Spencer J. 1992.** Cell-mediated immune injury in the intestine. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 21: 367-386.
- Matsubayashi M., Kimata I., Abe N., Tani H., Sasai K. 2004.** The detection of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* oocyst in cattle in Japan. *Parasitol. Res.* 93: 504-506.
- Matsubayashi M., Kimata I., Iseki M., Hajiri T., Tani H., Sasai K., Baba E. 2005.** Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 129: 165-168.
- McDonald V. 1999.** Gut intraepithelial lymphocytes and immunity to Coccidia. *Parasitol Today.* 15: 483-487.
- McDonald V., Bancroft G.J. 1994.** Mechanisms of innate and acquired resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. *Parasite Immunol.* 16: 315-320.
- McDonald V., Deer R., Uni S., Iseki M., Bancroft G.J. 1992.** Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect. Immun.* 60: 3325-3331.
- McDonald S.A., O'Grady J.E., Bajaj-Elliott M., Notley C.A., Alexander J., Brombacher F., McDonald V. 2004.** Protection against the early acute phase of *Cryptosporidium parvum* infection conferred by interleukin-4-induced expression of T helper 1 cytokines. *J. Infect. Dis.* 190: 1019-1025.
- McDonald V., Robinson H.A., Kelly J.P., Bancroft G.J. 1994.** *Cryptosporidium muris* in adult mice: adoptive transfer of immunity and protective roles of CD4 versus CD8 cells. *Infect. Immun.* 62: 2289-2294.

- McDonald V., Robinson H.A., Kelly J.P., Bancroft G.J. 1996.** Immunity to *Cryptosporidium muris* infection in mice is expressed through gut CD4+ intraepithelial lymphocytes. *Infect. Immun.* 64: 2556-2562.
- McDonald V., Smith R., Robinson H., Bancroft G. 2000.** Host immune responses against *Cryptosporidium*. *Contrib. Microbiol.* 6: 75-91.
- Mead J.R., Arrowood M.J., Sidwell R.W., Healey M.C. 1991.** Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. *J. Infect. Dis.* 163: 1297-1304.
- Miláček P., Vítovec J. 1985.** Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazin in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32: 50.
- Miller T.A., Schaefer F.W. 2007.** Characterization of a *Cryptosporidium muris* infection and reinfection in CF-1 mice. *Vet. Parasitol.* 144: 208-21
- Morgan U.M., Monis P.T., Xiao L., Limor J., Sulaiman I., Raidal S., O'Donoghue P., Gasser R., Murray A., Fayer R., Blagburn B.L., Lal A.A., Thompson R.C. 2001.** Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.* 31: 289-296
- Navin T.R., Hardy A.M. 1987.** Cryptosporidiosis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 155: 150.
- Neumayerová H., Koudela B. 2008.** Effects of low and high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium muris* oocysts suspended in water. *Vet. Parasitol.* 153: 197–202.
- O'Donoghue P.J. 1995.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Inter. J. Parasitol.* 25: 139-195.
- Ondráčková Z. 2007.** Infektivita *Cryptosporidium andersoni* pro různé druhy hlodavců. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 42 pp.
- Pavlásek I., Lávička M. 1995.** The first finding of a spontaneous gastric cryptosporidiosis infection in hamsters (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903) *Vet. Med. (Praha).* 40: 261-263.
- Peeters J.E., Villacorta I., Vanopdenbosch E., Vanderghenst D., Naciri M., Ares-Mazás E., Yvoré P. 1992.** *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses

- (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Infect. Immun.* 60: 2309-2316.
- Pospischil A., Stiglmeier M.T., Hegel G., Wiener H. 1987.** Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet. Rec.* 112: 379-380.
- Ramirez N.E., Ward L.A., Sreevatsat S. 2004.** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect.* 6: 773-785.
- Rhee J.K., Kim H.C., Eun G.S. 1998.** Infection kinetics and developmental biology of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in Korean native kids and Corriedale lambs. *Korean J. Parasitol.* 36: 171-181.
- Rhee J.K., So W.S., Kim H.C. 1999.** Age-dependent resistance to *Cryptosporidium muris* (strain MCR) infection in golden hamsters and mice. *Korean J. Parasitol.* 37: 33-37.
- Rhee J.K., Yook S.Y., Park B.K. 1995.** Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in mice. *Korean J. Parasitol.* 33: 377-382.
- Riggs M.W. 2002.** Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes Infect.* 4: 1067-1080.
- Roder J., Duwe A. 1979.** The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. *Nature.* 278: 451-453.
- Ryan U.M., Bath C., Robertson I., Read C., Elliot A., McInnes L., Traub R., Besier B. 2005.** Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4992-4997.
- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A.A., Pavlásek I. 2003.** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4302-4307.
- Santín M., Dixon B.R., Fayer R. 2005.** Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from ringed seals (*Phoca hispida*) in Northern Quebec, Canada. *J. Parasitol.* 91: 712-716.
- Satoh M., Hikosaka K., Sasaki T., Suyama Y., Yanai T., Ohta M., Nakai Y. 2003.** Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 691-692.
- Sterling C.R., Seegar K., Sinclair N.A. 1986.** *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. *J. Infect. Dis.* 153: 380-381.

- Svezhova N.V. 1997.** The interrelationships of the coccidian *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Sporozoa) with the cells of the immune system in the mammalian host. *Parazitologiya*. 31: 328-33.
- Taghi-Kilani R., Sekla L., Hayglass K.T. 1990.** The role of humoral immunity in *Cryptosporidium* spp. infection. Studies with B cell-depleted mice. *J. Immunol.* 145: 1571-1576
- Tessema T.S., Schwamb B., Lochner M., Förster I., Jakobi V., Petry F. 2009.** Dynamics of gut mucosal and systemic Th1/Th2 cytokine responses in interferon-gamma and interleukin-12p40 knock out mice during primary and challenge *Cryptosporidium parvum* infection. *Immunobiology*. In press.
- Thompson R.C.A., Olson M.E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M.S., Hijawi N.S. 2005.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77-158.
- Tilley M., McDonald V., Bancroft G.J. 1995.** Resolution of cryptosporidial infection in mice correlates with parasite-specific lymphocyte proliferation associated with both Th1 and Th2 cytokine secretion. *Parasite Immunol.* 17: 459-464.
- Trout J.M., Santín M., Fayer R. 2006.** *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 37: 141-144.
- Tyzzar E.E. 1907.** A sporozoan found in the peptic flanda of the common mouse. *Proc. Doc. Exp. Biol. Med.* 5: 12-13.
- Tyzzar E.E. 1910.** An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 394-414.
- Tyzzar E.E. 1912.** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394-412.
- Ungar B.L.P., Burris J.A., Quinn C.A., Finkelman F.D. 1990.** New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. *Infect. Immun.* 58: 961-969.
- Ungar B.L., Kao T.C., Burris J.A., Finkelman F.D. 1991.** *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol.* 147: 1014-1022.
- Ungar B.L., Soave R., Fayer R., Nash T.E. 1986.** Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *J. Infect. Dis.* 153: 570-578.
- Upton S.J., Current W.L. 1985.** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) infecting mammals. *J. Parasitol.* 71: 625-629.

- Urban J.F., Fayer R., Chen S.J., Gause W.C., Gately M.K., Finkelman F.D. 1996.** IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. J. Immunol. 156: 263-268.
- Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J. 2007.** An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. J. Eucaryot. Microbiol. 54: 495-510.
- Vítovec J., Hamadejová K., Landová L., Kváč M., Květoňová D., Sak B. 2006.** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. J. Ved. Med. 53: 239-243.
- Warren K.S., Swan R.A., Morgan-Ryan U.M., Friend J.A., Elliot A. 2003.** *Cryptosporidium muris* infection in bilbies (*Macrotis lagotis*). Aust. Vet. J. 81: 739-741.
- Waters W.R., Harp J.A. 1996.** *Cryptosporidium parvum* infection in T-cell receptor (TCR)-alpha- and TCR-delta-deficient mice. Infect. Immun. 64: 1854-1857.
- Wyatt C.R., Brackett E.J., Barrett W.J. 1999.** Accumulation of mucosal T lymphocytes around epithelial cells after in vitro infection with *Cryptosporidium parvum*. J. Parasitol. 85: 765-768.
- Wyatt C.R., Brackett E.J., Savidge J. 2001.** Evidence for the emergence of a type-1-like immune response in intestinal mucosa of calves recovering from cryptosporidiosis. J. Parasitol. 87: 90-95
- Xiao L., Ryan U.M., Graczyk T.K., Limor J., Li L., Kombert M., Junge R., Sulaiman I.M., Zhou L., Arrowood M.J., Koudela B., Modrý D., Lal A.A. 2004.** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. Appl. Environ. Microbiol. 70: 891-899.
- Zhu G., Marchewka M.J., Keithly J.S. 2000.** *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. Mikrobiol. 146: 315-321.
- Zintl A., Neville D., Maguire D., Fanning S., Mulcahy G., Smith H.V., De Waal T. 2007.** Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. Parasitology 134: 1575-1582.