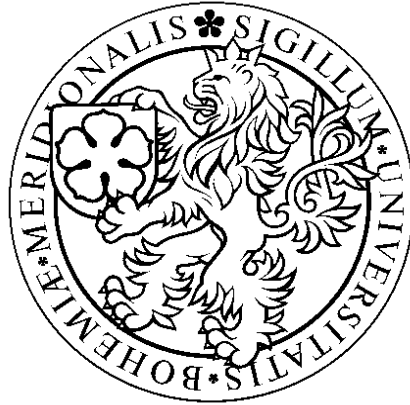


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Vývoj protektivní imunitní odpovědi v žaludečním epitelu
myši infikovaných *Cryptosporidium muris* a
*Cryptosporidium andersoni***

Diplomová práce

Bc. Marie Jalovecká

Školitel: doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Školitelé specialisti: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D. a RNDr. Jiří Salát, Ph.D.

České Budějovice 2011

Jalovecká M., 2011: Vývoj protektivní imunitní odpovědi v žaludečním epitelu myší infikovaných *Cryptosporidium muris* a *Cryptosporidium andersoni* [Development of protective immune response in gastric mucosa of mice infected with *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*]. 95 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE

The development of immune response accountable for the ability to control *Cryptosporidium muris* TS03 infection was studied using immunocompetent and various types of immunodeficient mouse models. Subsequently the immune response was characterized by analysis of leukocyte infiltration and cytokine production in gastric epithelium. Moreover, the potentiality of immunocompetent mice to develop effective immune response to *C. andersoni* LI03 infection with consequent protection to consequent infection of the same mice with *C. muris* TS03 was also studied by monitoring oocysts shedding, leukocyte infiltration of the gastric mucosa and cytokine production in *ex vivo* cultures of splenocytes.

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

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem Grantové Agentury Akademie Věd České republiky KJB 500960701 a grantovým projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky LH11061 (řešitel doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.)

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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 jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. 12. 2011

Bc. Marie Jalovecká

.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli Martinu Kváčovi za vedení mé práce, trpělivost a ochotu mi kdykoliv pomoci. Svým školitelům specialistům Bohumilu Sakovi a Jiřímu Salátovi moc děkuji za pomoc s metodickými postupy a za podnětné konzultace. Zvláštní poděkování patří Zdeňku Cimburkovi a Jiřímu Šinkorovi za velmi cennou pomoc s metodickými postupy multibarevné průtokové cytometrie; a také Danielu Růžkovi za ochotu a pomoc s metodou real-time PCR. Za pomoc při statistickém vyhodnocení výsledků velmi děkuji Michaelu Rostovi. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za vstřícné a přátelské prostředí a rovněž i všem pracovníkům Oddělení imunologie parazitů PaÚ BC AV ČR, v.v.i. za umožnění přístupu do jejich laboratoří.

Mimořádné poděkování patří mým rodičům, kterým děkuji za jejich podporu při mém studiu, a také Tomášovi za trpělivost, cenné rady a připomínky.

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1 BIOLOGIE RODU <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	1
1.1.1 Historie	1
1.1.2 Taxonomie a hostitelská specifita	1
1.1.3 Vývojový cyklus.....	3
1.1.4 Klinické projevy onemocnění.....	4
1.1.5 Epidemiologie.....	5
1.2 ŽALUDEČNÍ KRYPTOSPORIDIE SAVCŮ	5
1.2.1 <i>Cryptosporidium muris</i> Tyzzer, 1907.....	5
1.2.2 <i>Cryptosporidium andersoni</i> Lindsay a kol., 2000	7
1.3 IMUNITNÍ ODPOVĚĎ HOSTITELE PŘI KRYPTOSPORIDIÓZE	8
1.3.1 Přirozená imunita.....	9
1.3.2 Adaptivní imunita: vývoj k buněčné a humorální imunitě	11
1.3.3 Humorální imunita.....	11
1.3.3 Buněčná imunita	12
1.3.4.1 TCR $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$	12
1.3.4.2 CD4+ a CD8+ T-lymfocyty.....	13
1.3.4.3 Intraepiteliální leukocyty (IELs)	15
1.3.3.4 Paměťové T-lymfocyty.....	16
1.3.5 Cytokinová kontrola kryptosporidiózy	16
2. CÍLE PRÁCE	20
3. MATERIÁL A METODIKA	21
3.1 MATERIÁL	21
3.1.1 Paraziti.....	21
3.1.2 Experimentální zvířata.....	21
3.2 METODIKA	22
3.2.1 Purifikace oocyst	22
3.2.1.1 Sacharózový gradient	22
3.2.1.2 Cesium chloridový gradient	22
3.2.1.3 Odstranění parazitární, mykotické, bakteriální a virové kontaminace	23
3.2.1.4 Test viability oocyst.....	23
3.2.2 Průběh experimentu.....	24

3.2.2.1 Experimentální infekce a reinfekce imunokompetentních a imunodeficientních C57BL/6 myši <i>Cryptosporidium muris</i> TS03	24
3.2.2.2 Experimentální infekce imunokompetentních BALB/c myši <i>Cryptosporidium andersoni</i> LI03 a následná infekce <i>C. muris</i> TS03	25
3.2.3 Parazitologické vyšetření trusu.....	26
3.2.3.1 Barvení dle Miláčka a Vítovce	26
3.2.4 Molekulární vyšetření trusu.....	26
3.2.4.1 Izolace DNA	27
3.2.4.2 Nested PCR	27
3.2.4.3 Gelová elektroforéza	28
3.2.4.4 Sekvenace	29
3.2.5 Izolace IELs.....	29
3.2.6 Izolace splenocytů	30
3.2.7 Průtoková cytometrie (FACC)	30
3.2.8 ELISA test	33
3.2.9 Sledování změn genové exprese IFN γ	34
3.2.9.1 Izolace RNA	34
3.2.9.2 Reverzní transkripce	35
3.2.9.3 Real-time PCR.....	35
3.2.10 Statistické zpracování výsledků.....	36
4. VÝSLEDKY	38
4.1 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE A REINFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH A IMUNODEFICIENTNÍCH C57BL/6 MYŠÍ <i>CRYPTOSPORIDIUM MURIS</i> TS03	38
4.1.1 Průběh infekce	38
4.1.2 Sledování množství IELs v žaludečním epitelu	40
4.1.2.1 Primární infekce <i>C. muris</i> TS03 imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4 ^{-/-} a C57BL/6 CD8 ^{-/-} myši.....	40
4.1.2.1.1 Množství leukocytů	40
4.1.2.1.2 Množství T- a B-lymfocytů	42
4.1.2.1.3 Množství CD4 ⁺ , CD8 ⁺ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů.....	44
4.1.2.1.4 Množství NK buněk, monocytů/makrofágů a granulocytů	47
4.1.2.2 Primární infekce a reinfekce <i>C. muris</i> TS03 imunokompetentních C57BL/6 myši	50

4.1.2.2.1 Množství leukocytů	50
4.1.2.2.2 Množství T- a B-lymfocytů	50
4.1.2.2.3 Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů	51
4.1.2.2.4 Množství NK buněk, monocytů/makrofágů a granulocytů	53
4.1.3 Sledování změn genové exprese IFN γ v žaludečním epitelu	54
4.1.4 Analýza splenocytů	55
4.2 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH BALB/c MYŠÍ	
<i>CRYPTOSPORIDIUM ANDERSONI</i> LI03 A NÁSLEDNÁ INFEKCE	
<i>C. MURIS</i> TS03	56
4.2.1 Průběh infekce	56
4.2.2 Sledování množství IELs v žaludečním epitelu	56
4.2.2.1 Množství leukocytů	56
4.2.2.2 Množství T- a B-lymfocytů	57
4.2.2.3 Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů	59
4.2.2.4 Množství NK buněk	60
4.2.3 Analýza splenocytů	61
4.2.4 Detekce cytokinů v <i>ex vivo</i> kulturách splenocytů	62
5. DISKUZE	64
5.1 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE A REINFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH	
A IMUNODEFICIENTNÍCH C57BL/6 MYŠÍ <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	
<i>MURIS</i> TS03	64
5.2 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH BALB/c MYŠÍ	
<i>CRYPTOSPORIDIUM ANDERSONI</i> LI03 A NÁSLEDNÁ INFEKCE	
<i>C. MURIS</i> TS03	70
6. ZÁVĚRY	74
6.1 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE A REINFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH	
A IMUNODEFICIENTNÍCH C57BL/6 MYŠÍ <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	
<i>MURIS</i> TS03	74
6.2 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH BALB/c MYŠÍ	
<i>CRYPTOSPORIDIUM ANDERSONI</i> LI03 A NÁSLEDNÁ INFEKCE	
<i>C. MURIS</i> TS03	75
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	77
8. LITERATURA	79

1. ÚVOD

1.1 BIOLOGIE RODU *CRYPTOSPORIDIUM*

Rod *Cryptosporidium* zahrnuje celosvětově rozšířené jednobuněčné oportunní parazity infikující epitelální buňky zejména gastrointestinálního traktu (GIT) řady obratlovců včetně člověka a hospodářských či domácích zvířat (O'Donoghue 1995).

1.1.1 Historie

První zdokumentovaná zmínka o kryptosporidiích pochází z roku 1907 (Tyzzer 1907), kdy Ernest Edward Tyzzer identifikoval parazita nejistého taxonomického zařazení ve žláznaté části žaludku myši a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris*. O dva roky později pak detailně popsal všechna morfologická stádia tohoto parazita a jeho patogenitu v žaludečních žlázách laboratorní myši. Zároveň navrhl nový rod *Cryptosporidium* a *C. muris* jako typový druh tohoto rodu (Tyzzer 1910). V roce 1912 byl popsán další druh patřící do rodu *Cryptosporidium*, *C. parvum*, parazitující v tenkém střevě laboratorní myši, který se vyznačuje menšími oocystami (Tyzzer 1912). Kryptosporidie nebyly v té době považovány za nikterak ekonomicky, lékařsky či veterinárně významné a nebyl proto prováděn žádný intenzivní výzkum (Wetzel 1938). Zájem o tyto parazity dramaticky vzrostl po prvních prokazatelných kryptosporidiiových infekcích lidí (Nime a kol. 1976, Lasser a kol. 1979, Weisburger a kol. 1979) a zejména v důsledku masivní epidemie způsobené kontaminací vodního zdroje v Milwaukee (Wisconsin, USA), kdy bylo postiženo více než 400 000 osob (Mac Kenzie a kol. 1994). Tyto události podnítily studium biologie rodu *Cryptosporidium*, zejména s důrazem na detekci různých vývojových stádií kryptosporidií v prostředí a u nejrůznějších hostitelů, prevenci a léčbu onemocnění.

1.1.2 Taxonomie a hostitelská specifita

Rod *Cryptosporidium* je jednou z bazálních linií kmene Apicomplexa, v němž byl původně řazen do třídy Coccidea (Corliss 1994, Fayer a kol. 1997). Na základě fylogenetické analýzy genu kódujícího RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA) je rod *Cryptosporidium* považován za součást třídy Gregarinae (Carreno a kol. 1999), s níž ho pojí společná nepřítomnost plastidového genomu (Zhu a kol. 2000) a antigenní příbuznost zjištěná monoklonálními protilátkami (Bull a kol. 1998). Jejich společné postavení na bázi kmene Apicomplexa (Carreno a kol. 1999) podporují fylogenetické studie genomů různých druhů z řádu Apicomplexa (Kuo a kol. 2008). Mezi další společné znaky gregarin

a kryptosporidií patří také morfologická stavba organel sloužících k přichycení k hostitelské buňce (Valigurová a kol. 2007).

Na základě morfologie oocyst, lokalizace vývojového cyklu, hostitelské specifity a molekulárních rozdílů je v současné době uznáváno celkem 24 platných druhů patřících do rodu *Cryptosporidium* (Tabulka 1). Je popsáno ale i mnoho genotypů, u kterých je předpoklad budoucího uznání jako samostatné druhy (Xiao a kol. 2004b, Chacín-Bonilla 2007, Plutzer a Karanis 2009).

Tabulka 1. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*

Druh	Hostitel	Lokalizace
<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. cuniculus</i> Robinson a kol., 2010	králíci	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. galli</i> Pavlásek, 1999	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. hominis</i> Morgan-Ryan a kol., 2002	člověk	tenké střevo
<i>C. macropodum</i> Power a Ryan, 2008	klokani	střevo
<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. scophthalmi</i> Alvarez-Pellitero a kol., 2004	platýs	střevo
<i>C. serpentis</i> Levine, 1980	plazi	žaludek
<i>C. suis</i> Ryan a kol., 2004	prasata	žaludek, tlusté střevo
<i>C. tyzzeri</i> Ren a kol., 2011	myši	tenké střevo
<i>C. ubiquitousum</i> Fayer a kol., 2010	skot	střevo
<i>C. varanii</i> Pavlásek a kol., 1995	plazi	žaludek, tenké střevo
<i>C. wrairi</i> Vetterling a kol., 1971	morčata	tenké střevo
<i>C. xiaoi</i> Fayer a Santín, 2009	ovce	střevo

V rámci rodu *Cryptosporidium* lze rozlišovat dvě monofyletické, morfologicky odlišné linie dle lokalizace oocyst v hostiteli: střevní a žaludeční kryptosporidie (Xiao a kol. 2004b). Druhy lokalizované ve střevě mají menší a kulaté oocysty (např. *C. parvum* 5 × 4,5 μm, Tyzzer 1912). Naproti tomu žaludeční druhy mají oocysty větší a oválné (např. *C. andersoni*

8,4 × 6,2 μm, Lindsay a kol. 2000). Výjimku tvoří *C. baileyi* infikující ptáky, které je morfologicky podobné žaludečním kryptosporidiím, ale je lokalizováno v dýchacím ústrojí a v burze Fabricii (Current a kol. 1986, Morgan a kol. 2001).

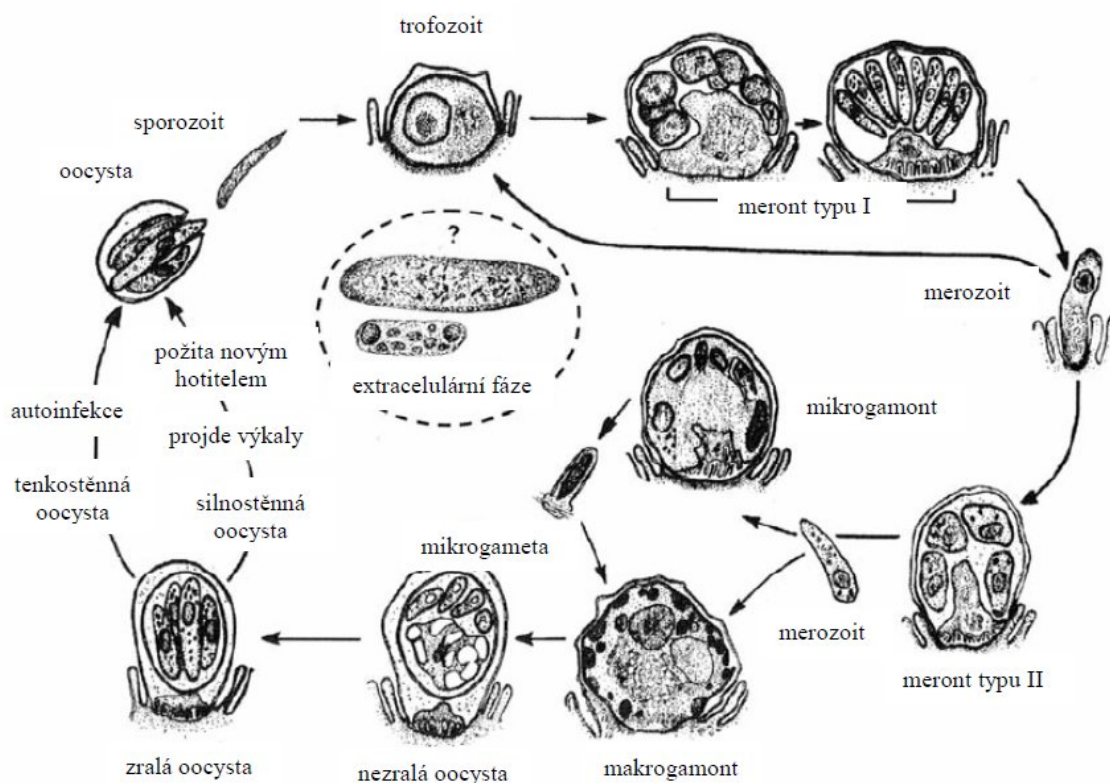
1.1.3 Vývojový cyklus

Vývojový cyklus kryptosporidií (Obrázek 1) je monoxenní (Fayer a kol. 1997, Thompson a kol. 2005) a probíhá v epitelálních buňkách GIT (Current a Blagburn 1990), kde jsou vývojová stádia charakterizována jako epicelulární, což znamená, že parazitická vývojová stádia jsou ukryta v parazitoformním vaku vytvořeném z vnější mikrovilární membrány hostitelské buňky (Valigurová a kol. 2008).

K přenosu oocyst dochází fekálně-orální cestou. Po požití oocyst v kontaminované vodě či potravě dochází k jejich excystaci a uvolnění infekčních stádií, sporozoitů, kteří infikují buňky střevního epitelu a mění se na trofozoity uzavřené v parazitoformním vaku (Elliott a kol. 2001). Zde probíhá dělení jádra a asexuální rozmnožování, tzv. merogonie. Vznikají dva typy merontů, výjimkou je druh *C. baileyi*, který tvoří tři typy merontů (Current a kol. 1986).

Meronti I. typu vytváří 6 – 8 merozoitů a množí se asexuálně, zatímco meronti II. typu vstupují do sexuální fáze (tzv. gametogonie) a vytváří pouze 4 merozoity (Aydin 1997). Meronti II. typu napadají buňky hostitele a transformují se ve dvě sexuální stádia, vícejaderné mikrogamonty tvořící mikrogametocyty a jednojaderné makrogamonty, které dále vytváří makrogametocyty. Z mikrogametocytů vznikají pohyblivé mikrogamety, které migrují a oplodňují makrogamety vzniklé přeměnou makrogametocytů a vzniká zygota. Zygota prochází endogenní sporulací (tzv. sporogonie) a mění se v oocystu, ve které se tvoří čtyři sporozoiti. Vzniklé oocysty jsou dvojího typu: silnostěnné (80 %) a tenkostěnné (20 %). Silnostěnné oocysty trusem opouští tělo hostitele a jsou bezprostředně schopny infikovat dalšího hostitele. Tenkostěnné oocysty slouží k tzv. autoinfekci, kdy excystují v původním hostiteli a uvolnění sporozoiti napadají další epitelální buňky v GIT (Tyzzer 1910, 1912, Uni a kol. 1987, Current 1988)

Žaludeční druhy kryptosporidií mají vývojový cyklus odlišný, protože požití oocyst excystují již v žaludku, nicméně podrobnosti dosud nejsou známy.



Obrázek 1. Schematické znázornění životního cyklu kryptosporidií (Fayer 2008)

1.1.4 Klinické projevy onemocnění

Onemocnění způsobené parazity rodu *Cryptosporidium* (tzv. kryptosporidióza) je řazeno mezi oportunní parazitózy a zoonózy. Klinické projevy tohoto onemocnění závisí na imunitním stavu hostitele a lokalizaci parazita v hostiteli. U imunokompetentních i imunodeficientních jedinců bývá hlavním symptomem infekce kryptosporidiemi s lokalizací v tenkém střevě akutní vodnatý průjem způsobený poškozením střevních buněk (Sterling a kol. 1986), který se ale ne vždy musí projevit (Pettoelo-Mantovani a kol. 1995, Turkcapar a kol. 2002, Hout a kol. 2005). Mohou být přítomny i křečovitě bolesti v abdominální oblasti, nechutenství, nauzea, horečka, malátnost, únava a zvýšené pocení (Fayer 2003, Thompson 2005). Pokud je místem infekce tlusté střevo, onemocnění probíhá bez typických symptomů (Vítovec a kol. 2006). Kryptosporidióza způsobená žaludečními kryptosporidiemi probíhá rovněž asymptomaticky, pouze v několika málo případech byly popsány příznaky spojené s kachexií (Anderson 1987, Pospischil a kol. 1987). U imunokompetentních pacientů dochází většinou k samovyléčení, tzv. „self-cure“ (Chappel a kol. 1999, Xiao a kol. 2004a).

U imunodeficientních jedinců bývá onemocnění chronické, velmi často spojené s diseminací infekce do dalších orgánů, např. do respiračního traktu, slinivky či

do močového měchýře (Current a Garcia 1991, Fayer a kol. 1997). Konečný průběh infekce závisí na stupni imunodeficiencie (Flanigan a kol. 1992). Bez vhodné terapie může mít onemocnění následkem dehydratace a malnutrice fatální následky, obzvláště u HIV pozitivních pacientů, pro které kryptosporidíóza představuje vysoké riziko (Navin a Hardy 1987, Blanshard a kol. 1992, Manabe a kol. 1998).

1.1.5 Epidemiologie

K přenosu oocyst dochází fekálně-orální cestou a možnost přenosu je omezena hostitelskou specifitou parazita. Oocysty mohou být přeneseny buď přímým kontaktem s nakaženým jedincem nebo pozřením kontaminované potravy či vody (Newman a kol. 1994, Fayer a kol. 2000, Cacció 2005, Gait a kol. 2008).

Oocysty mají vysokou životaschopnost a jsou díky své struktuře velmi odolné. Ve vnějším prostředí (ve vodě) jsou schopny přežít až 140 dní (Ramirez a kol. 2004) a odolávají klasickým dezinfekčním úpravám vody včetně chlorování (Dolejš 2004, Domenéch-Sánchez a kol. 2008).

1.2 ŽALUDEČNÍ KRYPTOSPORIDIE SAVCŮ

V současné době jsou známy pouze dva druhy kryptosporidií parazitující v žaludečních žlázách savců, *C. andersoni* a *C. muris*, u nichž byla dosud popsána řada izolátů, odlišujících se zejména v hostitelské specifitě (Tyzzer 1910, Lindsay a kol. 2000, Morgan a kol. 2000, Xiao a kol. 2004a, Kváč a kol. 2007, 2008, 2009, Kodádková a kol. 2010, Feng a kol. 2011). Protože hostitelská specifita je jedním ze základních znaků odlišujících od sebe jednotlivé druhy (Xiao a kol. 2004a), předpokládá se, že oba žaludeční druhy parazitující u savců představují komplex skrytých druhů, stejně jako to bylo prokázáno u střevních druhů kryptosporidií (Kváč a kol. 2008).

1.2.1 *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907

Hostitelské spektrum je u vůbec prvně popsané kryptosporidie, *C. muris* (Tyzzer 1907), mnohem širší než u předchozího druhu *C. andersoni*. Typickými hostiteli jsou hlodavci (Rodentia), zejména z čeledi myšovitých (Muridae). Nicméně *C. muris* můžeme nalézt v řadě rozličných hostitelů (Tabulka 2).

Tabulka 2. Přehled hostitelů *Cryptosporidium muris*

Hostitel	Přirozená infekce	Experimentální infekce
Primates		
<i>Homo sapiens</i>	Katsumata a kol. 2000	
<i>Macaca fascicularis</i>	Dubey a kol. 2002*	
Rodentia		
<i>Cavia porcellus</i>		Aydin a Özkul 1996
<i>Dolichotis patagonum</i>	Xiao a kol. 2004a	
<i>Macrotis lagotis</i>	Warren a kol. 2003	
<i>Tachyoryctes splendens</i>	Kváč a kol. 2008	
<i>Clethrionomys glareolus</i>	Chalmers a kol. 1997	
<i>Microtus brandtii</i>		Hofmannová nepublikováno
<i>Mesocricetus auratus</i>		Rhee a kol. 1999
<i>Phodopus roborovskii</i>	Pavlásek a Lávička 1995	
<i>Phodopus sungorus</i>	Lv a kol. 2009	
<i>Phodopus campbelli</i>	Lv a kol. 2009	
<i>Acomys cahirinus</i>		Kváč 2008
<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>	Tyzzler 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	
Lagomorpha		
<i>Oryctolagus cuniculus</i>		Aydin a Özkul 1996
Carnivora		
<i>Felis catus</i>	Iseki a kol. 1989	
<i>Canis familiaris</i>	Lupo a kol. 2008	Aydin a Özkul 1996
<i>Canis latrans</i>	Trout a kol. 2006	
Pinnipedia		
<i>Phoca hispida</i>	Santín a kol. 2005	
Hyracoidea		
<i>Procravia capensis</i>	Esteban a Anderson 1995	
Artiocadtyla		
<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 a kol. 2010	
<i>Odocoileus heminus</i>	Deng a Cliver 1999*	

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

Přestože člověk není typickým hostitelem *C. muris*, případy infekce lidí jsou již také známy (Katsumata a kol. 2000, Tiangtip a Jongwutiwes 2002, Gatei a kol. 2002).

Infekce *C. muris* není obvykle provázena klinickými příznaky ani zánětlivými procesy v žaludeční sliznici (Iseki a kol. 1989, Özkul a Aydin 1994).

Morfologické studie uvádí velikost plně vysporulovaných oocyst *C. muris* $8,4 (7,5-9,8) \times 6,3 (5,5-7,0) \mu\text{m}$ (Iseki 1986). Velikost oocyst *C. muris* TS03 používaných v této práci byla $8,8 (8,1-9,2) \times 6,2 (5,7-6,9) \mu\text{m}$ (Kváč 2008).

1.2.2 *Cryptosporidium andersoni* Lindsay a kol., 2000

Parazit z rodu *Cryptosporidium* osidlující žlázy slezu u skotu byl poprvé popsán až v roce 1985 (Upton a Current 1985) a protože byl morfologicky totožný s druhem *C. muris* získaným z trusu velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*, Anderson 1991), byly tyto dosud neznámé a pro myši neinfekční kryptosporidie označeny *C. muris*-like. Na základě molekulárních analýz a rozdílné hostitelské specifity byl izolát *C. muris*-like infikující slez skotu později popsán jako samostatný druh a pojmenován *C. andersoni* (Lindsay a kol. 2000); druhu infekčnímu pro myši zůstal zachován název *C. muris*. Právě vnímavost myších hostitelů k *C. muris* byla vedle molekulárních metod považována za spolehlivý znak odlišující oba druhy žaludečních kryptosporidií savců až do popisu nového izolátu *C. andersoni* Kawatabi, u kterého byla prokázána infekčnost pro myši (Matsubayashi a kol. 2004, Koyama a kol. 2005, Matsubayashi a kol. 2005). Přehled hostitelů vnímavých k *C. andersoni* je uveden v Tabulce 3.

Ačkoliv *C. andersoni* není běžným druhem vyskytujícím se u lidí, několik nálezů u člověka již bylo prokázáno (Guyot a kol. 2001, Leoni a kol. 2006).

Klinické příznaky nejsou u infekce *C. andersoni* obvykle přítomny, u skotu však byla prokázána souvislost mezi infekcí *C. andersoni* a poklesem produkce mléka a nižšími váhovými přírůstky (Esteban a Anderson 1995).

Morfologické studie potvrdily, že rozměry oocyst *C. andersoni* $(8,4 (6,5-10) \times 6,2 (4,0-8,0) \mu\text{m})$ jsou blízké *C. muris* (Lindsay a kol. 2000), ačkoliv jsou známy ještě velikostně menší oocysty *C. andersoni* $(7,4 (6,6-7,9) \times 5,6 (5,3-6,5) \mu\text{m})$, které popsali Upton a Current (1985).

Tabulka 3. Přehled hostitelů *Cryptosporidium andersoni*

Hostitel	Přirozená infekce	Experimentální infekce
Primates		
<i>Homo sapiens</i>	Guyot a kol. 2001	
Rodentia		
<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 2007
<i>Mesocricetus auratus</i>	Lv a kol. 2009	
<i>Gerbillus gerbillus</i>		Ondráčková 2007
<i>Seeketamys calurus</i>		Ondráčková 2007
<i>Marmota bobac</i>	Ryan a kol. 2003	
<i>Phodopus sungorus</i>	Lv a kol. 2009	
<i>Phodopus campbelli</i>	Lv a kol. 2009	
Artiocadtyla		
<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>	Wang a kol. 2010	

1.3 IMUNITNÍ ODPOVĚĎ HOSTITELE PŘI KRYPTOSPORIDIÓZE

Specifická imunitní odpověď je dosud jediným známým efektivním mechanismem vedoucím k vyléčení hostitele z kryptosporidiózy, protože dosud nebyla popsána žádná účinná terapie (Hommer a kol. 2003). Právě pochopení imunitních procesů, které hrají roli v eliminaci kryptosporidií, může významnou měrou přispět k objevu účinných imunoterapeutik. Většina dosud známých poznatků o imunitní odpovědi na kryptosporidiovou infekci pochází ze studií provedených na *C. parvum*, střevním druhu, který je ale věkově specifický a dospělá zvířata k němu nejsou vnímavá (Tyzzer 1912). Právě *C. muris*, pro které je charakteristická dlouhá prepatentní a patentní perioda a absence věkové specifity, představuje vhodný model pro studium imunitních procesů (McDonald a Bancroft 1993). Výhodou je snadný chov parazita pasážemi v hostitelích, u kterých se vyvíjí chronická infekce (např. krysa malá).

1.3.1 Přirozená imunita

Přirozená imunita jako první registruje přítomnost patogenů v organismu a zodpovídá za prvotní nespecifickou obrannou odpověď hostitele. Za jedny z nejdůležitějších složek nespecifické imunitní odpovědi jsou považovány NK (natural killer) buňky disponující schopností produkovat prozánětlivé cytokiny a tím stimulovat antimikrobiální obranu v místě infekce. Produkce zánět stimulujících cytokinů, např. interferonu γ ($\text{IFN}\gamma$), souvisí s aktivací dalších složek přirozené imunity, jako jsou makrofágy a granulocyty. NK buňky mohou rovněž působit cytotoxicky na patologicky pozměněné buňky organismu. Makrofágy, stejně jako NK buňky, jsou charakteristické produkcí prozánětlivých cytokinů a tím přispívají významnou měrou k zánětu, který patří mezi hlavní efekty nespecifické imunity a následnému odstranění patogenů. Jejich další účinnou složkou obrany je schopnost fagocytózy. Granulocyty, zejména eosinofily a neutrofilové, jsou rovněž producenty mediátorů zánětu a disponují schopností fagocytózy. Významnou složkou přirozené imunity je komplement, jehož aktivace vede k odstranění patogenu. K nespecifické imunitě řadíme i buňky bez primárních imunitních funkcí, jako jsou epiteliální buňky, které jsou také schopny za určitých okolností sekrece cytokinů. Někteří autoři řadí k přirozené imunitě i tzv. innate-like lymphocytes (ILLs). Jedna subpopulace ILLs jsou T-lymfocyty exprimující na svém povrchu T-buněčný receptor $\gamma\delta$ ($\text{TCR}\gamma\delta$), které se nachází zejména na sliznicích a o kterých bude uvedeno více informací v kapitole 1.3.4.1. Přirozená imunita sice nedisponuje tvorbou paměťových buněk, ale její velkou výhodou je rychlost; na přítomnost patogenů v organismu reaguje během několika minut (Murphy a kol. 2008).

Při infekci kryptosporidii je přisuzována podstatná role NK buňkám a jimi sekretovaným cytokinům, zejména $\text{IFN}\gamma$, který je považován za klíčový při kontrole kryptosporidie (viz kapitola 1.3.5). Recentní studie dokazuje, že kryptosporidie u myši s deficitem T- a B-lymfocytů má sice chronický průběh, ale intenzita infekce je mnohem nižší než u myši, které kromě T- a B-lymfocytů navíc postrádají NK buňky. Tyto myši měly navíc v důsledku infekce mnohem vyšší mortalitu. Z těchto výsledků se tedy usuzuje, že NK buňky hrají významnou roli při kontrole kryptosporidie (Barakat a kol. 2009). Rovněž cytotoxická aktivita NK buněk je považována za účinný obranný mechanismus při infekci kryptosporidii. Infekce myši s nedostatečnou cytotoxickou aktivitou NK buněk (tzv. beige mutation, Roder a Duwe 1979) prokázala těžší průběh infekce *C. parvum* oproti zdravým myším (Enriquez a Sterling 1991). Toto tvrzení bylo podpořeno dalšími studiemi, kde NK buňky získané z lidské krve měly vyšší cytotoxický efekt na *in vitro* kultivované lidské enterocytární buňky postižené infekcí *C. parvum* (Dann a kol. 2005).

Role granulocytů a monocytů, popř. makrofágů, během kryptosporidiózy není dosud zcela objasněna. Někteří autoři tvrdí, že neutrofilů nemají žádný vliv na vyléčení myši z kryptosporidiózy, což podporuje i experiment, kdy ošetření myši specifickými protilátkami proti neutrofilům nijak neovlivnilo průběh infekce *C. parvum* (Zadrozny a kol. 2006). Přesto ale byla prokázána masivní migrace neutrofilů společně s eosinofily a makrofágy do místa infekce během střevní kryptosporidiózy myši (Svezhova 1997). SCID myši (myši s deficitem T- a B-lymfocytů, Murphy a kol. 2008), kterým byly navíc odstraněny makrofágy a neutrofilů, měly mnohem těžší průběh infekce *C. parvum*, který u všech experimentálních zvířat skončil úhynem během 16 dnů, oproti SCID myším se stejnou infekcí, kterým makrofágy a neutrofilů zůstaly zachovány (Takeuchi a kol. 2008). Během infekce *C. muris* bylo také zaznamenáno zvýšení množství periferních monocytů a makrofágů (Miller a Schaefer 2007). Tyto poznatky naznačují možnou účast makrofágů a granulocytů v imunitní odpovědi proti kryptosporidióze.

Funkce komplementu při kontrole kryptosporidiózy je zatím také neznámá, ačkoliv již bylo prokázáno, že infekce *C. parvum* vyvolává klasickou i lektinovou dráhu aktivace komplementu a vede k navázání C3b složky na povrch parazita (Petry a kol. 2008). Adheze dalších molekul účastnících se aktivace komplementu, MBL (manózu vázající lektin) a C4, k povrchu sporozoitů naznačuje, že MBL může zamezovat připojení parazita k buňkám epitelu (Kelly a kol. 2000). Navíc u myši deficientních pro MBL dochází k vývoji parazita, zatímco kontrolní imunokompetentní myši byly vůči infekci *C. parvum* rezistentní (Petry a kol. 2008). Tento efekt byl pozorován i u lidí, kdy deficiencie MBL v séru byla spojována s kryptosporidiovou infekcí (Kirkpatrick a kol. 2006).

Protože kryptosporidie parazitují přímo na buňkách epitelu, produkce různých zánět stimulujících molekul epiteliálními buňkami v místě infekce je důležitou složkou nespecifické imunitní odpovědi. Chemokiny produkované při kryptosporidóze ovlivňují migraci imunitních buněk do místa infekce (Laurent a kol. 1997). Rovněž produkované antimikrobiální peptidy, jako jsou např. defensiny, ovlivňují vývoj adaptivní imunity (Bowdish a kol. 2006). Sekrece epiteliální indukibilní NO syntázy byla během střevní kryptosporidiózy myši také potvrzena (Nordone a Gookin 2010). Při infekci *C. parvum* byla však pozorována sekrece také protizánětlivého prostaglandinu E2, který stimuluje produkci mucinu a reguluje buněčnou imunitní odpověď (Laurent a kol. 1998).

1.3.2 Adaptivní imunita: vývoj k buněčné nebo humorální imunitě

Na přítomnost patogenů v organismu reaguje také adaptivní (specifická) imunitní odpověď, jejíž vývoj trvá několik dní a která je zprostředkována lymfocyty. Dle povahy antigenu a genetické výbavy hostitele se většinou rozvíjí převažující T_{H1} nebo T_{H2} odpověď. Vývoj k jedné z těchto větví je zahájen produkcí cytokinů antigen prezentujícími buňkami (APC), jako jsou např. makrofágy či dendritické buňky, a jeho diverzita je způsobena sekrecí specifických cytokinů produkovaných $CD4^+$ T_H -lymfocyty (pomocné T-lymfocyty). Buněčná imunita je výsledkem T_{H1} odpovědi a je charakterizována proliferací T_H ($CD4^+$) i T_C -lymfocytů (cytotoxické T-lymfocyty, $CD8^+$), kterou spouští cytokin IL-2 (interleukin 2). Významnou roli při aktivaci buněčné imunity hraje IL-12 produkovaný APC buňkami, který spouští sekreci $IFN\gamma$ T-lymfocyty. Výsledkem je cytotoxická aktivita $CD8^+$ T_C -lymfocytů. T_{H2} odpověď je spojena s produkcí tzv. T_{H2} cytokinů, kterým je zejména IL-4, ale i řada dalších (např. IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13) a vede k aktivaci humorální imunity, charakteristické produkcí protilátek (imunoglobulinů, Ig) B-lymfocyty. Vývoj adaptivní imunity sice trvá delší dobu, ale její velkou výhodou je přítomnost antigen specifických protilátek a tvorba paměťových buněk, které jsou pak velmi důležité při reinfekcích (Murphy a kol. 2008).

1.3.3 Humorální imunita

Tvorba specifických protilátek, zejména ze tříd IgM, IgG a IgA, během kryptosporidiové infekce byla pozorována v séru či trusu různých savců včetně člověka (Ungar a kol. 1986, Hill a kol. 1990, Peeters a kol. 1992, Dann a kol. 2000). Rovněž byla zaznamenána produkce protilátek přímo v místě infekce *C. parvum* (Guk a kol. 2003). Nicméně řada studií prokázala, že B-lymfocyty nemají žádný význam při kontrole kryptosporidiózy. Bylo sice prokázáno zvýšení množství cirkulujících B-lymfocytů po infekci *C. muris*, ale už od čtvrtého dne byl zaznamenán postupný pokles cirkulujících B-lymfocytů (Miller a Schaefer 2007). Myši, kterým byly B-lymfocyty depletovány pomocí protilátek, byly k infekci *C. parvum* stejně vnímavé jako kontrolní myši (Taghi-Kilani a kol. 1990). Také SCID myši s rekonstitucí splenocytů zbavených B-lymfocytů měly stejný průběh infekce *C. muris* jako SCID myši s rekonstitucí splenocytů, u nichž B-lymfocyty depletovány nebyly (McDonald a kol. 1992). Rovněž myši s deficience B-lymfocytů se dokázaly vyléčit stejně jako kontrolní imunokompetentní myši a porovnatelná byla i intenzita infekce (Chen a kol. 2003).

Všechny tyto poznatky tedy nasvědčují tomu, že humorální imunita má zřejmě omezenou schopnost eliminovat parazita.

1.3.4 Buněčná imunita

Ačkoliv neonatální imunokompetentní myši měly velmi podobný průběh střevní kryptosporidózy jako myši s bez T a B-lymfocytů (Korbel a kol. 2011), řada dalších studií dokazuje, že buněčná imunita a T-lymfocyty jsou hlavním ochranným faktorem proti kryptosporidiovým infekcím. Významné zvýšení množství T-lymfocytů v mukózním epitelu, které bylo zaznamenáno během infekce *C. parvum* (Boher a kol. 1994, Abrahamsen a kol. 1997), ukazuje aktivaci buněčné imunitní odpovědi při kryptosporidiové infekci. To souhlasí i se závěry studie na myších bez thymu, u kterých byla infekce *C. parvum* chronická a s častým letálním průběhem (Heine a kol. 1984). Rovněž byly pozorovány chronické infekce u SCID myši a u myši bez thymu (nude myši) při nákazách *C. muris* a *C. parvum* (Ungar a kol. 1990, Mead a kol. 1991, McDonald a kol. 1992). Další přesvědčivý důkaz o nezbytnosti buněčné imunity a T-lymfocytů při kontrole kryptosporidózy podala studie, kde se imunokompetentní myši s depletovanými T-lymfocyty nedokázaly vyléčit z infekce *C. muris* (McDonald a kol. 1992).

1.3.4.1 TCR $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$

Na svém povrchu mohou T-lymfocyty vystavovat dva typy TCR, TCR $\alpha\beta$ nebo TCR $\gamma\delta$. Vysoce diverzifikovaný TCR $\alpha\beta$ se vyskytuje u většiny T-lymfocytů a tento typ T-lymfocytů ($\alpha\beta$ T-lymfocyty) je považován za hlavní účinnou složku buněčné imunity. Buňky exprimující na svém povrchu TCR $\alpha\beta$ jsou aktivovány rozpoznáním antigenu prezentovaným MHC I (hlavní histokompatibilní komplex) všemi jadernými buňkami organismu nebo MHC II, který na svém povrchu exprimují APC. MHC jsou glykoproteiny, které se nalézají na povrchu různých buněk organismu (Gao a kol. 2002, Murphy a kol. 2008). Druhý typ T-lymfocytů nese na svém povrchu TCR $\gamma\delta$ a tvoří pouze 5-10 % lymfocytární populace u lidí či myši. T-lymfocyty s TCR $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ T-lymfocyty) někdy bývají řazeny do nespecifické imunity jako jedna ze subpopulací ILLs, hlavně díky rozdílnému typu aktivace oproti $\alpha\beta$ T-lymfocytům. Pravděpodobně mohou rozpoznávat antigen přímo a tím spouštějí okamžitou imunitní odpověď (Murphy a kol. 2008). $\gamma\delta$ T-lymfocyty jsou běžné v epitelích některých savců, zejména hlodavců (Hayday a Tigelaar 2003, Born a kol. 2006) a ačkoliv o jejich funkci zatím není moc známo, bývají spojovány i s prezentací antigenu ostatním T-lymfocytům či s regulací zánětu (Born a kol. 2006).

Rozdílná role TCR $\alpha\beta$ a TCR $\gamma\delta$ T-lymfocytů v imunitní odpovědi proti kryptosporióze byla prokázána studií, kde dospělé myši s deficitem pro TCR $\gamma\delta$ byly stejně odolné k infekci *C. parvum* jako kontrolní imunokompetentní myši, zatímco myši s mutací v genu pro TCR $\alpha\beta$ měly patentní periodu prodlouženou (Waters a Harp 1996). Nicméně podání anti-TCR $\gamma\delta$ protilátek myším s deficiencí pro TCR $\alpha\beta$ významně zhoršilo a prodloužilo průběh infekce (Eichleberger a kol. 2000). Při střevní kryptosporidióze skotu bylo rovněž pozorováno zvýšení počtu $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ T-lymfocytů v místě infekce v souvislosti s průběhem onemocnění. Se snížením intenzity infekce byl pozorován pokles množství obou skupin T-lymfocytů (Abrahamsen a kol. 1997). Všechny tyto studie vedly k závěru, že $\alpha\beta$ T-lymfocyty jsou pro vyléčení z kryptosporidiové infekce nezbytné, nicméně $\gamma\delta$ T-lymfocyty se imunitní odpovědi také účastní, ačkoliv jejich přítomnost je postradatelná.

1.3.4.2 CD4+ a CD8+ T-lymfocyty

T-lymfocyty, stejně jako ostatní leukocytární subpopulace, exprimují ještě další receptory nazývané CD znaky (Cluster of Differentiation). Všechny T-lymfocyty, $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$, jsou charakterizovány přítomností CD3 receptoru. $\alpha\beta$ T-lymfocyty se dle těchto receptorů rozdělují na dvě podskupiny, CD4+ a CD8+ T-lymfocyty. CD4+ T-lymfocyty, které jsou prekurzory T_H lymfocytů, jsou aktivovány rozpoznáním antigenu prezentovaným MHC II a produkují cytokiny, které dále řídí průběh imunitní odpovědi. CD8+ T-lymfocyty rozpoznávají antigen prezentovaný MHC I a svou aktivací se mění na T_C-lymfocyty zodpovědné za likvidaci infikovaných buněk cytotoxickou cestou (Murphy a kol. 2008).

Protektivní role CD4+ T-lymfocytů při kryptosporidióze je známa ze řady studií. Myši, které měly mutaci v genu pro MHC II a tedy nebyly schopny tvořit aktivované CD4+ T-lymfocyty, trpěly chronickou infekcí *C. parvum* (Aquirre a kol. 1994). Imunokompetentní myši ošetřené anti-CD4+ protilátkou měly prokazatelně horší průběh infekce *C. muris* i *C. parvum* oproti myším, kterým protilátka podána nebyla (Ungar a kol. 1991, McDonald a kol. 1994). Rovněž depleční pokusy na SCID myších, které byly po rekonstrukci splenocytů z imunokompetentních myši schopny zvládnout kryptosporidiovou infekci, ukázaly význam CD4+ T-lymfocytů. Pokud byly SCID myším injikovány splenocyty zbavené CD4+ T-lymfocytů, nedošlo u nich k vyléčení z infekce *C. parvum* ani *C. muris* (Chen a kol. 1993, McDonald a kol. 1994). Také SCID myši, kterým byly aplikovány naivní či imunní CD4+ T-lymfocyty ze suspenze splenocytů, byly schopny zvládnout infekci *C. muris* (Kváč a kol. 2011). U lidí v pozdějším stádium HIV infekce, která je charakteristická výrazným poklesem počtu CD4+ T-lymfocytů, byla zaznamenána zvýšená

citlivost ke kryptosporidiové nákaze a infekce přecházela až do život ohrožující fáze (Blanshard a kol. 1992, Flanigan a kol. 1992). Ovšem po antiretrovirové terapii a zvýšení počtu CD4⁺ T-lymfocytů u HIV pozitivních pacientů došlo k jejich vyléčení z kryptosporidiózy (Schmidt a kol. 2001). Přes všechny tyto poznatky byla nezbytnost CD4⁺ T-lymfocytů při kontrole kryptosporidiózy zpochybněna studií, kde nebylo pozorováno zvýšení hladiny CD4⁺ T-lymfocytů ve střevě novorozeneých imunokompetentních myší při infekci *C. parvum*. Rovněž během experimentu na neonatálních myších, kterým byly CD4⁺ T-lymfocyty depletovány specifickou protilátkou, nebylo zaznamenáno žádné zhoršení průběhu střevní kryptosporidiózy (Korbel a kol. 2011). Tyto výsledky vedou k závěru, že ačkoliv CD4⁺ T-lymfocyty jsou obecně považovány za důležité, některými autory dokonce za nezbytné pro vyléčení z kryptosporidiózy, nejsou schopny kontrolovat infekci *C. parvum* neonatálních myší (Korbel a kol. 2011).

Význam CD8⁺ T-lymfocytů v imunitní odpovědi na kryptosporidiovou infekci dosud není zcela objasněn, nicméně odborná veřejnost se přiklání k názoru, že tyto lymfocyty nehrají zásadní roli při kontrole kryptosporidiózy. Tomuto tvrzení odpovídá i experiment na myších s deficicientem MHC I, které měly srovnatelnou intenzitu infekce *C. parvum* s kontrolními imunokompetentními myšmi (Acquirre a kol. 1994). Rovněž SCID myší, kterým byla podána suspenze splenocytů zbavená CD8⁺ T-lymfocytů, se dokázaly ze střevní kryptosporidiózy vyléčit (Chen a kol. 1993). Roli CD8⁺ T-lymfocytů také zpochybňuje studie na neonatálních myších, u kterých nedošlo k navýšení počtu CD8⁺ T-lymfocytů v místě infekce *C. parvum* (Korbel a kol. 2011). V kontrastu s těmito studii ale bylo pozorováno výrazné prodloužení průběhu infekce *C. parvum* u SCID myší rekonstituovaných splenocyty zbavených CD8⁺ T-lymfocytů oproti kontrolním myším (McDonald a Bancroft 1994). Rovněž u imunokompetentních myší, které byly ošetřeny specifickými anti-CD8 a anti-CD4 protilátkami bylo pozorováno výrazné zvýšení intenzity infekce *C. parvum* oproti myším, kterým protilátky podávány nebyly. Podání samotných anti-CD4 protilátek sice intenzitu infekce také zvýšilo, ale ne v takovém rozsahu jako ošetření myší anti-CD8 a anti-CD4 protilátkami zároveň. Nicméně podání pouze anti-CD8 protilátek nemělo na průběh střevní kryptosporidiózy žádný vliv (Ungar a kol. 1990). Stejně tak podání anti-CD4 protilátek myším infikovaným *C. muris* zvýšilo intenzitu infekce mnohem výrazněji než podání anti-CD8 protilátek (McDonald a kol. 1994). Přesto ale byla prokázána výrazná migrace CD8⁺ T-lymfocytů do sliznice tenkého střeva myší infikovaných *C. parvum* a tím naznačen jejich možný význam při kontrole kryptosporidiózy, zejména sekrecí IFN γ v místě infekce (Leav a kol. 2005). Zvýšená množství CD8⁺ T-lymfocytů byla pozorována i u skotu,

kde navýšení počtu těchto T-lymfocytů pravděpodobně způsobilo rezistenci vůči reinfekci *C. parvum* (Abrahamsen a kol. 1997). Podobně naše předchozí studie prokázaly významnou migraci CD8⁺ T-lymfocytů do žaludku myši infikovaných *C. muris*, kde se jejich počet zvýšil až 1300× a jejich množství v místě infekce bylo vyšší než množství přítomných CD4⁺ T-lymfocytů (Jalovecká a kol. 2010). Studie s adoptivními přenosy CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty také prokázala, že CD8⁺ T-lymfocyty přispívají k vyléčení myši ze žaludeční kryptosporidiózy. SCID myši, kterým byly aplikovány imunní CD8⁺ T-lymfocyty ze suspenze splenocytů měly nižší intenzitu infekce *C. muris* oproti kontrolním SCID myším (Kváč a kol. 2011). Tato pozorování naznačují, že CD8⁺ T-lymfocyty se účastní imunitní odpovědi na kryptosporidiovou infekce a velmi pravděpodobně přispívají ke kontrole kryptosporidiózy mnohem výrazněji, než se dosud předpokládalo.

1.3.4.3 Intraepiteliální leukocyty (IELs)

Protože kryptosporidiová infekce je situována do epiteliálních povrchů GIT, účastní se imunitní odpovědi tzv. intraepiteliální leukocyty (IELs). IELs jsou představovány zejména T-lymfocyty, které jsou z větší části zastoupeny $\gamma\delta$ T-lymfocyty a $\alpha\beta$ CD8⁺ T-lymfocyty, v menší míře také $\alpha\beta$ CD4⁺ T-lymfocyty (McDonald 1999). Ačkoliv funkce těchto buněk není dosud zcela objasněna, mohou IELs sekretovat řadu prozánětlivých cytokinů a tím regulovat zánětlivou odpověď při infekci, čehož se pravděpodobně účastní zejména $\gamma\delta$ T-lymfocyty. Rovněž $\alpha\beta$ CD8⁺ T-lymfocyty zde hrají velmi důležitou roli právě svou cytotoxickou aktivitou vůči infikovaným epiteliálním buňkám (Hayday a Tigelaar 2003).

Důležitost IELs při kontrole kryptosporidiové infekce byla potvrzena řadou experimentálních studií. Významné zvýšení počtu $\gamma\delta$ T-lymfocytů v populaci IELs bylo pozorováno při střevní kryptosporidióze myši deficientních pro $\alpha\beta$ T-lymfocyty (Eichelberger a kol. 2000). Rovněž SCID myši, kterým byly podány IELs získané z imunizovaných imunokompetentních myši, se dokázaly z infekce *C. muris* vyléčit a v podávaných IELs bylo zjištěno vyšší zastoupení $\alpha\beta$ CD8⁺ T-lymfocytů oproti $\alpha\beta$ CD4⁺ T-lymfocytům. Přesto ale deplece $\alpha\beta$ CD4⁺, popř. $\alpha\beta$ CD8⁺ T-lymfocytů a následný přenos střevních IELs do SCID myši prokázal, že za protektivní imunitu zodpovídají pouze $\alpha\beta$ CD4⁺ T-lymfocyty (McDonald a kol. 1996). Podstatnou úlohu IELs při kontrole kryptosporidiózy podpořilo také významné snížení intenzity infekce u naivních myši s mutací v genu pro IFN γ , kterým byly podány IELs získané z myši se stejnou mutací imunizovaných *C. parvum* (Tessema a kol. 2009a). Infekce dobytka prokázaly zvýšená množství IELs, které byly zastoupeny CD4⁺ i CD8⁺ T-lymfocyty, v místě infekce v průběhu

střevní kryptosporidiózy (Fayer a kol. 1998) i po jejím zvládnutí (Wyatt a kol. 1999). Významná migrace $\alpha\beta$ CD8⁺ T-lymfocytů do místa infekce byla zaznamenána i během reinfekce dobytka střevním druhem *C. parvum* (Abrahamsen a kol. 1997).

1.3.4.4 Paměťové T-lymfocyty

Adaptivní imunita disponuje schopností tvořit paměťové buňky, které po infekci zůstávají v organismu různě dlouhou dobu a jsou důležité zejména při reinfekcích (Murphy a kol. 2008). Tvorba paměťových T-lymfocytů během kryptosporidiózy a jejich perzistence v hostitelském organismu byla prokázána řadou experimentů, např. adoptivní přenos splenocytů či IELs získaných z imunokompetentních myší imunizovaných střevními či žaludečními kryptosporidiiemi do SCID myší prokázal mnohem vyšší ochranný efekt oproti adoptivnímu přenosu splenocytů a IELs získaných z naivních myší (McDonald a kol. 1994, McDonald a kol. 1996, Adjei a kol. 2000). Protektivní imunita byla také pozorována při přenosu IELs z imunokompetentních myší infikovaných kryptosporidiiemi před 8 měsíci, avšak mnohem vyšší ochranný efekt měly IELs získané z myší, které byly pouze 3 měsíce po infekci. Tím bylo prokázáno, že imunologická paměť T-lymfocytů se po kryptosporidiové infekci časem zeslabuje (McDonald a kol. 2000). Přesto bylo pozorováno, že po prodělání primární infekce *C. muris* zůstávaly v žaludečním epitelu imunokompetentních myší významně vyšší počty T-lymfocytů dlouhou dobu a při následné reinfekci těchto myší opět *C. muris* byla zaznamenána mnohem nižší migrace (popř. proliferace) T-lymfocytů do žaludku ve srovnání s migrací do stejného místa během primární infekce. Rovněž bylo prokázáno, že se myši či pískomilové po prodělání žaludeční kryptosporidiózy stanou vůči infekci stejným druhem rezistentní (Kvác a kol. 2009, Jalovecká a kol. 2010). Dokonce se ukázalo, že paměťové buňky vytvořené během primární infekce *C. muris* jsou schopny způsobit rezistenci hostitele vůči reinfekci *C. andersoni*, druhu rovněž parazitujícímu v žaludečním epitelu. Avšak ochranný efekt paměťových buněk nebyl pozorován při primární infekci experimentálních zvířat žaludečními druhy kryptosporidií a následné reinfekci střevním druhem *C. parvum* či naopak (Kvác a kol. 2009).

1.3.5 Cytokinová kontrola kryptosporidiózy

Úloha cytokinů v imunitní odpovědi byla velmi intenzivně studována a na základě řady experimentů je za nejdůležitější cytokin v imunitní odpovědi hostitele na kryptosporidiózu považován IFN γ . Jeho producenty při kryptosporidióze jsou zejména CD4⁺ T-lymfocyty (Harp a kol. 1994, Tilley a kol. 1995), ale může být produkován CD8⁺ subpopulací IELs

(Leav a kol. 2005) a pravděpodobně i NK buňkami (McDonald a Bancroft 1998, McDonald a kol. 2000) či epiteliálními buňkami střeva (Barakat a kol. 2009).

Pomocí molekulárních a imunologických metod bylo pozorováno, že infekce *C. parvum* stimuluje tvorbu mRNA (mediátorová RNA) a následnou expresi proteinu IFN γ přímo v místě infekce (Kapel a kol. 1996, Urban a kol. 1996). U imunokompetentních myší, kterým byly podávány specifické anti-IFN γ protilátky, bylo pozorováno zvýšení intenzity infekce *C. parvum* i *C. muris*. Stejných výsledků bylo dosaženo i podáváním anti-IFN γ protilátky SCID myším či aplikací této protilátky imunokompetentním myším společně se specifickými anti-CD4 a anti-CD8 protilátkami (Ungar a kol. 1991, McDonald a kol. 1992).

Významná role IFN γ byla potvrzena i u lidí, kde je jeho produkce stimulovaná parazitárním antigenem spojena s vyléčením z kryptosporidiózy (Gomez Morales a kol. 1999) a že HIV negativní děti s deficitem IFN γ mohou trpět velmi silnou chronickou kryptosporidiózou (Gomez Morales a kol. 1996).

Za hlavní producenty IFN γ během kryptosporidiózy jsou považovány CD4+ T-lymfocyty, což bylo mimo jiné prokázáno i studií, kde stimulace splenocytů z myší infikovaných antigenem získaným z oocyst kryptosporidií vedla k masivní proliferaci CD4+ T-lymfocytů a produkci IFN γ (Harp a kol. 1994, Tilley a kol. 1995). Možnost kontroly kryptosporidiové infekce vyžadující současnou přítomnost CD4+ T-lymfocytů a IFN γ byla také potvrzena adoptivními přenosy IELs do SCID myší (McDonald a kol. 1996, Culshaw a kol. 1997). Naproti tomu ale bylo pozorováno, že IFN γ produkovaný CD8+ T-lymfocyty v populaci střevních IELs je schopen zabránit množení parazita v místě infekce během počátečních stádií onemocnění *C. parvum* u imunokompetentních myší (Leav a kol. 2005). To, že produkce IFN γ IELs je spojena s kontrolou kryptosporidiózy, bylo prokázáno také infekcemi skotu (Fayer a kol. 1998, Wyatt a kol. 2001).

Zda je IFN γ při kryptosporidióze produkován také NK buňkami není dosud zcela zřejmé. V *in vitro* podmínkách byla po přidání sporozoitů kryptosporidií pozorována produkce IFN γ splenocyty získaných ze SCID myší (McDonald a Bancroft 1998). Pokud byly z této kultury NK buňky depletovány, nebyla produkce IFN γ pozorována (McDonald a kol. 2000). Naproti tomu nebyl pozorován žádný efekt na reprodukci *C. parvum* ve SCID myších po podání specifických protilátek proti NK buňkám (Ungar a kol. 1991, Rohlman a kol. 1993, McDonald a Bancroft 1994, McDonald a kol. 2000). Rovněž studie na myších deficientních pro T- a B-lymfocyty a myších s nedostatkem T- a B-lymfocytů a navíc NK buněk prokázala velmi podobné množství IFN γ mRNA exprimované v místě infekce

a významné zhoršení infekce *C. parvum* po podání specifických anti-IFN γ protilátek u obou skupin myši, a jako možného producenta IFN γ navrhla epiteliální buňky střeva (Barakat a kol. 2009).

Možná role IFN γ v rezistenci vůči reinfekci *C. muris* byla naznačena významným zvýšením jeho produkce v *ex vivo* kulturách splenocytů ve srovnání s primární infekcí (Jalovecká a kol. 2010).

Význam IFN γ při kontrole kryptosporidiózy byl také potvrzen experimenty na myších s mutací v genu pro IFN γ , u kterých byl průběh infekce *C. parvum* mnohem těžší oproti kontrolním imunokompetentním myším (Mead a You 1998, Theodos 1998). Rovněž SCID myši, které byly navíc deficientní v produkci IFN γ , trpěly chronickou infekcí *C. parvum*, charakterizovanou velmi vysokou intenzitou infekce a letálním průběhem u většiny experimentálních zvířat ve srovnání s kontrolními SCID myši či myši deficientními pouze v produkci IFN γ (Hayward a kol. 2000). Přesto ale bylo prokázáno, že myši s mutací pouze v genu pro IFN γ jsou schopny infekci *C. parvum* přežít (Mead a You 1998, Theodos 1998), dokonce se z této infekce vyléčit a navíc si vytvořit rezistenci vůči reinfekci (Jakobi a Petry 2008). Zároveň nebyl pozorován žádný terapeutický efekt IFN γ během infekce *C. parvum* (Kuhls a kol. 1994, McDonald a Bancroft 1994).

Ze všech těchto poznatků plyne, že přestože se IFN γ imunitní odpovědi při kryptosporidiové infekci prokazatelně účastní a je nezbytný zejména v časných fázích infekce, existují pravděpodobně ještě alternativní, na IFN γ nezávislé, imunitní mechanismy, které jsou důležité hlavně v pozdějších fázích infekce a jsou pro kontrolu kryptosporidiové infekce nezbytné. Jednou alternativní cestou kontroly kryptosporidiózy může být aktivace IL-18, jak plyne z experimentu na myších deficientních pro IFN γ . Ošetření těchto myši specifickou protilátkou proti IL-18 vedlo ke zvýšené vnímavosti experimentálních zvířat k infekci *C. parvum*. Rovněž se IL-18 jeví jako jeden z regulátorů T_{H1}/T_{H2} odpovědi, protože podání anti-IL-18 protilátky vedlo ke zvýšení T_{H2} cytokinů IL-4 a IL-13 ve slezině (Tessem a kol. 2009b).

Silná kooperace byla prokázána mezi IFN- γ a IL-12, dalším T_{H1} cytokinem, jehož hladina se při kryptosporidiové infekci výrazně zvyšuje (Fayer a kol. 1998, Korbel a kol. 2011). IL-12 pravděpodobně zmírňuje průběh kryptosporidiózy a je zodpovědný za aktivaci produkce IFN γ při infekci (Urban a kol. 1996, McDonald a kol. 2004, Ehigiator a kol. 2005). Studie na myších s deficiencí v produkci IL-12 prokázala zvýšení intenzity infekce a prodloužení patentní periody, přesto jsou schopny se takto deficientní myši z infekce *C. parvum* vyléčit a vytvořit si rezistenci vůči reinfekci (Jakobi a Petry 2008).

Při imunitní odpovědi vůči kryptosporidiióze byla pozorována účast řady dalších, zejména prozánětlivých T_{H1} cytokinů, např. IL-2 či TNF α , nicméně ani jeden nebyl shledán nezbytným pro vyléčení hostitele z kryptosporidiové infekce (Ungar a kol. 1991, Enriquez a Sterling 1993, McDonald a Bancroft 1994, Tilley a kol. 1995, Lean a kol. 2006).

2. CÍLE PRÁCE

1. Sledovat průběh a intenzitu infekce *Cryptosporidium muris* u imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních (C57BL/6 CD4^{-/-}, C57BL/6 CD8^{-/-} a C57BL/6 Prf1^{-/-}) myší.
2. Zvládnout metodu multibarevného značení leukocytů pomocí průtokové cytometrie.
3. Sledovat zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů (CD4⁺, CD8⁺ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů, B-lymfocytů, NK buněk, granulocytů a monocytů/makrofágů) v žaludečním epitelu všech výše uvedených kmenů myší během infekce *C. muris* pomocí průtokové cytometrie.
4. Posoudit, zda jsou CD4⁺ T-lymfocyty nezbytné k vyléčení myší z infekce *C. muris* a zhodnotit význam ostatních sledovaných leukocytů (CD8⁺ a $\gamma\delta$ T-lymfocyty, B-lymfocyty, NK buňky, granulocyty a monocyty/makrofágy) při vývoji imunity a vyléčení z infekce *C. muris*.
5. Zvládnout metodu sledování změn genové exprese cytokinů pomocí real-time polymerázové řetězové reakce (real-time PCR).
6. Popsat a porovnat změny genové exprese INF γ v žaludku imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních (C57BL/6 CD4^{-/-}, C57BL/6 CD8^{-/-} a C57BL/6 Prf1^{-/-}) myší během infekce *C. muris*.
7. Posoudit úlohu INF γ v imunitní odpovědi a vyléčení všech výše uvedených kmenů myší z infekce *C. muris*.
8. Sledovat průběh primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* u imunokompetentních BALB/c myší.
9. Sledovat zastoupení vybraných subpopulací leukocytů (CD4⁺, CD8⁺ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů, B-lymfocytů a NK buněk) v žaludečním epitelu imunokompetentních BALB/c myší během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* pomocí průtokové cytometrie.
10. Zhodnotit vliv infekce *C. andersoni* v nevnímavém hostiteli na vývoj nespecifické i specifické imunitní odpovědi a posoudit její protektivní ochranu před následnou infekcí hostitele vnímavého k infekci *C. muris*.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Paraziti

- *Cryptosporidium muris* izolát TS03: získán z přirozeně infikovaného hlodouna východoafrického (*Tachyorectes splendens*), udržován v laboratoři v kryse malé (*Mastomys coucha*).
- *Cryptosporidium andersoni* izolát LI03: získán z tura domácího (*Bos taurus*).

3.1.2 Experimentální zvířata

- imunokompetentní myši C57BL/6 (Charles River, Germany).
- imunodeficientní myši C57BL/6 CD4^{-/-} (vlastní chov PaÚ BC AVČR, v.v.i.): myši s mutací v genu pro CD4⁺ T-lymfocyty.
- imunodeficientní myši C57BL/6 CD8^{-/-} (vlastní chov PaÚ BC AVČR, v.v.i.): myši s mutací v genu pro CD8⁺ T-lymfocyty.
- imunodeficientní myši C57BL/6 Prf1^{-/-} (vlastní chov PaÚ BC AVČR, v.v.i.): myši s mutací v genu pro perforin 1 (pore forming protein).
- imunokompetentní myši BALB/c (Charles River, Germany).
- krysa malá (*Mastomys coucha*, vlastní chov PaÚ BC AVČR, v.v.i.).
- pískomil mongolský (*Meriones unguiculatus*, vlastní chov PaÚ BC AVČR, v.v.i.).

Experimentální zvířata pro chovy zvěřince PaÚ BC AVČR byla získána z The Jackson Laboratory (JAX Mice and Services, USA). Zvířata byla chována ve sterilním prostředí v IVC (individuálně ventilované chovné klece, Air Handling Solutions, Tecnoplast, Italy) s HEPA filtry (vysoce účinný filtr vzduchových částic) za standardních podmínek. Byla napájena sterilní vodou *ad libitum* a krmena sterilní komerční směsí (Top-Velaz, ČR).

Jako experimentální zvířata byly používány samice, 7 týdnů staré. Během experimentu byly chovány ve sterilním prostředí v izolátorech (BEM, ČR) s HEPA filtry. Byly opět krmeny sterilní komerční směsí (Top-Velaz, ČR) a napájeny sterilní vodou *ad libitum*.

3.2 METODIKA

3.2.1 Purifikace oocyst

Trus krysy malé obsahující oocysty *C. muris* TS03, popř. trus tura domácího s oocystami *C. andersoni* byl zhomogenizován v třecí misce. Homogenát trusu s oocystami byl přečištěn pomocí následujících kroků až k získání suspenze zcela čistých oocyst použitých k infekci experimentálních zvířat.

3.2.1.1 Sacharózový gradient (Arrowood a Sterling, 1987)

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- Sheaterův cukerný roztok: 259 ml deionizované vody (dH₂O), 405 g cukru, 7,29 g fenolu
- 1% PBS TWEEN: 1 % Tween 20 v PBS (phosphate buffered saline, 1 l dH₂O, 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄×12H₂O, 2,4 g KH₂PO₄)
- dH₂O

Z těchto zásobních roztoků byly vytvořeny dva pracovní roztoky:

- roztok 1+2: 1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly 1% PBS TWEEN
- roztok 1+4: 1 díl Sheaterova roztoku + 4 díly 1% PBS TWEEN

Pracovní postup:

Homogenát trusu byl propasírován přes sítko pro odstranění nejhrubších nečistot. Pro minimalizaci ztrát oocyst byly zbylé nečistoty několikrát propláchnuty dH₂O. Ze získané suspenze oocyst v dH₂O bylo 15 ml navrstveno na sacharózový gradient (30 ml roztoku 1+2 a 30 ml roztoku 1+4) a centrifugováno 30 min při 1370 g a 4 °C. Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky, naředěn v nadbytku dH₂O a 20 min centrifugován při 1370 g a 4 °C. Vzorek byl následně ještě 2× promyt v nadbytku dH₂O centrifugací za stejných podmínek pro odstranění zbytku cukerného roztoku. Oocysty byly uchovávány v dH₂O při 4 °C.

3.2.1.2 Cesium chloridový gradient

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- roztok cesium chloridu: 21,07 g CsCl + 100 ml dH₂O
- 10× ředěný PBS (pH 7,2)

Pracovní postup:

Suspenze oocyst přečištěných na sacharózovém gradientu byla centrifugována 10 min při 1450 g a 4 °C a následně převedena do PBS. Do čisté mikrozkušavky byl

přidán 1 ml CsCl, převrstven 0,5 ml roztoku oocyst v PBS a centrifugován 3 min při 16000 g a 4 °C. Supernatant s oocystami byl naředěn v nadbytku PBS a opět 3 min při 16000 g a 4 °C centrifugován. Vzorek byl poté ještě 2× promyt v nadbytku PBS centrifugací za stejných podmínek pro důkladné odstranění zbytků roztoku CsCl. Přečištěné oocysty byly převedeny do dH₂O a skladovány při 4 °C.

3.2.1.3 Odstranění parazitární, mykotické, bakteriální a virové kontaminace

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- 5% chlornan sodný (Savo)
- směs antibiotik a antimykotik (Sigma-Aldrich, USA)

Pracovní postup:

Oocysty přečištěné na CsCl gradientu byly přefiltrovány přes sítko s oky o velikosti 10 µm pro odstranění vajíček parazitů. Zkumavka s přefiltrovanou suspenzí byla chlazená v ledu, k oocystám bylo přidáno 5 ml 5% chlornanu sodného a směs byla magnetickým míchadlem jemně promíchávána 15 min. Poté byl vzorek 5× promyt v nadbytku dH₂O centrifugací (20 min, 1370 g a 4 °C). Získané oocysty byly skladovány při 4 °C v dH₂O s přídavkem 10% směsi antibiotik a antimykotik. Oocysty byly následně spočítány v Bürkerově komůrce a použity pro test viability.

3.2.1.4 Test životaschopnosti oocyst

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- propidium jodid (PI, 1 mg/1 ml 0,1 M PBS)

Pracovní postup:

Ke 100 µl suspenze přečištěných oocyst (počet oocyst 1×10^6) bylo přidáno 10 µl zásobního roztoku PI, směs byla důkladně promíchána a 30 min barvena ve tmě při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek centrifugován 3 min při 16000 g a 20 °C. Následně byl vzorek ještě 2× promyt v nadbytku dH₂O centrifugací za stejných podmínek. Oocysty byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem s filtrem o vlnové délce 590 nm při zvětšení 40× (Olympus IX 70). Zjištěná životaschopnost byla využita pro spočítání množství oocyst použitých pro infekci experimentálních zvířat.

3.2.2 Průběh experimentu

3.2.2.1 Experimentální infekce a reinfekce imunokompetentních a imunodeficientních C57BL/6 myši *Cryptosporidium muris* TS03

Parazitologické a molekulární vyšetření trusu:

Skupina imunokompetentních myši C57BL/6 (10 jedinců) a tři skupiny imunodeficientních myši (C57BL/6 CD4^{-/-}, C57BL/6 CD8^{-/-} a C57BL/6 Pfr1^{-/-}, každá 10 jedinců) byly perorálně infikovány oocystami *C. muris* TS03 v počtu 1×10^6 oocyst na zvíře ve 200 μ l dH₂O za použití jícnové sondy. Všechna zvířata byla od 1. dne po infekci (DPI) denně parazitologicky vyšetřována na detekci oocyst kryptosporidií v trusu až do vyléčení (viz 3.2.3). Potvrzení vyléčení z kryptosporidiové infekce bylo provedeno pomocí molekulárních metod (viz 3.2.4). Po vyhodnocení výsledků byly zvoleny skupiny myši vhodné k následné imunologické analýze.

Skupina imunokompetentních myši C57BL/6 (10 jedinců) byla 90. DPI reinfikována stejnou dávkou oocyst *C. muris* TS03 na zvíře a analyzována stejným vyšetřením na přítomnost oocyst v trusu totožnými parazitologickými a molekulárními metodami. Pro kontrolu infekitivity použitých oocyst byly infikovány stejným počtem oocyst *C. muris* TS03/zvíře tři imunokompetentní myši C57BL/6, u kterých primární infekce neproběhla.

Imunologické vyšetření:

Skupina 39 jedinců imunokompetentních myši C57BL/6 a dvě skupiny imunodeficientních myši (C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-}, každá v počtu 18 jedinců) byly perorálně infikovány oocystami *C. muris* TS03 (1×10^6 oocyst/zvíře). Každý sedmý den (7, 14, 21, 28, 35 a 42 DPI) byly tři myši z každé skupiny usmrceny zlomením vazy a z jejich slezin a žaludků byly vyizolovány splenocyty (viz 3.2.6) a IELs (viz 3.2.5), v nichž byly následně charakterizovány jednotlivé leukocytární subpopulace pomocí průtokové cytometrie (viz 3.2.7). Výsledky byly porovnány s neinfikovanými zvířaty (negativní kontrola (NK), 3 jedinci z každé skupiny/kontrolní den), které byly stejnými postupy vyšetřeny v 0. DPI a 42. DPI.

Zbylé myši z první skupiny (imunokompetentní myši C57BL/6, 18 jedinců) byly reinfikovány 90. DPI stejnou dávkou oocyst *C. muris* TS03/zvíře a byly analyzovány stejnými imunologickými metodami 0, 3, 5, 7, 11, 14 a 21 dní po reinfekci (DPRI). Současně byly infikovány stejným počtem oocyst *C. muris* TS03/zvíře i tři

imunokompetentní myši C57BL/6, u kterých primární infekce neproběhla pro kontrolu infekitivity použitých oocyst.

Po celou dobu primární infekce i reinfekce byla u všech experimentálních myší sledována přítomnost oocyst v trusu.

Sledování změn genové exprese IFN γ :

Skupina imunokompetentních myší C57BL/6 a dvě skupiny imunodeficientních myší (C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-}), každá v počtu 3 jedinci, byly infikovány dávkou 1×10^6 oocyst *C. muris* TS03/zvíře. V průběhu infekce (28. DPI) byly myši usmrceny a v jejich žaludcích byla sledována přítomnost IFN γ pomocí real-time PCR (viz 3.2.9). Neinfikované myši (NK), 3 jedinci z každé skupiny, byly usmrceny a vyšetřeny stejnými metodami a bylo provedeno srovnání hladiny IFN γ v žaludku mezi 0. DPI (NK) a 28. DPI. Od 1. DPI byla u všech experimentálních myší sledována přítomnost oocyst v trusu až do jejich usmrcení.

3.2.2.2 Experimentální infekce imunokompetentních BALB/c myší *Cryptosporidium andersoni* LI03 a následná infekce *C. muris* TS03

Skupina 39 imunokompetentních myší BALB/c byla perorálně infikována oocystami *C. andersoni* LI03 v počtu 1×10^6 oocyst/zvíře. Pro kontrolu infekitivity použitých oocyst byli infikováni také 3 pískomilové a 3 krysy malé, kteří jsou vnímaví k infekci *C. andersoni*. Všechna experimentální zvířata včetně kontrolních byla od 1. DPI denně vyšetřována na přítomnost oocyst kryptosporidií v trusu po dobu 42 DPI pomocí parazitárních a molekulárních metod (viz 3.2.3 a 3.2.4). Každý sedmý den po infekci (7, 14, 21, 28, 35 a 42 DPI) byly vždy tři infikované myši usmrceny zlomením vazů a jejich sleziny a žaludky byly vyšetřeny průtokovou cytometrií (viz 3.2.7). Z jejich slezin byly připraveny *ex vivo* kultury splenocytů a v nich detekovány cytokiny pomocí ELISA testu (antibody-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, viz 3.2.8). Neinfikované myši (NK, 3 jedinci/kontrolní den) byly usmrceny a vyšetřeny stejnými metodami 0. DPI a 42. DPI.

Zbylé myši (21 jedinců) byly následně infikovány 90. DPI dávkou 1×10^6 oocyst *C. muris* TS03/zvíře a byly analyzovány stejnými parazitologickými, molekulárními a imunologickými metodami 0, 3, 5, 7, 11, 14 a 21 dní po následné infekci (DPNI). Pro kontrolu infekitivity oocyst *C. muris* TS03 byly stejnou dávkou infikovány tři imunokompetentní myši BALB/c u kterých primární infekce neproběhla.

3.2.3 Parazitologické vyšetření trusu

Parazitologické vyšetření bylo prováděno denně ve stejný čas po celou dobu primární infekce, popř. reinfekce, až do úplného vyléčení všech experimentálních zvířat. Trus byl odebíráán individuálně. Pro vyhodnocení intenzity infekce byla zjištěna hmotnost trusu (v gramech) jako rozdíl hmotnosti preparátu (trusu natřeného na sklíčku před fixací a barvením) a hmotnosti čistého sklíčka. Nátěr trusu byl poté obarven metodou dle Miláčka a Vítovce (1985) a prohlížen světelným mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje. Při nízké intenzitě infekce byly počítány všechny oocysty nalezené na preparátu, při vysoké intenzitě infekce byl počítán počet oocyst ve 30 náhodných zorných polích. Ze zjištěných údajů (hmotnost trusu, počet zorných polí a počet oocyst na sklíčku) byla spočítána intenzita infekce a vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG, oocysts per gram, Kváč a kol. 2007).

3.2.3.1 Barvení dle Miláčka a Vítovce

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- roztok methylvioleti: 0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml ethanolu (EtOH), 70 ml dH₂O
- 2% H₂SO₄
- roztok tartrazinu: 1% tartrazin v 1% kyselině octové

Pracovní postup:

Tenký nátěr trusu na podložním sklíčku byl fixován methanolem v plameni. Po zchladnutí byl vzorek barven roztokem methylvioleti po dobu 30 min. Po uplynutí stanovené doby byl důkladně opláchnut vodovodní vodou a přibližně 1 min diferencován 2% H₂SO₄. Poté byl opět opláchnut vodovodní vodou a dobarven roztokem tartrazinu přibližně 2 min. Po závěrečném opláchnutí vodovodní vodou a usušení byl vzorek mikroskopicky vyhodnocen.

3.2.4 Molekulární vyšetření trusu

Molekulární vyšetření trusu bylo používáno pro potvrzení druhu a izolátu použitého pro experimentální infekci a pro potvrzení vyléčení experimentálních zvířat z kryptosporidiové infekce. Trus pro molekulární vyšetření byl odebrán při prvním záchytu oocyst v nátěru trusu (viz 3.2.3) a poté v koncových fázích infekce, pokud nebyly tři dny po sobě zachyceny oocysty v nátěru trusu. Z trusu byla vyizolována DNA, provedena nested PCR a vyhodnocení proběhlo pomocí gelové elektroforézy.

3.2.4.1 Izolace DNA:

Izolace DNA byla provedena pomocí komerčního kitu QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany).

Součásti kitu:

ASL pufr, inhibiční tablety, AL pufr, promývací pufry AW1 a AW2, eluční pufr AE, proteináza K a QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami.

Pracovní postup:

K cca 200 mg trusu byly přidány skleněné kuličky (BioSpec Products, Inc., USA) a 1 ml ASL pufru, směs byla zvortexována a následně byly oocysty rozbíjeny pomocí beadbeateru (FastPrep® -24, M.P. Biomedicals, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s. Dále bylo postupováno dle návodu výrobce. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

3.2.4.2 Nested PCR:

Vyizolovaná DNA byla použita pro amplifikaci části genu SSU rDNA pomocí nested PCR (Jiang a kol. 2005) s použitím setu primerů uvedených v Tabulce 4; používaný protokol je uveden v Tabulce 5.

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- PCR H₂O (Top-Bio, ČR)
- MgCl₂ (25 mM, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- deoxyribonukleotid trifosfáty (dNTPs, Top-Bio, ČR)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U/μl, Top-Bio, ČR)
- primery (10 μM, Generi Biotech, ČR, Tabulka 4.)
- bovinní sérový albumin (BSA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)

Tabulka 4. Set primerů pro amplifikaci SSU rDNA

primární reakce	
forward	5` TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3`
reverse	5` CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3`

sekundární reakce	
forward	5` GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3`
reverse	5` CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A 3`

Tabulka 5. PCR protokol pro amplifikaci SSU rDNA

primární reakce			sekundární reakce		
H₂O		11,3 µl	H₂O		12,1 µl
MgCl₂	25 mM	1,2 µl	MgCl₂	25 mM	1,2 µl
10×buffer		2,0 µl	10×buffer		2,0 µl
dNTP	10 mM	0,4 µl	dNTP	10 mM	0,4 µl
forward	10 µM	0,4 µl	forward	10 µM	0,4 µl
reverse	10 µM	0,4 µl	reverse	10 µM	0,4 µl
BSA	10 g/ml	0,8 µl	BSA	10 g/ml	
taq	1 U/1µl	0,5 µl	taq	1 U/1µl	0,5 µl
DNA		3,0 µl	DNA		3,0 µl
celkem		20,0 µl	celkem		20,0 µl

Pracovní postup:

Požadované úseky SSU rDNA (cca 830 bp) byly amplifikovány v termocykleru (Bioer, P. R. China) za použití následujícího programu: počáteční denaturace 3 min při 94 °C, 35 cyklů zahrnujících denuraci 45 s při 94 °C, annealing 45 s při 55 °C a extenzi 60 s při 72 °C, a finální extenze 10 min při 72 °C. Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu byly použity 3 µl primárního PCR produktu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA vyizolovaná ze suspenze oocyst *C. andersoni* získaných z trusu tura domácího.

3.2.4.3 Gelová elektroforéza:

Výsledný PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu a vizualizován pomocí UV záření (302 nm) transiluminátoru (Ultra-Lum Inc, USA) a dokumentován (High Performance UV Transilluminator, Biotech, ČR).

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- 50× TAE pufr: 242 g Tris báze, 457,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA
- agaróza (Serva Electrophoresis, Germany)
- 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Canada)
- ethidium-bromid (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)

Pracovní postup:

Agaróza byla smíchána s 1× TAE puforem v takovém poměru, aby vznikl 1% agarózovém gel. Směs byla rozpuštěna povařením v mikrovlnné troubě a poté ochlazená tekoucí vodou. Do ochlazeného gelu byly přidány 2 µl ethidium-bromidu a směs byla poté nalita do připravené formy a po vložení hřebenu byla nechána ztuhnout. Poté byl gel vložen do elektroforetické vany naplněné 1× TAE puforem,

do jamek bylo aplikováno 20 µl sekundárního PCR produktu a 1× 10 µl ladderu. Gel byl poté vyvíjen až do úplné separace všech fragmentů pod napětím 70 V.

3.2.4.4 Sekvence:

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány v Laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin BC AVČR, v.v.i. kvůli ověření identity druhu a izolátu použitého k infekci experimentálních zvířat. K přípravě vzorků pro sekvenaci byl použit ABI BigDye Terminator verze 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA). Vzorky byly sekvenovány na ABI3130 sekvenátoru (Applied Biosystem, USA). Sekvence byly upraveny v programu ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) a porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí programu ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>).

3.2.5 Izolace IELs (Kearsey a Stadnyk 1996)

Z usmrcených myší byly vyjmuty žaludky, očištěny od zbytků potravy a zpracovány dle následujícího postupu.

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- RPMI 1640 základ (Sigma-Aldrich, USA)
- 2% RPMI: RPMI obsahující 2 % BOFES (boviní fetální sérum, Zvos, ČR)
- PBS
- HEPES-buffered HBSS: 0,49 g HBSS (Sigma-Aldrich, USA) v 50 ml dH₂O, sterilizováno přes filtr 0,22 µm, s přidavkem 50 µl 1 mM DTT (DiThioTreitol, Sigma-Aldrich, USA) a 2,5 ml BOFES
- flow roztok: PBS s 0,2% želatínou (Sigma-Aldrich, USA) a 0,01% azidem sodným (Sigma-Aldrich, USA)
- 100% percoll: 1 díl 10× koncentrovaného PBS, 9 dílů Percoll stock (Sigma-Aldrich, USA), pH 7,2 – 7,4
- 75% percoll: 3 díly 100% percoll, 1 díl 2% RPMI
- 45% percoll: 4,5 dílu 100% percoll, 5,5 dílu 2% RPMI
- 30% percoll: 3 díly 100% percoll, 7 dílů 2% RPMI

Pracovní postup:

Očištěné žaludky byly 2× propláchnuty ve vychlazeném PBS, přeneseny do 2% RPMI a proplachovány ½ hod při 4 °C. Poté byly přeneseny do sterilních zkumavek se 6 ml HBSS a inkubovány ve vodní lázni 1 hod při 37 °C. Poté byly

žaludky vyjmuty a suspenze byla centrifugována 10 min při 150 g a 4 °C. Pelet byl rozmíchán v 5 ml 30% percollu a centrifugován 15 min při 150 g a 4 °C. Sediment byl rozmíchán přidáním 4 ml 45% percollu, v čisté zkumavce navrstven na 3 ml 75% percollu a centrifugován 30 min při 150 g a 4 °C. IELs (v interfázi) byly odebrány a 2× promývány ve flow roztoku 10 min při 150 g a 4 °C. Sediment byl poté přenesen do 96-jamkového mikrotitračního panelu s kulatým dnem (Corning Incorporated, USA) a analyzován pomocí průtokové cytometrie (viz 3.2.7).

3.2.6 Izolace splenocytů

Sleziny odebrané z usmrčených myší byly zpracovány dle následujícího postupu.

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- RPMI 1640 základ (Sigma-Aldrich, USA)
- 10% RPMI: RPMI obsahující 10 % BOFES
- flow roztok: PBS s 0,2% želatinou a 0,01% azidem sodným
- trypanová modř

Pracovní postup:

Slezina vyjmutá z usmrčené myši byla vložena do vychlazeného sterilního RPMI 1640 základ a protlačena přes sterilní sítko pomocí pístu stříkačky. Vzniklá suspenze byla 3× promyta v RPMI 1640 základ centrifugací 10 min při 150 g a 4 °C. Poté byl pelet naředěn 10% RPMI na 1 ml a pomocí trypanové modře byly spočítány splenocyty v Bürkerově komůrce (mikroskop Olympus BX 51, zvětšení 40×). Splenocyty byly poté přeneseny do 96-jamkového mikrotitračního panelu s kulatým dnem v počtu $0,5 \times 10^6$ buněk/jamka a analyzovány pomocí průtokové cytometrie (viz 3.2.7).

3.2.7 Průtoková cytometrie (FACC)

Vyizolované IELs a splenocyty byly po převedení do 96-jamkového mikrotitračního panelu s kulatým dnem zpracovány dle následujících kroků a pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek (MAbs) byly analyzovány jednotlivé leukocytární subpopulace.

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- flow roztok: PBS s 0,2% želatinou a 0,01% azidem sodným
- fluorescenčně značené MAbs proti specifickým receptorům subpopulací leukocytů (eBioscience, USA nebo BD Biosciences, USA)
- fluorescenčně značené kuličky (CountBright Absolute Counting Beads, $0,49 \times 10^5/50 \mu\text{l}$, Invitrogen, USA)

Pracovní postup:

Vyizolované IELs a splenocyty v 96-jamkovém mikrotitračním panelu s kulatým dnem byly naředěny ve flow roztoku a centrifugovány 2 min při 580 g a 4 °C. Na mokry pelet bylo přidáno 10 µl ve flow roztoku předředěných MAbs (Tabulky 6, 7 a 8) a vzorky byly inkubovány 20 min ve tmě při 4 °C. Možnost nespecifického navázání protilátek na povrch buněk byla odstraněna srovnáním s negativní kontrolou, která byla provedena od každého vzorku sleziny a žaludku. Po inkubaci byly vzorky 2× promyty v nadbytku flow roztoku centrifugací 2 min při 580 g a splenocyty byly naředěny opět ve flow roztoku na 150 µl, IELs byly naředěny ve stejném roztoku na 140 µl a ke každému vzorku žaludku bylo přidáno 10 µl fluorescenčně značených kuliček. Panel byl poté vložen do robotizovaného podavače vzorků (HTS) a jednotlivé leukocytární subpopulace byly měřeny průtokovým cytometrem (BD FACSCantoII flow cytometer, BD Biosciences, USA) vybaveným dvěma lasery s excitačními vlnovými délkami 488 a 633 nm; nastavení FACC je uvedeno v Tabulce 9. Získaná data byla analyzována v softwaru BD FACSDiva verze 6.1.3. Naměřená množství splenocytů a IELs byla kvantifikována pomocí předchozího počítání splenocytů v Bürkerově komůrce či pomocí fluorescenčně značených kuliček vždy na celou slezinu, resp. žaludek.

Tabulka 6. Protokol fluorescenčního značení splenocytů a IELs u imunokompetentních myši C57BL/6, imunodeficientních myši C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} infikovaných *Cryptosporidium muris* TS03

značení jednotlivých leukocytárních subpopulací	
sledované subpopulace specifikace protilátky	ředění
leukocyty anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	400×
T-lymfocyty anti-Mouse CD3e FITC; clone eBio500A2; 0,5 mg/ml	50×
B-lymfocyty anti-Mouse CD19 APC-H7; clone 1D3; 0,2 mg/ml	200×
granulocyty anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700; clone RB6-8C5; 0,2 mg/ml	50×
monocyty/makrofágy anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cy7; clone BM8; 0,2 mg/ml	200×
NK buňky anti-Mouse NK1.1 APC; clone PK136; 0,2 mg/ml	100×

značení jednotlivých T-lymfocytárních subpopulací	
sledované subpopulace specifikace protilátky	ředění
leukocyty anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	400×
T-lymfocyty anti-Mouse CD3e FITC; clone eBio500A2; 0,5 mg/ml	50×
CD8+ T-lymfocyty anti-Mouse CD8a APC-H7; clone 53-6.7; 0,2 mg/ml	100×
CD4+ T-lymfocyty anti-Mouse CD4 Alexa Fluor 700 ; clone GK1,5; 0,2 mg/ml	200×
gamma/delta T-lymfocyty ($\gamma\delta$ T-lymfocyty) anti-Mouse gamma delta TCR PE; clone eBioGL3; 0,2 mg/ml	100×

Tabulka 7. Protokol fluorescenčního značení splenocytů a IELs u imunokompetentních BALB/c myši infikovaných *Cryptosporidium andersoni* LI03 a následně infikovaných *C. muris* TS03

značení jednotlivých leukocytárních a T-lymfocytárních subpopulací	
sledované subpopulace specifikace protilátky	ředění
leukocyty anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5; clone 30-F11; 0,2 mg/ml	400×
T-lymfocyty anti-Mouse CD3e FITC; clone eBio500A2; 0,5 mg/ml	50×
B-lymfocyty anti-Mouse CD19 APC-H7; clone 1D3; 0,2 mg/ml	200×
CD4+ T-lymfocyty anti-Mouse CD4 Alexa Fluor 700 ; clone GK1,5; 0,2 mg/ml	200×
CD8+ T-lymfocyty anti-Mouse CD8a PE-Cy7; clone 53-6.7; 0,2 mg/ml	100×
$\gamma\delta$ T-lymfocyty anti-Mouse gamma delta TCR PE; clone eBioGL3; 0,2 mg/ml	100×
NK buňky anti-Mouse CD49b APC; clone DX5; 0,2 mg/ml	100×

Tabulka 8. Emisní a excitační vlnové délky použitých fluorescenčních MAbs

fluorescenční značení	emise (nm)	excitace (nm)	laser
FITC	518	488	modrý
PE	575	488	modrý
PerCP-Cy5,5	690	488	modrý
Pe-Cy7	760	488	modrý
APC	660	633	červený
Alexa Fluor 700	723	633	červený
APC-H7	767	633	červený

Tabulka 9. Nastavení FACC používané pro měření a analýzu vzorků

nastavení laserů		nastavení HTS	
Window Extension	2,0	Sample Flow Rate	1,0
FSC Area Scaling	0,8	Sample Volume (μl)	30,0
Laser Delay Blue	0,0	Mixing Volume (μl)	100,0
Laser Delay Red	30,0	Mixing Speed	100,0
Area Scaling Blue	0,9	Number of Mixes	3,0
Area Scaling Red	1,3	Wash Volume (μl)	400,0

3.2.8 ELISA test

Cytokiny (IFN γ a IL-10) byly detekovány v kultivačním médiu (10% RPMI) splenocytů ELISA testem pomocí komerčně dostupných kitů Mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go! a Mouse IFN γ “Femto-HS” High Sensitivity ELISA Ready-SET-Go! (oba eBioscience, USA).

Součásti kitů:

Mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go!: koutovací protilátka, detekční protilátka, standard (rekombinantní cytokin pro kalibrační křivku), ELISA/ELISPOT koutovací pufr v prášku (ředěn v dH₂O dle návodu výrobce), ředící roztok a detekční enzym (Avidin-HRP, vysoce rekombinantní protein), substrát (tetramethylbenzidin, TMB).

Mouse IFN γ “Femto-HS” High Sensitivity ELISA Ready-SET-Go!: koutovací protilátka (clone AN-18), detekční protilátka (clone R4-6A2), standard (rekombinantní cytokin pro kalibrační křivku), ELISA/ELISPOT koutovací pufr v prášku (ředěn v dH₂O dle návodu výrobce), ředící roztok a detekční enzym (Avidin-HRP), substrát (TMB).

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- 10% RPMI (RPMI obsahující 10 % BOFES)
- 2M H₂SO₄
- promývací roztok: 0,05 % Tween 20 v PBS (0,05% PBS TWEEN)

Pracovní postup:

Splenocyty připravené metodou izolace splenocytů (viz 3.2.6) byly po spočítání v Bürkerově komůrce přeneseny do 96-jamkového mikrotitračního panelu s plochým dnem (Corning Incorporated, USA) v počtu $1,5 \times 10^6$ buněk/jamka v 300 μl 10% RPMI a ponechány 24 hod inkubovat v termostatu při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře. Po inkubaci bylo 200 μl supernatantu z *ex vivo* kultur splenocytů přeneseno do čistého panelu a vzorky byly uchovávány při -80 °C. Rozmražené supernatanty z *ex vivo* kultur

splenocytů byly poté používány pro ELISA test, který byl proveden dle návodu výrobce. Cytokiny IFN γ a IL-10 byly detekovány měřením absorbance spektrofotometrem (FL800 Fluorescence Microplate Reader, Bio-Tek, USA) při vlnové délce 450 nm a analyzovány v softwaru Bio-Tek GEN5 verze 1.10 (Bio-Tek, USA).

3.2.9 Sledování změn genové exprese IFN γ

Genová exprese na úrovni mRNA pro IFN γ v žaludcích experimentálních zvířat byla sledována 28. DPI u imunokompetentních myši C57BL/6 a dvou skupin imunodeficientních myši (C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-}) infikovaných *Cryptosporidium muris* TS03. Ke každé skupině myši byla provedena i NK (0. DPI). Z humánně usmrcených myši byl vyjmut žaludek, očištěn od zbytků potravy, zhomogenizován a z části homogenátu byla vyizolována RNA. Reverzní transkripcí byla RNA převedena na cDNA (komplementární DNA) a ta byla použita pro real-time PCR. Naměřené hodnoty byly srovnány s množstvím mRNA pro IFN γ v žaludku u NK.

3.2.9.1 Izolace RNA:

Izolace RNA byla provedena pomocí komerčního kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany).

Součásti kitu:

RLT pufr, promývací pufr RW1 a RPE, RNase-free H₂O a QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami.

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- PBS
- β -mercaptoethanol (BME, Merck KGaA, Germany)
- 70% EtOH

Pracovní postup:

Žaludky 2 \times promyté ve sterilním chlazeném PBS byly zváženy na laboratorních vahách (Kern, ČR) a poté byly vloženy do homogenizačních zkumavek. K nim byly přidány ocelové kuličky (Stainless Steel Beads, \varnothing 5 mm, Qiagen, Germany) a 1 ml sterilního PBS. Vzorky byly pak homogenizovány v TissueLyserII (Qiagen, Germany) po dobu 5 min rychlostí 30 kmitů/s. K 50 μ l homogenátu bylo přidáno 600 μ l RLT pufru s 1% BME a 650 μ l 70% EtOH. Dále bylo postupováno dle návodu výrobce. Získaná RNA byla uchovávána při -80 °C.

3.2.9.2 Reverzní transkripce:

Vyizolovaná RNA byla pomocí komerčního kitu High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, USA) procesem reverzní transkripce převedena na cDNA dle protokolu uvedeného v Tabulce 10.

Součásti kitu:

20× enzyme mix (obsahující reverzní transkriptázu MuLV a RNázy inhibující protein) a 2× RT pufr (obsahující dNTPs).

Tabulka 10. Protokol pro reverzní transkripci

reverzní transkripce	
20× enzyme mix	1,0 µl
2× RT pufr	10,0 µl
RNA	9,0 µl
celkem	20,0 µl

Pracovní postup:

Reverzní transkripce probíhala v termocykleru (Bioer, P. R. China) s následujícím programem: 60 min 37 °C a 5 min 95 °C, udržovací teplota 4 °C. Získaná cDNA byla uchovávána v -80 °C.

3.2.9.3 Real-time PCR:

Reverzní transkripční získaná cDNA byla využita k semikvantitativní detekci množství mRNA pro β -actin (housekeeping) a IFN γ pomocí real-time PCR; používaný protokol je uveden v Tabulce 11.

Zásobní a pracovní roztoky a chemikálie:

- TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA)
- TaqMan Gene Expression Assay pro β -actin (housekeeping, Assay ID: Hs99999903_m1, obsahuje neznačené PCR primery a fluorescenčně značenou sondu, Applied Biosystems, USA)
- TaqMan Gene Expression Assay pro IFN γ (Assay ID: Mm01168134_m1, obsahuje neznačené PCR primery a fluorescenčně značenou sondu, Applied Biosystems, USA)
- PCR (nuclease-free) H₂O (Applied Biosystems, USA)

Tabulka 11. PCR protokol pro amplifikaci části genů pro β -actin (housekeeping) a IFN γ

β-actin (housekeeping)		IFNγ	
H₂O	8,0 μ l	H₂O	8,0 μ l
Master Mix	10,0 μ l	Master Mix	10,0 μ l
Assay pro β-actin	1,0 μ l	Assay pro IFNγ	1,0 μ l
cDNA	1,0 μ l	cDNA	1,0 μ l
celkem	20,0 μl	celkem	20,0 μl

Pracovní postup:

Amplifikace požadovaných úseků probíhala v cycleru Rotor-Gene RG300 (Corbett research, Qiagen, Germany) v následujících krocích: aktivace sondy 2 min při 50 °C, 45 cyklů zahrnujících denaturaci 15 s při 94 °C a extenzi 60 s při 60 °C. Analýza probíhala v programu Rotor Gene Application Software verze 6.1.71 (Corbett Research, Qiagen, Germany). Změny genové exprese IFN γ byly vyhodnoceny pomocí tzv. delta-delta metody, kde hodnota CT housekeepingového genu byla odečtena od CT sledovaného genu (Δ CT). Změny exprese normalizovaného cílového genu byly následně určeny dle vzorce $2^{-\Delta\Delta CT}$, kde $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ vzorky - ΔCT negativní kontroly (Livak a Schmittgen 2001).

3.2.10 Statistické zpracování výsledků

Statistické vyhodnocení změn množství jednotlivých subpopulací leukocytů v žaludečním epitelu, produkce cytokinů v *ex vivo* kulturách splenocytů a změn genové exprese IFN γ u jednotlivých skupin myši bylo provedeno párovým *t*-testem s dvojstranným rozložením v programu Microsoft Office Excel 2003. Stejným testem byly vyhodnoceny rozdíly mezi průběhy infekcí jednotlivých skupin myši v délce prepatentních a patentních period.

Ke statistickému porovnání průběhu a intenzit infekcí a imunitních odpovědí experimentálních zvířat na základě změn množství leukocytů v žaludečním epitelu a produkce cytokinů v *ex vivo* kulturách splenocytů mezi jednotlivými skupinami myši byla spočítána charakteristika AUC (plocha pod křivkou) podle trapezoidálního pravidla, hodnota C_{max} (maximální množství/intenzita infekci) a hodnota T_{max} (čas, ve kterém byla zjištěna maximální množství/intenzita infekce). Pro následující porovnání spočítaných hodnot AUC, C_{max} a T_{max} bylo použito testování hypotéz prostřednictvím *t*-testu, v některých případech za předpokladu shodných rozptylů (směrodatná odchylka, SD), v některých případech za předpokladu neshodných rozptylů. Statisticky významný rozdíl byl hodnocen dle dosažené hladiny významnosti α (*P*-value), která byla upravena prostřednictvím

Bonfferoniho korekce kvůli zachování hladiny významnosti ($\alpha=0,05$) i při vícenásobném srovnávání. Analýza byla prováděna v programu R 2.13.2 (<http://www.R-project.org/>).

4. VÝSLEDKY

4.1 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE A REINFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH A IMUNODEFICIENTNÍCH C57BL/6 MYŠÍ *CRYPTOSPORIDIUM MURIS* TS03

4.1.1 Průběh infekce

Vyšetření trusu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-}, C57BL/6 CD8^{-/-} a C57BL/6 Pfr1^{-/-} myší infikovaných *C. muris* TS03 prokázalo u všech zvířat přítomnost oocyst kryptosporidií morfologicky a molekulárně shodných s kryptosporidiiemí použitými k infekci.

U imunokompetentních C57BL/6 myší byl první záchyt oocyst mikroskopicky pozorován 8.–10. DPI, podobné délky prepatentních period byly zaznamenány i u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 Pfr1^{-/-} myší. Statisticky významně kratší prepatentní perioda oproti ostatním skupinám byla však pozorována u C57BL/6 CD8^{-/-} myší, kde byly oocysty v trusu zachyceny již od 6.–7. DPI (Graf 1, Tabulky 12 a 13).

Přítomnost oocyst v trusu imunokompetentních C57BL/6 myší byla detekována po dobu 20–28 dní. Téměř stejně dlouhá patentní perioda byla pozorována také u imunodeficientních C57BL/6 Pfr1^{-/-} myší (24–33 dní). Naproti tomu, významně delší patentní perioda byla zjištěna u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} (108–114 dní) a C57BL/6 CD8^{-/-} (29–68 dní) myší (Graf 1, Tabulky 12 a 13).

Imunokompetentní C57BL/6 myší a všechny skupiny imunodeficientních myší se z infekce *C. muris* TS03 vyléčily, což bylo potvrzeno parazitologickým i molekulárním vyšetřením trusu. Navíc při reinfekci imunokompetentních C57BL/6 myší stejným parazitem nebyla zjištěna produkce oocyst, což ukazuje na vzniklou rezistenci.

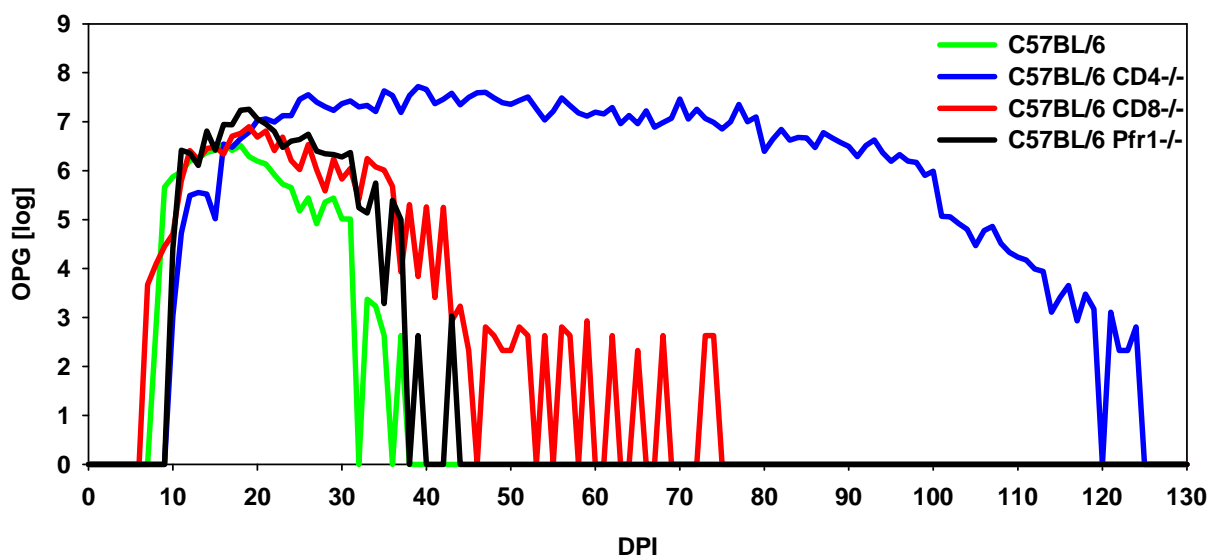
Průběh infekce vyjádřený hodnotou AUC se signifikantně lišil u všech skupin myší s výjimkou vzájemného porovnání imunodeficientních C57BL/6 Pfr1^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší, kde nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl (Graf 1, Tabulky 12 a 13).

Nejvyšší hodnota OPG byla pozorována u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myší ($C_{\max} = 88,88 \times 10^6$ OPG), což je 15,3× více ve srovnání s imunokompetentními C57BL/6 myšmi ($C_{\max} = 5,82 \times 10^6$ OPG). Významný rozdíl v hodnotě C_{\max} byl zjištěn i při porovnání C57BL/6 CD4^{-/-} myší s dalšími sledovanými skupinami imunodeficientních myší. Maximální zjištěná hodnota OPG u imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myší ($C_{\max} = 12,62 \times 10^6$ OPG) a C57BL/6 Pfr1^{-/-} myší ($C_{\max} = 28,22 \times 10^6$ OPG) se vzájemně významně nelišila, přesto ale u těchto dvou skupin imunodeficientních myší byl pozorován signifikantní rozdíl v hodnotách C_{\max} oproti imunokompetentním C57BL/6 myším (Graf 1, Tabulky 12 a 13).

Maximálních hodnot OPG u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši bylo dosaženo až 39. DPI, což je ve srovnání s ostatními skupinami imunokompetentních i imunodeficientních myši významně déle. U imunokompetentních myši C57BL/6 byla C_{max} dosažena již 16. DPI a pouze o tři dny déle, 19. DPI, byla shodně pozorována C_{max} u imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} a C57BL/6 Pfr1^{-/-} myši (Tabulky 12 a 13).

Během infekce nebyly u experimentálních zvířat pozorovány žádné klinické příznaky.

Vzhledem k tomu, že nebyl zaznamenán významný rozdíl v délkách prepatentních a patentních period mezi imunokompetentními C57BL/6 a imunodeficientními C57BL/6 Pfr1^{-/-} myši, byla tato imunodeficientní skupina myši z dalších analýz vyřazena.



Graf 1. Průběh infekce *C. muris* TS03 u imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-}, C57BL/6 CD8^{-/-} a C57BL/6 Pfr1^{-/-} myši; DPI – dny po primární infekci; OPG – počet oocyst na gram trusu

Tabulka 12. Průběh infekce *C. muris* TS03 u imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-}, C57BL/6 CD8^{-/-} a C57BL/6 Pfr1^{-/-} myši

skupina myši	prepatentní perioda (dny)	patentní perioda (dny)	průběh infekce		
			AUC (×10 ⁶)	C _{max} (×10 ⁶)	T _{max} (DPI)
C57BL/6	8–10 (9,1 ± 0,7)	20–28 (24,0 ± 2,8)	27,72	5,82	16
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	9–11 (9,8 ± 0,6)	108–114 (111,9 ± 1,9)	1357,47	88,88	39
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	6–7 (6,4 ± 0,5)	49–68 (58,9 ± 7,7)	66,72	12,62	19
C57BL/6 Pfr1 ^{-/-}	9–10 (9,6 ± 0,5)	24–33 (26,3 ± 2,8)	123,56	28,22	19

Tabulka 13. Porovnání průběhu infekcí *C. muris* TS03 imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-}, C57BL/6 CD8^{-/-} a C57BL/6 Pfr1^{-/-} myši

porovnávané skupiny myši	prepatentní perioda	patentní perioda	průběh infekce		
			AUC	C _{max}	T _{max}
C57BL/6 vs. C57BL/6 CD4 ^{-/-}	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
C57BL/6 vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05
C57BL/6 vs. C57BL/6 Pfr1 ^{-/-}	P>0,05	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05
C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 Pfr1 ^{-/-}	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
C57BL/6 CD8 ^{-/-} vs. C57BL/6 Pfr1 ^{-/-}	P<0,05	P<0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05

4.1.2 Sledování množství IELs v žaludečním epitelu

4.1.2.1 Primární infekce *C. muris* TS03 imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši

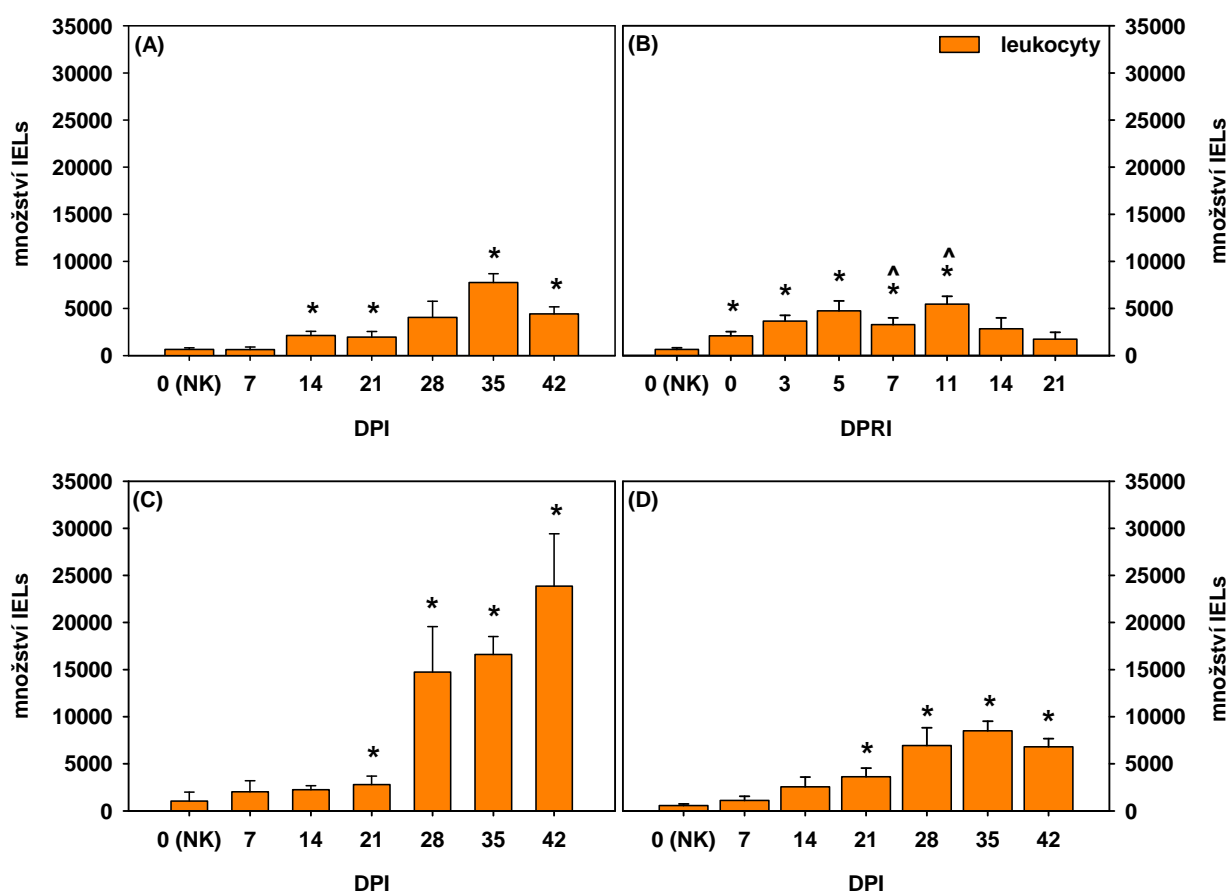
V žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši byl po infekci *C. muris* TS03 zaznamenán vývoj imunitní odpovědi charakterizovaný změnou množství různých typů imunitních buněk.

4.1.2.1.1 Množství leukocytů

Množství leukocytů: počet leukocytů ve sliznici žaludku byl u naivních (NK) imunokompetentních C57BL/6 myši $635,5 \pm 191,5$. Během primární infekce *C. muris* TS03 se významně zvýšil od 14. DPI a C_{max} ($8,17 \times 10^3$) bylo dosaženo 35. DPI, kdy byly pozorovány 12,2× vyšší počty leukocytů ve srovnání s příslušnou NK. V hodnotách AUC, C_{max} a T_{max} se množství leukocytů u imunokompetentních C57BL/6 myši statisticky významně nelišilo od imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši, kde byla naměřena C_{max} $23,86 \times 10^3$ až 42. DPI. V T_{max} (42. DPI) bylo pozorováno zvýšení počtu leukocytů 23,0× oproti NK. Významné zvýšené množství leukocytů bylo u takto deficientních myši zaznamenáno již od 21. DPI ve srovnání s příslušnou NK. U imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myši byly počty leukocytů u NK také nízké ($557,4 \pm 187,0$) a k jejich významnému zvýšení došlo od 21. DPI (ve srovnání s NK). Maximální zvýšení (16,0×) bylo pozorováno 35. DPI, kdy hodnota C_{max} dosáhla $8,97 \times 10^3$. Statisticky významný rozdíl v nástupu imunitní odpovědi (T_{max}) a hodnotě AUC byl pozorován pouze mezi imunodeficientními C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myšmi (Tabulka 14 a Graf 2).

Tabulka 14. Charakteristika a porovnání množství leukocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši během primární infekce *C. muris* TS03

skupina myši	množství leukocytů			porovnávané skupiny myši	množství leukocytů		
	AUC (×10 ³)	C _{max} (×10 ³)	T _{max} (DPI)		AUC	C _{max}	T _{max}
C57BL/6	133,25	7,75	35	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD4 ^{-/-}	P>0,05	P>0,05	P>0,05
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	355,92	23,86	42	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	P>0,05	P>0,05	P>0,05
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	184,90	8,95	35	C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	P<0,05	P>0,05	P<0,05



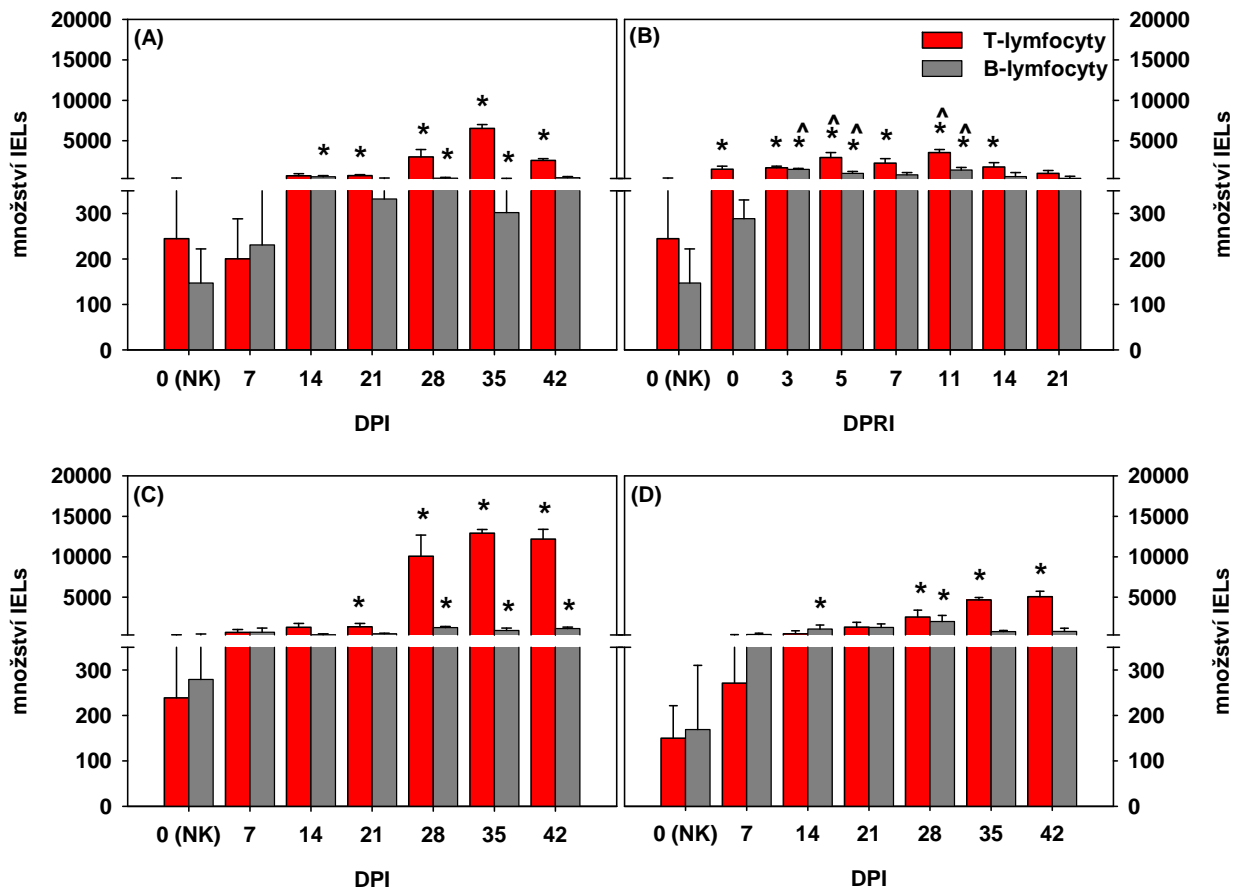
Graf 2. Množství leukocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03; **(A)** Množství leukocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; **(B)** Množství leukocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši v průběhu reinfekce *C. muris* TS03; **(C)** Množství leukocytů v žaludečním epitelu imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; **(D)** Množství leukocytů v žaludečním epitelu imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myši v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; **DPI** – dny po primární infekci; **DPRI** – dny po reinfekci; **IELs** – intraepiteliální leukocyty; **NK** – negativní kontrola; ***** – statisticky významný rozdíl ($P<0,05$) oproti NK (0. DPI); **▲** – statisticky významný rozdíl ($P<0,05$) oproti 0. DPRI

4.1.2.1.2 Množství T- a B-lymfocytů

Množství T-lymfocytů: množství T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši se během primární infekce *C. muris* TS03 významně zvýšilo od 21. DPI oproti příslušné NK, kde bylo zaznamenáno nízké množství T-lymfocytů ($244,5 \pm 168,8$). Nejvyššího množství ($C_{\max} = 6,55 \times 10^3$) bylo dosaženo 35. DPI, kdy se zastoupení T-lymfocytů zvýšilo 26,8 \times . U imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši bylo v žaludeční sliznici příslušné NK naměřeno $238,8 \pm 127,2$ T-lymfocytů, které se v průběhu infekce *C. muris* TS03 zvýšilo 54,1 \times ($C_{\max} = 13,07 \times 10^3$, $T_{\max} = 35$. DPI). Ačkoliv mezi C57BL/6 a C57BL/6 CD4^{-/-} myšmi nebyl pozorován rozdíl v nástupu infekce (T_{\max}), hodnoty AUC a C_{\max} již byly statisticky významně rozdílné. Také obě skupiny sledovaných imunodeficientních myši (C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-}) se vzájemně signifikantně lišily jak v množství T-lymfocytů (AUC), tak i v C_{\max} . Během infekce *C. muris* TS03 u myši s deficitem CD8⁺ T-lymfocytů (C57BL/6 CD8^{-/-}) bylo pozorováno významné zvýšení T-lymfocytů od 28. do 42. DPI (ve srovnání s příslušnou NK) s maximálním zvýšením 33,7 \times 42. DPI ($C_{\max} = 5,24 \times 10^3$). Statisticky významný rozdíl v hodnotách AUC, C_{\max} a T_{\max} nebyl mezi imunokompetentními C57BL/6 a imunodeficientními C57BL/6 CD8^{-/-} myšmi pozorován (Tabulka 15 a Graf 3)

Tabulka 15. Charakteristika a porovnání množství T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši během primární infekce *C. muris* TS03

skupina myši	množství T-lymfocytů			porovnávané skupiny myši	množství T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{\max} ($\times 10^3$)	T_{\max} (DPI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
C57BL/6	88,04	6,55	35	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD4 ^{-/-}	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P > 0,05$
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	228,21	13,07	35	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	83,45	5,24	42	C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P > 0,05$



Graf 3. Množství T- a B-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03; (A) Množství T- a B-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; (B) Množství T- a B-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši v průběhu reinfekce *C. muris* TS03; (C) Množství T- a B-lymfocytů v žaludečním epitelu imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; (D) Množství T- a B-lymfocytů v žaludečním epitelu imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myši v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; **DPI** – dny po primární infekci; **DPRI** – dny po reinfekci; **IELs** – intraepiteliální leukocyty; **NK** – negativní kontrola; * – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti NK (0. DPI); ▲ – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti 0. DPRI

Množství B-lymfocytů: v epitelu žaludku NK imunokompetentních C57BL/6 myši bylo přítomno $147,0 \pm 75,0$ B-lymfocytů, jejichž množství se v průběhu infekce *C. muris* TS03 významně zvýšilo již od 14. DPI. Maximální koncentrace buněk ($C_{\max} = 0,61 \times 10^3$) byla zaznamenána již 14. DPI. Oproti tomu se množství B-lymfocytů v žaludeční sliznici C57BL/6 CD4^{-/-} myši ve srovnání s příslušnou NK ($279,20 \pm 192,0$) významně zvýšilo až mezi 28. a 42. DPI. Maximální zvýšení počtu B-lymfocytů (4,5×) bylo pozorováno 28. DPI, kdy hodnota C_{\max} činila $1,31 \times 10^3$. Podobně u imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myši byla zaznamenána nejvyšší hodnota B-lymfocytů 28. DPI ($C_{\max} = 2,13 \times 10^3$), a to 11,9× více oproti NK. Statisticky významně zvýšené množství B-lymfocytů u C57BL/6 CD8^{-/-} myši bylo zaznamenáno pouze 14. a 28. DPI. Žádný statisticky významný rozdíl nebyl pozorován

mezi primárními infekcemi *C. muris* TS03 u imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši v množství B-lymfocytů (AUC), nástupu imunitní odpovědi (T_{max}) a maximálního zvýšení B-lymfocytů (C_{max}, Graf 3 a Tabulka 16)

Tabulka 16. Charakteristika a porovnání množství B-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši během primární infekce *C. muris* TS03

skupina myši	množství B-lymfocytů			porovnávané skupiny myši	množství B-lymfocytů		
	AUC (×10 ³)	C _{max} (×10 ³)	T _{max} (DPI)		AUC	C _{max}	T _{max}
C57BL/6	14,75	0,61	14	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD4 ^{-/-}	P>0,05	P>0,05	P>0,05
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	31,04	1,31	28	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	P>0,05	P>0,05	P>0,05
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	42,25	2,13	28	C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	P>0,05	P>0,05	P>0,05

4.1.2.1.3 Množství CD4⁺, CD8⁺ a γδ T-lymfocytů

Množství CD4⁺ T-lymfocytů: v epitelu žaludku NK imunokompetentních C57BL/6 myši bylo zaznamenáno 73,9 ± 42,4 CD4⁺ T-lymfocytů, jejichž množství se během primární infekce *C. muris* TS03 zvýšilo 35,4× 35. DPI (C_{max} = 2,62×10³). Zvýšené množství CD4⁺ T-lymfocytů v žaludeční sliznici C57BL/6 myši bylo pozorováno již od 14. DPI, avšak statisticky významně zvýšené počty CD4⁺ T-lymfocytů byly v žaludečním epitelu přítomny až od 21. DPI a setrvaly zde až do konce sledování (42. DPI). Ačkoliv nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami C_{max} u imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myši, maximální naměřené množství CD4⁺ T-lymfocytů u imunokompetentních C57BL/6 myši bylo 1,6× nižší ve srovnání s C57BL/6 CD8^{-/-} myšmi (C_{max} = 4,27×10³), které se oproti příslušné NK navýšilo až 49,5× v T_{max} (42. DPI). Přesto byl statisticky významně zvýšený počet CD4⁺ T-lymfocytů v žaludeční sliznici takto imunodeficientních myši pozorován o 7 dní později (od 28. DPI) než tomu bylo u imunokompetentních C57BL/6 myši. Statisticky významný rozdíl v průběhu infekce (AUC) či v době nástupu imunitní odpovědi (T_{max}) mezi C57BL/6 a C57BL/6 CD8^{-/-} myšmi nebyl zaznamenán. U imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši nebyly v žaludečním epitelu pozorovány žádné CD4⁺ T-lymfocyty (Tabulka 17 a Graf 4).

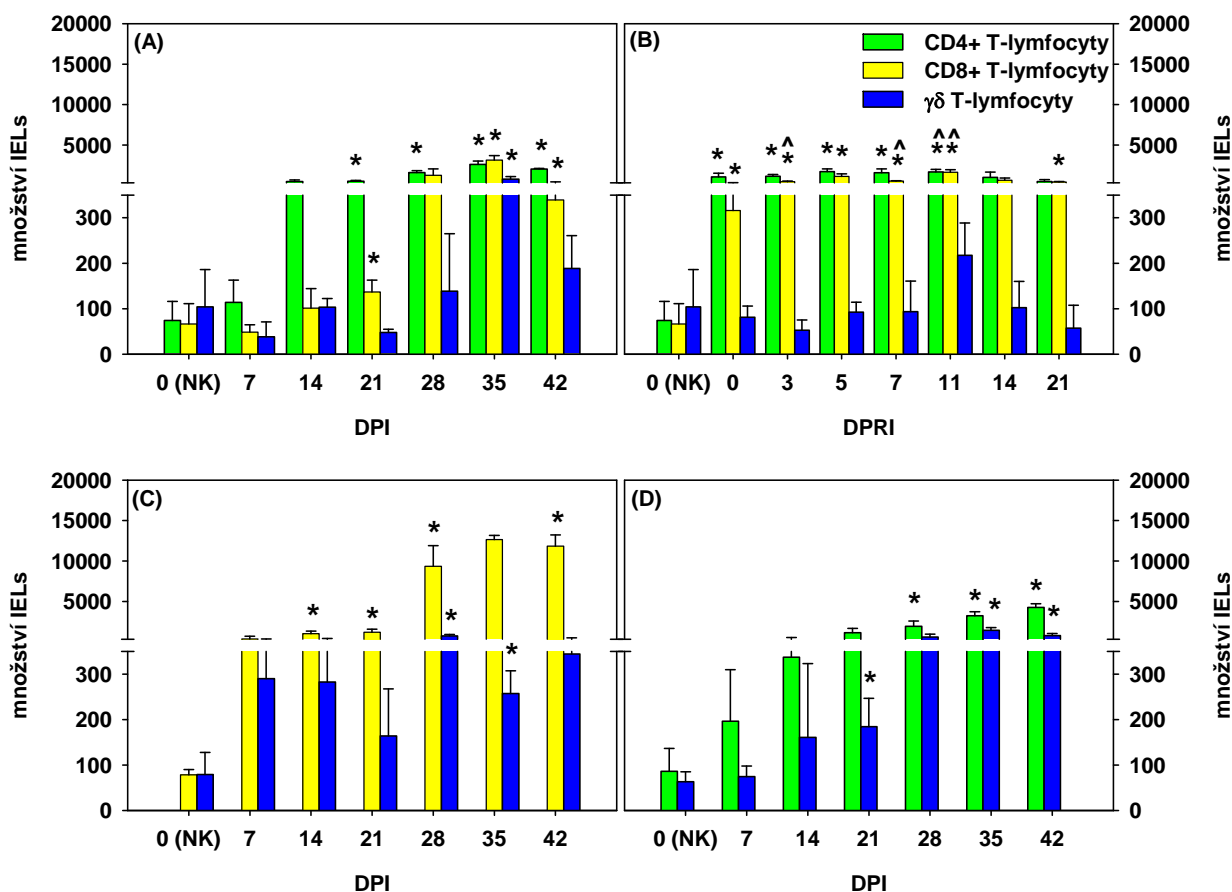
Tabulka 17. Charakteristika a porovnání množství CD4+ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši během primární infekce *C. muris* TS03

skupina myši	množství CD4+ T-lymfocytů			porovnávané skupiny myši	množství CD4+ T-lymfocytů		
	AUC (×10 ³)	C _{max} (×10 ³)	T _{max} (DPI)		AUC	C _{max}	T _{max}
C57BL/6	44,85	2,62	35	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD4 ^{-/-}	-	-	-
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	-	-	-	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	P>0,05	P>0,05	P>0,05
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	63,15	4,27	42	C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	-	-	-

Množství CD8+ T-lymfocytů: statisticky významně zvýšené množství CD8+ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši během primární infekce *C. muris* TS03 bylo pozorováno od 21. DPI a jejich počty se z 66,4 ± 44,4 u NK zvýšily 47,2× v 35. DPI, kde byla naměřena hodnota C_{max} = 3,14×10³. Maximální zaznamenané množství CD8+ T-lymfocytů v žaludku C57BL/6 myši bylo statisticky významně nižší (4,1×) oproti hodnotě C_{max} (12,83×10³) u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši. Zde se počet CD8+ T-lymfocytů zvýšil 161,3× z původních 78,4 ± 11,7 u příslušné NK také 35. DPI. Statisticky významně zvýšené množství CD8+ T-lymfocytů zde bylo pozorováno od 28. až do 42. DPI. Imunokompetentní C57BL/6 a imunodeficientní C57BL/6 CD4^{-/-} myši se také významně lišily v hodnotě AUC, ale v dosažení maximálního množství (T_{max}) rozdíly zaznamenány nebyly. U imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myši nebyly v místě infekce přítomny žádné CD8+ T-lymfocyty (Tabulka 18 a Graf 4).

Tabulka 18. Charakteristika a porovnání množství CD8+ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši během primární infekce *C. muris* TS03

skupina myši	množství CD8+ T-lymfocytů			porovnávané skupiny myši	množství CD8+ T-lymfocytů		
	AUC (×10 ³)	C _{max} (×10 ³)	T _{max} (DPI)		AUC	C _{max}	T _{max}
C57BL/6	34,30	3,14	35	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD4 ^{-/-}	P<0,05	P<0,05	P>0,05
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	213,79	12,83	35	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	-	-	-
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	-	-	-	C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	-	-	-



Graf 4. Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03; **(A)** Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myší v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; **(B)** Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myší v průběhu reinfekce *C. muris* TS03; **(C)** Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myší v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; **(D)** Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myší v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; **DPI** – dny po primární infekci; **DPRI** – dny po reinfekci; **IELs** – intraepiteliální leukocyty; **NK** – negativní kontrola; * – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti NK (0. DPI); ▲ – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti 0. DPRI

Množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů: u NK imunokompetentních C57BL/6 myší bylo v žaludeční sliznici přítomno pouze $104,1 \pm 82,1$ $\gamma\delta$ T-lymfocytů, jejichž množství zůstalo po celou dobu primární infekce *C. muris* TS03 na podobné hladině, statisticky významně zvýšené množství bylo pozorováno pouze v 35. DPI, kdy byla naměřena $C_{\max} = 0,80 \times 10^3$ $\gamma\delta$ T-lymfocytů. Jen o málo nižší hodnota C_{\max} ($0,74 \times 10^3$) byla pozorována také u myší s deficitem CD4+ T-lymfocytů (C57BL/6 CD4^{-/-}), u nichž byl maximální počet $\gamma\delta$ T-lymfocytů v místě infekce zjištěn o 7 dní dříve (28. DPI). Statisticky významné zvýšení $\gamma\delta$ T-lymfocytů u C57BL/6 CD4^{-/-} myší bylo zaznamenáno pouze 28. a 35. DPI ve srovnání s příslušnou NK, kde byly počty $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludeční sliznici také velmi nízké ($79,1 \pm 49,0$). Podobné množství

$\gamma\delta$ T-lymfocytů ($63,7 \pm 21,8$) bylo také pozorováno u NK imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myší. U takto imunodeficientních myší bylo však pozorováno téměř dvojnásobné zvýšení počtu $\gamma\delta$ T-lymfocytů ($C_{\max} = 1,45 \times 10^3$, $T_{\max} = 35$. DPI) ve srovnání s příslušnou NK, které bylo jako statisticky významně zvýšené detekováno již od 21. DPI. Přesto ale nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi primárními infekcemi *C. muris* TS03 imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních myší v hodnotách AUC, T_{\max} a C_{\max} (Graf 4 a Tabulka 19)

Tabulka 19. Charakteristika a porovnání množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší během primární infekce *C. muris* TS03

skupina myší	množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů			porovnávané skupiny myší	množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{\max} ($\times 10^3$)	T_{\max} (DPI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
C57BL/6	8,89	0,80	35	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD4 ^{-/-}	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	13,69	0,74	28	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	20,30	1,45	35	C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$

4.1.2.1.4 Množství NK buněk, monocytů/makrofágů a granulocytů

V žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší byla zaznamenána přítomnost NK buněk a monocytů/makrofágů po celou dobu primární infekce *C. muris* TS03. Výskyt granulocytů v žaludeční sliznici během infekce nebyl zjištěn u žádné sledované skupiny myší.

Množství NK buněk: u neinfikovaných C57BL/6 myší byla zjištěna přítomnost nízkého počtu NK buněk ($86,2 \pm 50,6$) v žaludeční sliznici a jejich statisticky významně zvýšené množství v epitelu žaludku nebylo během primární infekce *C. muris* TS03 zaznamenáno; nejvyšší množství zde bylo pozorováno již 14. DPI, kdy C_{\max} dosáhla hodnoty $0,18 \times 10^3$, což značí zvýšení pouze $1,7\times$ ve srovnání s NK. U imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myší byly počty NK buněk v neinfikovaných zvířatech téměř totožné jako u imunokompetentních myší ($83,6 \pm 41,4$) a v žádné ze sledovaných hodnot (AUC , C_{\max} a T_{\max}) se zvýšení množství NK buněk v žaludečním epitelu statisticky významně nelišilo. Přesto u C57BL/6 CD4^{-/-} myší bylo pozorováno významné zvýšení NK buněk v 28. DPI a hodnota C_{\max} zde činila $0,23 \times 10^3$. U dalších imunodeficientních myší, C57BL/6 CD8^{-/-}, byly významně zvýšené počty NK buněk zaznamenány 14.–35. DPI s maximem 28. DPI ($C_{\max} = 0,30 \times 10^3$). Přesto nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v množství NK

buněk přítomných v místě infekce (hodnoty AUC, C_{\max} a T_{\max}) mezi imunokompetentními a imunodeficientními myši během primární infekce *C. muris* TS03 (Tabulka 20 a Graf 5).

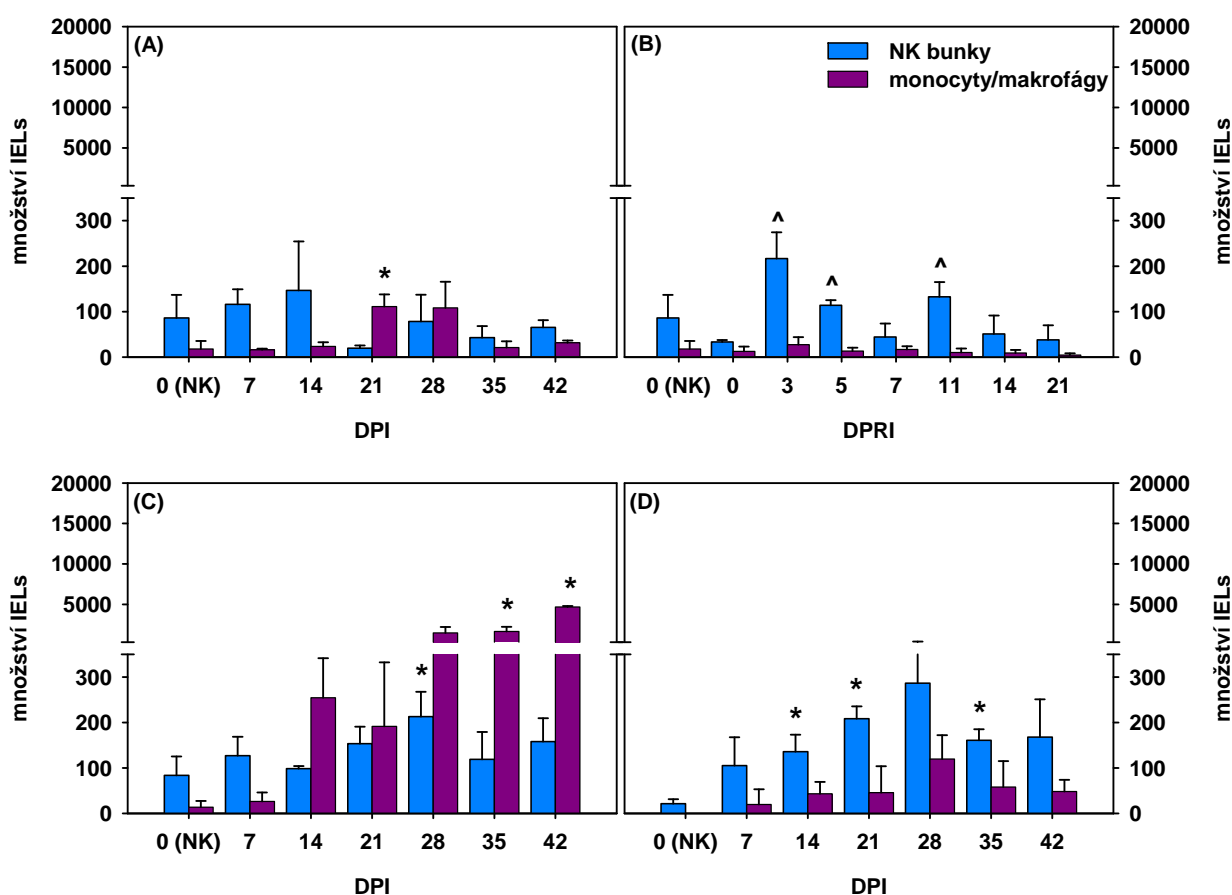
Tabulka 20. Charakteristika a porovnání množství NK buněk v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši během primární infekce *C. muris* TS03

skupina myši	množství NK buněk			porovnávané skupiny myši	množství NK buněk		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{\max} ($\times 10^3$)	T_{\max} (DPI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
C57BL/6	3,35	0,18	14	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD4 ^{-/-}	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	5,82	0,23	28	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	6,94	0,30	28	C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$

Množství monocytů/makrofágů: monocyty/makrofágy se v žaludečním epitelu NK imunokompetentních C57BL/6 myši vyskytovaly ve velmi nízkých počtech $17,8 \pm 17,8$ a během primární infekce *C. muris* TS03 bylo jejich významné zvýšení pozorováno pouze 21. DPI. Počet monocytů/makrofágů se u C57BL/6 myši v C_{\max} ($0,14 \times 10^3$) navýšil $6,2\times$, což je významně méně než u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši, kde byl jejich počet znásoben $341,6\times$ ($C_{\max} = 4,71 \times 10^3$) 42. DPI. U takto imunodeficientních myši byla zvýšená množství monocytů/makrofágů ve sliznici žaludku zjištěna od 14. DPI, statisticky významně však pouze od 35. DPI. Naproti tomu u myši s deficitem CD8⁺ T-lymfocytů byly počty monocytů/makrofágů po celou dobu infekce *C. muris* TS03 nízké, C_{\max} ($0,13 \times 10^3$, 28. DPI) bylo významně nižší ve srovnání s C57BL/6 CD4^{-/-} myši a oproti imunokompetentním C57BL/6 myším se významně nelišilo. Přesto bylo pozorováno významně zvýšené množství těchto buněk v místě infekce C57BL/6 CD8^{-/-} myši již od 14. DPI při porovnání s NK, kde nebyla zjištěna přítomnost monocytů/makrofágů v epitelu žaludku. V hodnotách AUC a T_{\max} nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi sledovanými skupinami myši (Tabulka 21 a Graf 5).

Tabulka 21. Charakteristika a porovnání množství monocytů/makrofágů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší během primární infekce *C. muris* TS03

skupina myší	množství monocytů/makrofágů			porovnávané skupiny myší	množství monocytů/makrofágů		
	AUC (×10 ³)	C _{max} (×10 ³)	T _{max} (DPI)		AUC	C _{max}	T _{max}
C57BL/6	2,13	0,14	21	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD4 ^{-/-}	P>0,05	P<0,05	P>0,05
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	41,71	4,67	42	C57BL/6 vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	P>0,05	P>0,05	P>0,05
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	2,17	0,13	28	C57BL/6 CD4 ^{-/-} vs. C57BL/6 CD8 ^{-/-}	P>0,05	P<0,05	P>0,05



Graf 5. Množství NK buněk a monocytů/makrofágů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03; (A) Množství NK buněk a monocytů/makrofágů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myší v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; (B) Množství NK buněk a monocytů/makrofágů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myší v průběhu reinfekce *C. muris* TS03; (C) Množství NK buněk a monocytů/makrofágů v žaludečním epitelu imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myší v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; (D) Množství NK buněk a monocytů/makrofágů v žaludečním epitelu imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myší v průběhu primární infekce *C. muris* TS03; **DPI** – dny po primární infekci; **DPRI** – dny po reinfekci; **IELs** – intraepiteliální leukocyty; **NK** – negativní kontrola; * – statisticky významný rozdíl (P<0,05) oproti NK (0. DPI); ^ – statisticky významný rozdíl (P<0,05) oproti 0. DPRI

4.1.2.2 Primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03 imunokompetentních C57BL/6 myši

U imunokompetentních C57BL/6 myši bylo během primární infekce (viz 4.1.2.1) a reinfekce *C. muris* TS03 zaznamenáno zvýšené množství různých typů imunitních buněk v epitelu žaludku a vývoj imunitní odpovědi přímo v místě infekce.

4.1.2.2.1 Množství leukocytů

Množství leukocytů: v důsledku změn během primární infekce *C. muris* TS03 (viz 4.1.2.1.1) bylo zaznamenáno 90. DPI v epitelu žaludku imunokompetentních C57BL/6 myši i po jejich úplném vyléčení 3,3× zvýšené množství leukocytů ve srovnání s NK. Při následné reinfekci těchto myši stejným druhem kryptosporidie, *C. muris* TS03, byl pozorován nárůst množství leukocytů v epitelu žaludku 7. a 11. DPRI ve srovnání s 0. DPRI. Nejvyšší zaznamenané množství ($C_{\max} = 5,45 \times 10^3$) při reinfekci bylo nižší než C_{\max} během primární infekce C57BL/6 myši, avšak po reinfekci myši *C. muris* TS03 došlo k významně rychlejší imunitní odpovědi charakterizované zvýšeným množstvím leukocytů, T_{\max} zde byla pozorována již 11. DPRI. Statisticky významný rozdíl mezi průběhem primární infekce a reinfekce byl zjištěn také v hodnotě AUC (Graf 2 a Tabulka 22).

Tabulka 22. Charakteristika a porovnání množství leukocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03

infekce	množství leukocytů			porovnávané infekce	množství leukocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{\max} ($\times 10^3$)	T_{\max} (DPI/DPRI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
primární infekce	133,25	7,75	35	primární infekce vs. reinfekce	$P < 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$
reinfekce	70,95	5,45	11				

4.1.2.2.2 Množství T- a B-lymfocytů

Množství T-lymfocytů: také 90. DPI (0. DPRI) bylo detekováno statisticky významně 6,1× vyšší množství T-lymfocytů než u NK. Po reinfekci těchto myši *C. muris* TS03 byl pozorován významně zvýšený počet T-lymfocytů v místě infekce 5. a 11. DPRI ve srovnání s 0. DPRI. Nejvyšší množství T-lymfocytů ($C_{\max} = 3,56 \times 10^3$) bylo zaznamenáno 11. DPRI, statisticky významně dříve než při primární infekci a významný rozdíl byl pozorován i v hodnotách C_{\max} , která byla při reinfekci C57BL/6 myši 1,8× nižší než při primární infekci. Také v hodnotě AUC byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi průběhem primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03 (Graf 3 a Tabulka 23).

Tabulka 23. Charakteristika a porovnání množství T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myší během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03

infekce	množství T-lymfocytů			porovnávané infekce	množství T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C _{max} ($\times 10^3$)	T _{max} (DPI/DPRI)		AUC	C _{max}	T _{max}
primární infekce	88,04	6,55	35	primární infekce vs. reinfekce	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
reinfekce	43,80	3,56	11				

Množství B-lymfocytů: množství B-lymfocytů u imunokompetentních C57BL/6 myší zůstalo v žaludečním epitelu 2,0× zvýšeno i po vyléčení z primární infekce *C. muris* TS03 (viz 4.1.2.1.2). Po následné reinfekci byl pozorován významný nárůst množství B-lymfocytů v žaludeční sliznici od 3. DPRI (ve srovnání s 0. DPRI) s maximem 11. DPRI (C_{max} = 1,58×10³), což je významně více (2,6×) než dosažená C_{max} během primární infekce. Nicméně v hodnotách T_{max} a AUC nebyl zaznamenán rozdíl mezi primární infekcí *C. muris* TS03 a reinfekcí stejným parazitem (Graf 3 a Tabulka 24).

Tabulka 24. Charakteristika a porovnání množství B-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myší během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03

infekce	množství B-lymfocytů			porovnávané infekce	množství B-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C _{max} ($\times 10^3$)	T _{max} (DPI/DPRI)		AUC	C _{max}	T _{max}
primární infekce	14,75	0,61	14	primární infekce vs. reinfekce	<i>P</i> >0,05	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> >0,05
reinfekce	17,52	1,58	3				

4.1.2.2.3 Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů

Množství CD4+ T-lymfocytů: během primární infekce bylo pozorováno významně zvýšené množství CD4+ T-lymfocytů v epitelu žaludku imunokompetentních C57BL/6 myší (viz 4.1.2.1.3) a téměř dva měsíce po jejich vyléčení (90. DPI = 0. DPRI) byl zaznamenán 14,7× vyšší počet CD4+ T-lymfocytů v místě infekce oproti NK. V průběhu reinfekce *C. muris* TS03 se množství CD4+ T-lymfocytů oproti 0. DPRI významně zvýšilo pouze 11. DPRI, kdy bylo dosaženo C_{max} (2,00×10³), což je významně dříve než při primární infekci. Přesto ale nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v hodnotách C_{max}, která dokonce během reinfekce dosáhla 1,2× nižších hodnot než u primární infekce *C. muris* TS03. Naproti tomu, porovnání hodnot AUC prokázalo statisticky významný rozdíl mezi zvýšeným počtem CD4+ T-lymfocytů v epitelu žaludku během primární infekce a reinfekce (Graf 4 a Tabulka 25).

Tabulka 25. Charakteristika a porovnání množství CD4+ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myší během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03

infekce	množství CD4+ T-lymfocytů			porovnávané infekce	množství CD4+ T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C _{max} ($\times 10^3$)	T _{max} (DPI/DPRI)		AUC	C _{max}	T _{max}
primární infekce	44,85	2,62	35	primární infekce vs. reinfekce	P<0,05	P>0,05	P<0,05
reinfekce	25,40	2,00	11				

Množství CD8+ T-lymfocytů: také po vyléčení imunokompetentních C57BL/6 myší z primární infekce *C. muris* TS03, během které byl zaznamenán významný nárůst počtu CD8+ T-lymfocytů ve sliznici žaludku (viz 4.1.2.1.3), bylo ve srovnání s NK zjištěno významně vyšší (4,8×) množství tohoto typu T-lymfocytů perzistujících v žaludečním epitelu až do 90. DPI (0. DPRI). Během následné reinfekce *C. muris* TS03 došlo k významnému zvýšení množství CD8+ T-lymfocytů v místě infekce již 3., 7. a 11.DPI (ve srovnání s 0. DPRI). Hodnota C_{max} ($1,65 \times 10^3$), dosažená již 11. DPRI, byla přesto 1,9× nižší než při primární infekci, ačkoliv žádný statisticky významný rozdíl mezi hodnotami C_{max} nebyl mezi primární infekcí *C. muris* TS03 a následnou reinfekcí zaznamenán. Nicméně zvýšené množství CD8+ T-lymfocytů bylo během reinfekce zjištěno významně dříve (hodnota T_{max}) než při primární infekci, ačkoliv nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi navýšením počtu CD8+ T-lymfocytů při primární infekci a reinfekci v hodnotě AUC (Graf 4 a Tabulka 26).

Tabulka 26. Charakteristika a porovnání množství CD8+ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myší během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03

infekce	množství CD8+ T-lymfocytů			porovnávané infekce	množství CD8+ T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C _{max} ($\times 10^3$)	T _{max} (DPI/DPRI)		AUC	C _{max}	T _{max}
primární infekce	34,30	3,14	35	primární infekce vs. reinfekce	P>0,05	P>0,05	P<0,05
reinfekce	16,21	1,65	11				

Množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů: narozdíl od primární infekce *C. muris* TS03 imunokompetentních C57BL/6 myší (viz 4.1.2.1.3) nebylo během reinfekce stejným parazitem pozorováno žádné statisticky významné zvýšení počtu $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu (ve srovnání s 0. DPRI) a překvapivě také nebylo v 90. DPI (0. DPRI) zjištěno statisticky významně zvýšené množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů ve sliznici žaludku, naopak toto množství ve srovnání s NK mírně pokleslo. Hodnota C_{max} dosáhla pouze $0,22 \times 10^3$, což

je 3,6× méně než bylo zjištěno při primární infekci. Významný rozdíl mezi navýšením množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů v místě infekce při primární infekci a reinfekci byl pozorován pouze v hodnotě T_{max} , u hodnot AUC a C_{max} statisticky významný rozdíl nebyl zaznamenán (Graf 4 a Tabulka 27).

Tabulka 27. Charakteristika a porovnání množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03

infekce	množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů			porovnávané infekce	množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{max} ($\times 10^3$)	T_{max} (DPI/DPRI)		AUC	C_{max}	T_{max}
primární infekce	8,89	0,80	35	primární infekce vs. reinfekce	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$
reinfekce	2,19	0,22	11				

4.1.2.2.4 Množství NK buněk, monocytů/makrofágů a granulocytů

V průběhu reinfekce *C. muris* TS03 byla v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši pozorována přítomnost NK buněk a monocytů/makrofágů, stejně jako během primární infekce totožným parazitem (viz 4.1.2.1.5). Výskyt granulocytů nebyl v epitelu žaludku pozorován při primární infekci (viz 4.1.2.1.5) ani při následné reinfekci.

Množství NK buněk: 90. DPI (0. DPRI) bylo v žaludeční sliznici C57BL/6 myši vyléčených z primární infekce *C. muris* TS03 pozorováno 2,6× nižší množství NK buněk, které se ale během reinfekce významně zvýšilo již od 3. DPRI s C_{max} $0,22 \times 10^3$ zaznamenanou 3. DPRI. Přesto ale nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi nárůstem množství NK buněk v místě infekce během primární infekce a reinfekce v žádné ze sledovaných hodnot (AUC, C_{max} a T_{max} , Graf 5 a Tabulka 28).

Tabulka 28. Charakteristika a porovnání množství NK buněk v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03

infekce	množství NK buněk			porovnávané infekce	množství NK buněk		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{max} ($\times 10^3$)	T_{max} (DPI/DPRI)		AUC	C_{max}	T_{max}
primární infekce	3,35	0,18	14	primární infekce vs. reinfekce	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
reinfekce	1,80	0,22	3				

Množství monocytů/makrofágů: po vyléčení C57BL/6 myši z primární infekce *C. muris* TS03 bylo 90. DPI (0. DPRI) ve sliznici žaludku pozorováno téměř totožné množství monocytů/makrofágů jako u NK, které se během reinfekce *C. muris* TS03 statisticky významně nezměnilo. Ačkoliv statisticky významný rozdíl v dosažené C_{max} mezi

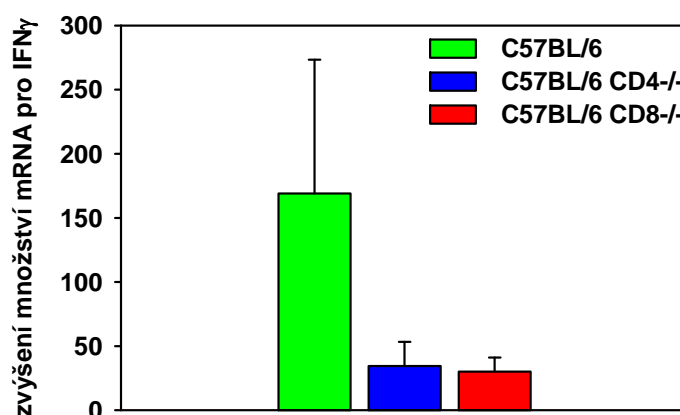
průběhem primární infekce a reinfekce nebyl zjištěn, hodnota C_{max} ($0,03 \times 10^3$) byla $4,7 \times$ nižší ve srovnání s C_{max} zaznamenanou při primární infekci. Navíc byla C_{max} pozorována již 3. DPRI, což je významně dříve než během primární infekce. Množství monocytů/makrofágů v místě infekce se v průběhu reinfekce *C. muris* TS03 také významně lišilo (hodnota AUC) od zvýšení počtu těchto buněk zaznamenaného během primární infekce stejným parazitem (Graf 5 a Tabulka 29).

Tabulka 29. Charakteristika a porovnání množství monocytů/makrofágů v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši během primární infekce a reinfekce *C. muris* TS03

infekce	množství monocytů/makrofágů			porovnávané infekce	množství monocytů/makrofágů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{max} ($\times 10^3$)	T_{max} (DPI/DPRI)		AUC	C_{max}	T_{max}
primární infekce	2,13	0,14	21	primární infekce vs. reinfekce	$P < 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$
reinfekce	0,26	0,03	3				

4.1.3 Sledování změn genové exprese $IFN\gamma$ v žaludečním epitelu

V žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 myši infikovaných *C. muris* TS03 bylo 28. DPI pozorováno $169,0 \pm 104,5 \times$ vyšší množství mRNA pro $IFN\gamma$ oproti NK, což je $4,9 \times$ vyšší množství ve srovnání s 28. DPI u imunodeficientních C57BL/6 $CD4^{-/-}$ myši, kde byl pozorován nárůst množství mRNA pro $IFN\gamma$ pouze $34,3 \pm 18,9 \times$ oproti příslušné NK. Podobný trend byl pozorován i 28. DPI u imunodeficientních C57BL/6 $CD8^{-/-}$ myši, zde bylo množství mRNA pro $IFN\gamma$ ve srovnání s příslušnou NK zvýšeno pouze $30,0 \pm 11,0 \times$, což je $5,6 \times$ nižší množství mRNA pro $IFN\gamma$ než u imunokompetentních C57BL/6 myši (Graf 6).



Graf 6. Zvýšení množství mRNA pro $IFN\gamma$ v žaludečním epitelu 28. DPI *C. muris* TS03 u imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 $CD4^{-/-}$ a C57BL/6 $CD8^{-/-}$ myši oproti NK

4.1.4 Analýza splenocytů

Ve slezinách neinfikovaných imunokompetentních C57BL/6 myší (NK) bylo zaznamenáno $14,9 \times 10^6$ T-lymfocytů a $24,6 \times 10^6$ B-lymfocytů, jejichž množství se během primární infekce *C. muris* TS03 statisticky významně nezměnila. Velmi podobné počty T- a B-lymfocytů byly pozorovány i během reinfekce C57BL/6 myší *C. muris* TS03. U imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myší měly T- a B-lymfocyty ve slezině rovněž velmi podobné hodnoty jako příslušná NK ($10,5 \times 10^6$ T-lymfocytů a $26,5 \times 10^6$ B-lymfocytů), stejný trend byl pozorován i u C57BL/6 CD8^{-/-} myší ($19,1 \times 10^6$ T-lymfocytů a $52,1 \times 10^6$ B-lymfocytů).

Poměr CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů u NK imunokompetentních C57BL/6 myší byl 1,8:1 ($9,5 \times 10^6$ CD4⁺ a $5,4 \times 10^6$ CD8⁺ T-lymfocytů) a během primární infekce došlo ke změně poměru mezi CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty 1,3:1 (28. DPI). V průběhu reinfekce C57BL/6 myší se tento poměr ještě více snížil na 1,1:1 (21. DPRI). Ve slezinách NK imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myší byl počet sledovaných CD8⁺ T-lymfocytů $10,2 \times 10^6$, u NK imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myší činil počet CD4⁺ T-lymfocytů $18,2 \times 10^6$. Množství CD4⁺ či CD8⁺ T-lymfocytů se ani u jedné ze skupin imunodeficientních C57BL/6 myší v průběhu infekce *C. muris* TS03 významně nezměnilo. Přítomnost $\gamma\delta$ T-lymfocytů ve slezině imunokompetentních C57BL/6 myší byla pozorována v nízkých množstvích ($C_{\max} 1,1 \times 10^6$, 14. DPI), stejně tak během reinfekce. Velmi podobný trend byl pozorován i u obou skupin imunodeficientních myší.

Ve slezinách neinfikovaných imunokompetentních C57BL/6 myší (NK) bylo zaznamenáno $1,4 \times 10^6$ NK buněk, jejichž množství se během primární infekce či reinfekce *C. muris* TS03 výrazně nezvýšilo, stejně tak nebylo pozorováno žádné zvýšení NK buněk u obou skupin imunodeficientních myší vůči příslušným NK. Stejný trend byl pozorován i u monocytů/makrofágů, jejichž počty se oproti NK imunokompetentních C57BL/6 myší ($0,4 \times 10^6$) nezměnily během primární infekce ani reinfekce *C. muris* TS03. Žádné zvýšení nebylo pozorováno ani u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší, kde počty monocytů/makrofágů dosahovaly velmi podobné hladiny jako u imunokompetentních C57BL/6 myší. Narozdíl od epitelu žaludku byla ve slezině zaznamenána přítomnost granulocytů, jejichž počty byly u všech sledovaných skupin myší nízké a během primární infekce či reinfekce nebylo zaznamenáno žádné zvýšení, nejvyšší dosažená hladina byla pozorována u imunokompetentních C57BL/6 myší 5. DPRI ($C_{\max} 1,8 \times 10^6$).

4.2 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH BALB/c MYŠÍ *CRYPTOSPORIDIUM ANDERSONI* LI03 A NÁSLEDNÁ INFEKCE *C. MURIS* TS03

4.2.1 Průběh infekce

Přítomnost oocyst *C. andersoni* LI03 v trusu infikovaných BALB/c myši nebyla zaznamenána parazitologickým ani molekulárním vyšetřením, což prokazuje nevnímavost myši k izolátu *C. andersoni* LI03. Při následné infekci *C. muris* TS03, ke kterému jsou myši běžně vnímavé, nebyla produkce oocyst rovněž pozorována.

4.2.2 Sledování množství IELs v žaludečním epitelu

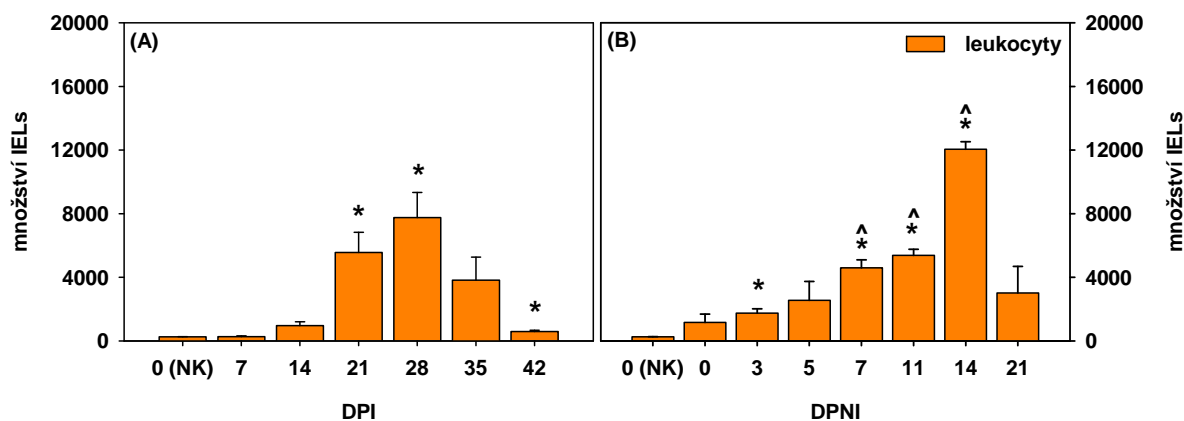
V žaludeční sliznici BALB/c myši byl po infekci *C. andersoni* LI03 pozorován vývoj imunitní odpovědi charakterizovaný zvýšeným množstvím různých typů imunitních buněk.

4.2.2.1 Množství leukocytů

Množství leukocytů: množství leukocytů v místě infekce se během primární infekce *C. andersoni* LI03 významně zvýšilo od 21. DPI oproti NK, kde bylo zjištěno velmi nízké zastoupení leukocytů ($263,5 \pm 9,9$). Maxima bylo dosaženo 28. DPI, kde byla zaznamenána $C_{\max} 8,17 \times 10^3$. 90. DPI (0. DPNI) bylo v žaludečním epitelu přítomno $4,4 \times$ vyšší množství leukocytů oproti NK a po následné infekci *C. muris* TS03 se jejich počet významně zvýšil od 7. DPNI (ve srovnání s 0. DPNI). Množství leukocytů v žaludeční sliznici myši bylo během následné infekce *C. muris* TS03 $1,5 \times$ vyšší ($C_{\max} = 12,05 \times 10^3$) ve srovnání s jejich množstvím během primární infekce *C. andersoni* LI03 a statisticky významný rozdíl mezi průběhem primární infekce a následné infekce byl zjištěn pouze v T_{\max} (14. DPNI, Tabulka 30 a Graf 7).

Tabulka 30. Charakteristika a porovnání množství leukocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* LI03 a následné infekce *C. muris* TS03

infekce	množství leukocytů			porovnávané infekce	množství leukocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{\max} ($\times 10^3$)	T_{\max} (DPI/DPNI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
primární infekce	131,40	8,17	28	primární infekce vs. následná infekce	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$
následná infekce	114,65	12,05	14				



Graf 7. Množství leukocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* LI03 a následné infekce *C. muris* TS03; (A) Množství leukocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši v průběhu primární infekce *C. andersoni* LI03; (B) Množství leukocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši v průběhu následné infekce *C. muris* TS03; **DPI** – dny po primární infekci; **DPNI** – dny po následné infekci; **IELs** – intraepiteliální leukocyty; **NK** – negativní kontrola; ***** – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti NK (0. DPI); **^** – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti 0. DPNI

4.2.2.2 Množství T- a B-lymfocytů

Množství T-lymfocytů: v epitelu žaludku NK bylo pozorováno velmi nízké množství T-lymfocytů ($97,7 \pm 28,5$), významné zvýšení T-lymfocytů bylo zaznamenáno již od 14. DPI během primární infekce imunokompetentních myši *C. andersoni* LI03. Maximálního počtu T-lymfocytů bylo dosaženo 28. DPI ($C_{\max} = 4,99 \times 10^3$), jejich množství se oproti NK zvýšilo $51,1 \times$. Zvýšené množství T-lymfocytů ($3,7 \times$) ve srovnání s NK bylo pozorováno také 90. DPI (0. DPNI). Statisticky významně zvýšené hladiny T-lymfocytů oproti NK byly u myši následně infikovaných *C. muris* TS03 pozorovány 3. a poté od 7. do 14. DPNI. Mezi 7. a 14. DPNI byl rovněž zjištěn významně zvýšený počet T-lymfocytů ve srovnání s 0. DPNI a C_{\max} ($5,27 \times 10^3$) bylo dosaženo již 14. DPNI, což bylo významně dříve oproti primární infekci (Tabulka 31 a Graf 8)

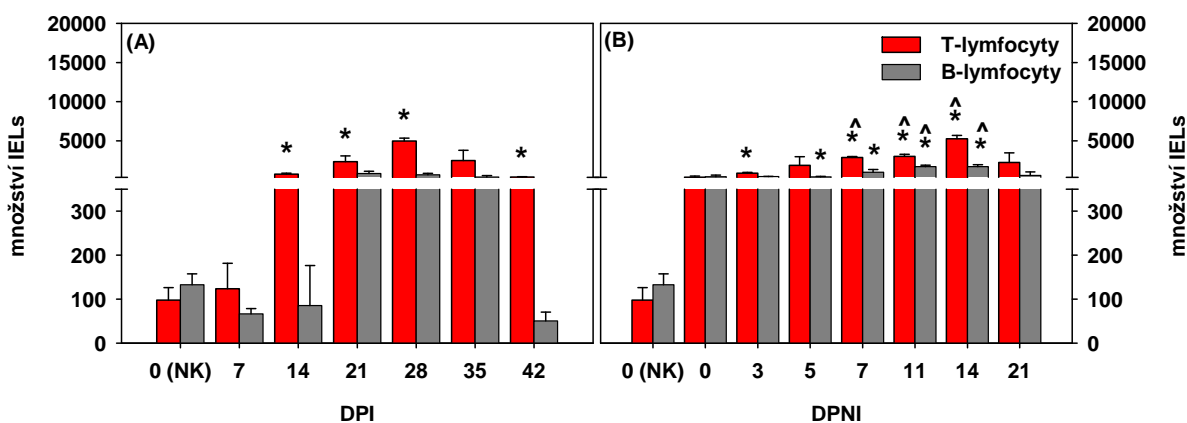
Tabulka 31. Charakteristika a porovnání množství T-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* LI03 a následné infekce *C. muris* TS03

infekce	množství T-lymfocytů			porovnávané infekce	množství T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{\max} ($\times 10^3$)	T_{\max} (DPI/DPNI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
primární infekce	76,67	4,99	28	primární infekce vs. následná infekce	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$
následná infekce	59,3	5,27	14				

Množství B-lymfocytů: množství B-lymfocytů bylo u NK $132,7 \pm 25,0$ a jejich počet se během primární infekce *C. andersoni* LI03 zvýšil pouze 6,2×, kdy C_{max} $0,84 \times 10^3$ bylo dosaženo 21. DPI. Žádný statisticky významný rozdíl v počtu B-lymfocytů oproti NK nebyl během primární infekce zaznamenán. Přesto ale v žaludeční sliznici myši přetrvávala 3,2× vyšší hladina B-lymfocytů až do 90. DPI (0. DPNI). Po následné infekci *C. muris* TS03 byl pozorován významný nárůst množství B-lymfocytů (ve srovnání s 0. DPNI) mezi 7. a 14. DPNI. Počty B-lymfocytů přítomných v místě infekce byly po následné infekci *C. muris* TS03 téměř totožné a jejich hladina během následné infekce byla 2,1× vyšší než u primární infekce *C. andersoni* LI03. Při následné infekci *C. muris* TS03 byla C_{max} ($1,79 \times 10^3$) pozorována 11. DPNI (Tabulka 32 a Graf 8)

Tabulka 32. Charakteristika a porovnání množství B-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* LI03 a následné infekce *C. muris* TS03

infekce	množství B-lymfocytů			porovnávané infekce	množství B-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{max} ($\times 10^3$)	T_{max} (DPI/DPNI)		AUC	C_{max}	T_{max}
primární infekce	14,77	0,84	21	primární infekce vs. následná infekce	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
následná infekce	22,23	1,79	11				



Graf 8. Množství T- a B-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během infekce *C. andersoni* LI03 a následné infekce *C. muris* TS03; **(A)** Množství T- a B-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši v průběhu primární infekce *C. andersoni* LI03; **(B)** Množství T- a B-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši v průběhu následné infekce *C. muris* TS03; **DPI** – dny po primární infekci; **DPNI** – dny po následné infekci; **IELs** – intraepiteliální leukocyty; **NK** – negativní kontrola; ***** – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti NK (0. DPI); **▲** – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti 0. DPNI

4.2.2.3 Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů

Množství CD4+ T-lymfocytů: CD4+ T-lymfocyty se v žaludečním epitelu NK vyskytovaly ve velmi nízkém počtu ($34,6 \pm 2,6$), který se během primární infekce *C. andersoni* LI03 významně zvýšil od 14. DPI a maximální ($105,4\times$) nárůst počtu CD4+ T-lymfocytů byl pozorován 28. DPI ($C_{\max} = 3,65\times 10^3$). Hladina CD4+ T-lymfocytů byla 90. DPI (0. DPNI) $3,8\times$ zvýšená a po následné infekci *C. muris* TS03 bylo pozorováno významné zvýšení počtu CD4+ T-lymfocytů od 5. DPNI oproti 0. DPNI s maximem 14. DPNI ($C_{\max} = 3,25\times 10^3$), což je významně dříve ve srovnání s primární infekcí *C. andersoni* LI03 (Tabulka 33 a Graf 9).

Tabulka 33. Charakteristika a porovnání množství CD4+ T-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* TS03

infekce	množství CD4+ T-lymfocytů			porovnávané infekce	množství CD4+ T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{\max} ($\times 10^3$)	T_{\max} (DPI/DPNI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
primární infekce	52,52	3,65	28	primární infekce vs. následná infekce	$P>0,05$	$P>0,05$	$P<0,05$
následná infekce	33,80	3,25	14				

Množství CD8+ T-lymfocytů: počet CD8+ T-lymfocytů v NK byl rovněž velmi nízký ($9,5 \pm 7,7$), nicméně během primární infekce *C. andersoni* LI03 se jejich počet zvýšil $120,0\times$ 28. DPI ($C_{\max} = 1,14\times 10^3$). Významné zvýšení množství CD8+ T-lymfocytů v epitelu žaludku bylo zjištěno již od 14. DPI. Vyšší množství CD8+ T-lymfocytů ($9,7\times$) bylo zaznamenáno také 90. DPI (0. DPNI). Během následné infekce *C. muris* TS03 se počty T-lymfocytů významně zvýšily již od 3. DPNI (ve srovnání s 0. DPNI) a naměřená C_{\max} ($1,14\times 10^3$) byla $2,1\times$ vyšší oproti C_{\max} v primární infekci. Signifikantní rozdíl mezi primární infekcí *C. andersoni* TS03 a následnou infekcí *C. muris* CB03 byl pozorován pouze v T_{\max} , kdy C_{\max} byla během následné infekce zaznamenána již 14. DPNI (Tabulka 34 a Graf 9).

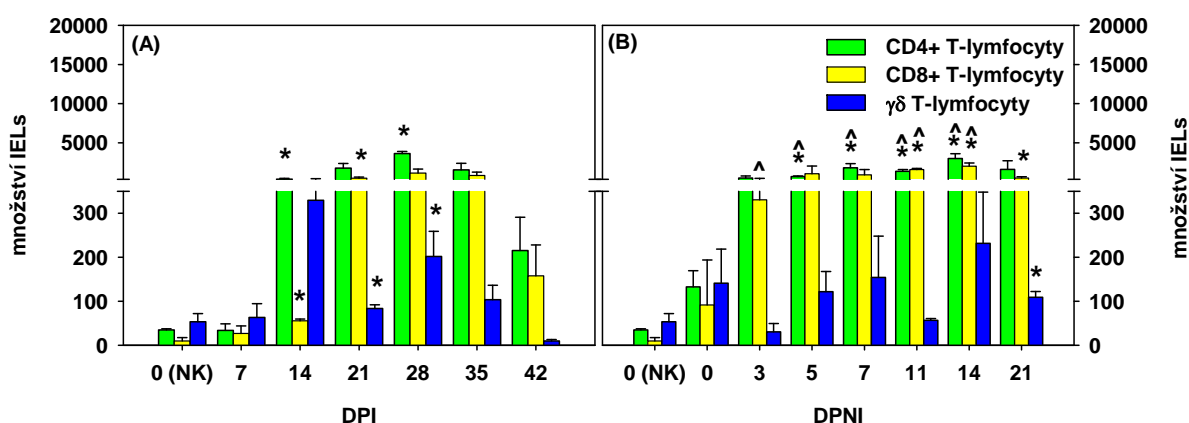
Tabulka 34. Charakteristika a porovnání množství CD8+ T-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* TS03

infekce	množství CD8+ T-lymfocytů			porovnávané infekce	množství CD8+ T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{\max} ($\times 10^3$)	T_{\max} (DPI/DPNI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
primární infekce	18,46	1,14	28	primární infekce vs. následná infekce	$P>0,05$	$P>0,05$	$P<0,05$
následná infekce	23,40	2,36	14				

Množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů: u NK bylo v žaludeční sliznici zaznamenáno $53,6 \pm 18,1$ $\gamma\delta$ T-lymfocytů, které se během primární infekce *C. andersoni* LI03 zvýšilo $6,1 \times$ již 14. DPI ($C_{\max} = 0,33 \times 10^3$) a statisticky významně zvýšené množství bylo zjištěno 21. a 28. DPI (ve srovnání s NK). Po vyléčení myši z infekce byla 90. DPI (0. DPNI) naměřena $2,6 \times$ vyšší hodnota $\gamma\delta$ T-lymfocytů oproti NK a žádné významné zvýšení této subpopulace lymfocytů během následné infekce *C. muris* TS03 nebylo zaznamenáno, nejvyšší koncentrace ($C_{\max} = 0,28 \times 10^3$) byla naměřena 14. DPNI. Množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů se během primární infekce a následné infekce statisticky významně nelišilo (Tabulka 35 a Graf 9).

Tabulka 35. Charakteristika a porovnání množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* TS03

infekce	množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů			porovnávané infekce	množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{\max} ($\times 10^3$)	T_{\max} (DPI/DPNI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
primární infekce	5,69	0,33	14	primární infekce vs. následná infekce	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
následná infekce	2,73	0,28	14				



Graf 9. Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* TS03; (A) Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši v průběhu primární infekce *C. andersoni*; (B) Množství CD4+, CD8+ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši v průběhu následné infekce *C. muris* TS03; DPI – dny po primární infekci; DPNI – dny po následné infekci; IELs – intraepiteliální leukocyty; NK – negativní kontrola; * – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti NK (0. DPI); ▲ – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti 0. DPNI

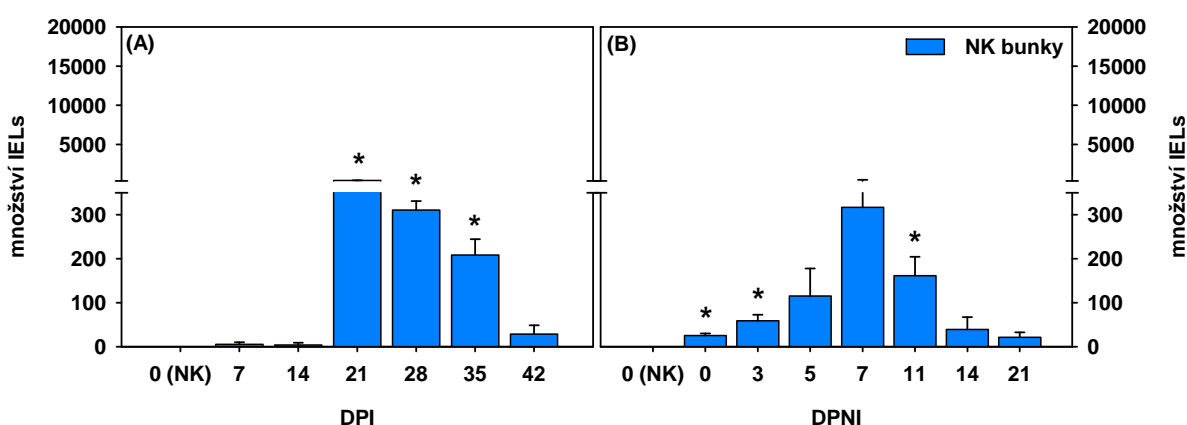
4.2.2.4 Množství NK buněk

Množství NK buněk: ve sliznici žaludku naivních myši (NK) nebyly žádné NK buňky pozorovány, nicméně během primární infekce *C. andersoni* LI03 se jejich množství postupně zvyšovalo, statisticky významně 21.–35. DPI, s $C_{\max} = 0,41 \times 10^3$ 21. DPI.

Signifikantně zvýšené množství (25,4×) bylo v epitelu žaludku pozorováno 90. DPI (0. DPNI). U myši následně infikovaných *C. muris* TS03 byla C_{max} ($0,32 \times 10^3$) zjištěna 7. DPNI, nicméně statisticky zvýšené množství oproti 0. DPNI nebylo během infekce pozorováno. Přesto se ale zvýšení počtu NK buněk statisticky významně lišilo v hodnotě AUC (Tabulka 36 a Graf 10).

Tabulka 36. Charakteristika a porovnání množství NK buněk v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* TS03

infekce	množství NK buněk			porovnávané infekce	množství NK buněk		
	AUC ($\times 10^3$)	C_{max} ($\times 10^3$)	T_{max} (DPI/DPNI)		AUC	C_{max}	T_{max}
primární infekce	6,64	0,41	21	primární infekce vs. následná infekce	$P < 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
následná infekce	2,21	0,32	7				



Graf 10. Množství NK buněk v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* TS03; (A) Množství NK buněk v žaludečním epitelu BALB/c myši v průběhu primární infekce *C. andersoni*; (B) Množství NK buněk v žaludečním epitelu BALB/c myši v průběhu následné infekce *C. muris* TS03; DPI – dny po primární infekci; DPNI – dny po následné infekci; IELs – intraepiteliální leukocyty; NK – negativní kontrola; * – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti NK (0. DPI); ▲ – statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti 0. DPNI

4.2.3 Analýza splenocytů

Ve slezinách NK bylo pozorováno $15,7 \times 10^6$ T-lymfocytů a $22,3 \times 10^6$ B-lymfocytů. V průběhu primární infekce *C. andersoni* LI03 a infekce *C. muris* TS03 se množství obou skupin T-lymfocytů statisticky významně nezměnila. Poměr mezi CD4+ a CD8+ T-lymfocyty u NK byl 1,9:1 ($10,1 \times 10^6$ CD4+ a $5,3 \times 10^6$ CD8+ T-lymfocytů) a v průběhu primární infekce se tento poměr výrazně nezměnil, nicméně během následné infekce *C. muris* TS03 se 5. DPNI změnil na 2,9:1 ve prospěch CD4+ T-lymfocytů. Žádné statisticky významné rozdíly v množství CD4+ a CD8+ T-lymfocytů přesto nebyly zjištěny

během primární infekce či následné infekce. Přítomnost $\gamma\delta$ T-lymfocytů ve slezině byla pozorována ve velmi malém množství (C_{\max} $0,32 \times 10^6$, 14. DPI) po celou dobu primární infekce a následné infekce. NK buňky byly ve slezině rovněž detekovány ($2,3 \times 10^6$ u NK) a jejich množství se během primární infekce *C. andersoni* TS03 statisticky významně nezvýšilo. Množství NK buněk během primární infekce bylo srovnatelné s jejich počty pozorovanými ve slezině během následné infekce *C. muris* TS03.

4.2.4 Detekce cytokinů v *ex vivo* kulturách splenocytů

Detekce IFN γ : v *ex-vivo* kulturách splenocytů byla prokázána přítomnost IFN γ po celou dobu primární infekce *C. andersoni* LI03 a následné infekce *C. muris* TS03. U NK byla pozorována koncentrace IFN γ 0,06 ng/ml, která se v průběhu primární infekce významně zvýšila od 28. DPI, zaznamenaná C_{\max} činila 35. DPI 1,51 ng/ml. Koncentrace IFN γ zůstala zvýšená až do 90. DPI (0,64 ng/ml) a u myši následně infikovaných *C. muris* TS03 se statisticky významně změnila pouze 5. a 11. DPNI (oproti 0. DPNI). Žádný statisticky významný rozdíl mezi průběhem primární infekce a následné infekce nebyl pozorován (Tabulka 37 a Graf 11)

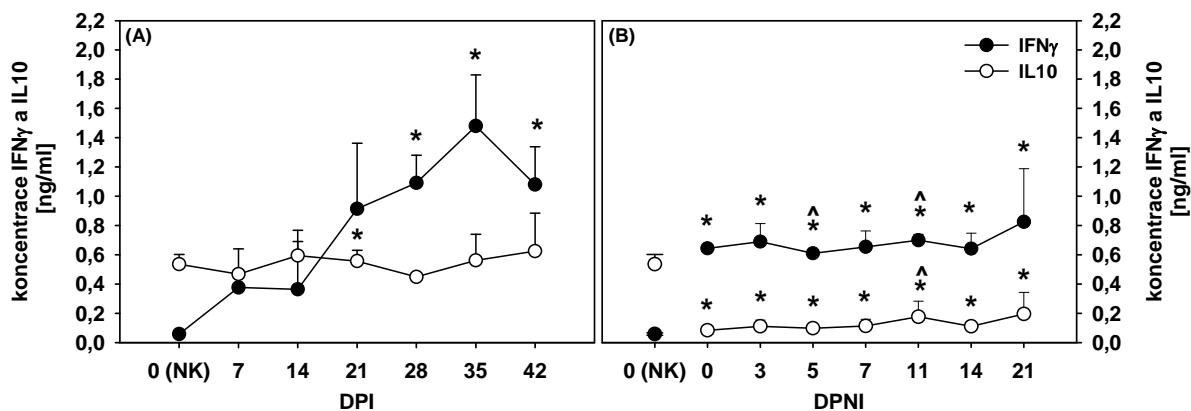
Tabulka 37. Koncentrace IFN γ v *ex vivo* kulturách splenocytů z BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* TS03

infekce	koncentrace IFN γ			porovnávané infekce	koncentrace IFN γ		
	AUC	C_{\max}	T_{\max} (DPI/DPNI)		AUC	C_{\max}	T_{\max}
primární infekce	33,55	1,51	35	primární infekce vs. následná infekce	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
následná infekce	14,42	0,86	21				

Detekce IL-10: v primárních kulturách splenocytů byla prokázána také přítomnost IL-10 v celém průběhu primární infekce *C. andersoni* LI03 a následné infekce *C. muris* TS03. Zaznamenaná koncentrace IL-10 u NK činila 0,56 ng/ml a během primární infekce se oproti NK statisticky významně změnila pouze 21. DPI a maxima bylo dosaženo až 42. DPI ($C_{\max} = 0,95$ ng/ml). Nicméně 90. DPI (0. DPNI) byla koncentrace IL-10 významně nižší oproti NK a během následné infekce *C. muris* TS03 se statisticky významně (ve srovnání s 0. DPNI) zvýšila pouze 11. DPNI. Maximální koncentrace ($C_{\max} = 0,27$ ng/ml, 21. DPNI) byla významně nižší jak oproti NK, tak oproti hodnotě C_{\max} v primární infekci. Koncentrace IL-10 během primární infekce a následné infekce se také významně lišila v hodnotě AUC (Tabulka 38 a Graf 11)

Tabulka 38. Koncentrace IL-10 v *ex vivo* kulturách splenocytů z BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* TS03

infekce	koncentrace IL-10			porovnávané infekce	koncentrace IL-10		
	AUC	C _{max}	T _{max} (DPI/DPNI)		AUC	C _{max}	T _{max}
primární infekce	29,33	0,95	42	primární infekce vs. následná infekce	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> >0,05
následná infekce	2,80	0,27	21				



Graf 11. Koncentrace IFN γ a IL-10 v *ex vivo* kulturách splenocytů z BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* TS03; **(A)** Koncentrace IFN- γ a IL-10 v *ex vivo* kulturách splenocytů z BALB/c myši v průběhu primární infekce *C. andersoni*; **(B)** Koncentrace IFN- γ a IL-10 v *ex vivo* kulturách splenocytů z BALB/c myši v průběhu následné infekce *C. muris* TS03; **DPI** – dny po primární infekci; **DPNI** – dny po následné infekci; **NK** – negativní kontrola; ***** – statisticky významný rozdíl (*P*<0,05) oproti NK (0. DPI); **^** – statisticky významný rozdíl (*P*<0,05) oproti 0. DPNI

5. DISKUZE

5.1 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE A REINFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH A IMUNODEFICIENTNÍCH C57BL/6 MYŠÍ *CRYPTOSPORIDIUM MURIS* TS03

Cryptosporidium muris je jedním ze dvou druhů savčích kryptosporidií osidlujících žláznatou část žaludku (Tyzzer 1907, Lindsay a kol. 2000) a společně se střevním druhem *C. parvum* je tento druh nejčastěji používán k experimentálním studiím imunitní odpovědi hostitele na kryptosporidiové infekce. Navzdory jeho výhradní lokalizaci v žaludečním epitelu byla však imunitní odpověď studována nejčastěji systémově pomocí adoptivních přenosů imunity či studií využívajících deplece subpopulací lymfocytů (McDonald a kol. 1992, 1994, Kváč a kol. 2011), nicméně procesy odehrávající se přímo v místě infekce *C. muris* byly poprvé nastíněny až v naší předchozí studii (Jalovecká a kol. 2010), na kterou tato práce navazuje.

Sledováním průběhu infekce *C. muris* TS03 u imunokompetentních C57BL/6 myší byla prokázána jejich schopnost zvládnutí infekce a eliminace parazita během 29–37 DPI. Navíc v souladu s předchozími studiemi bylo prokázáno navození přirozené rezistence stejným druhem parazita (McDonald a kol. 1992, Abrahamsen a kol. 1997, Miller a Schaefer 2007, Kváč a kol. 2009, Jalovecká a kol. 2010). Porovnání zjištěného průběhu a intenzity infekce u C57BL/6 myší neprokázalo významný rozdíl oproti průběhu žaludeční kryptosporidiózy u BALB/c myší (McDonald a kol. 1992, Jalovecká a kol. 2010).

U sledovaných imunokompetentních C57BL/6 i imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší byl během primární infekce prokázán vývoj účinné imunitní odpovědi charakterizované zvýšeným množstvím různých subpopulací leukocytů v žaludečním epitelu, které je pravděpodobně způsobeno migrací těchto buněk do epitelu žaludku a/nebo dochází k proliferaci těchto buněk v místě infekce.

Za hlavní účinný mechanismus kontroly střevní kryptosporidiózy je považována buněčná imunitní odpověď (Heine a kol. 1984, Ungar a kol. 1990, 1991, Riggs 2002) a T-lymfocytům je přisuzovaná efektivní role i v případě infekce žaludečními kryptosporidiiemi, konkrétně *C. muris* (McDonald a kol. 1992, 1994, Tilley a kol. 1995). K analogickým závěrům o úloze buněčné imunity reprezentované T-lymfocyty při kontrole kryptosporidiových infekcí vede i tato práce, kde byl pozorován významný nárůst množství T-lymfocytů v žaludečním epitelu u všech sledovaných imunokompetentních a imunodeficientních skupin myší. Zejména u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myší bylo zvýšení počtu T-lymfocytů velmi vysoké a maximální zaznamenané množství těchto buněk se u takto imunodeficientních myší signifikantně lišilo ve srovnání s hodnotami C_{max}

zjištěnými u imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myši, což vede k závěru o významné úloze CD4⁺ T-lymfocytů (viz níže). Po vyléčení imunokompetentních C57BL/6 myši z infekce *C. muris* TS03 byly zaznamenány dlouhodobě signifikantně zvýšené počty (ve srovnání s naivními myši) T-lymfocytů v žaludeční sliznici, což společně s jejich významným a rychlým zmnožením v epitelu žaludku během reinfekce vede k hypotéze o jejich možné paměťové funkci zodpovědné za ochranu hostitele při reinfekci. Tuto domněnku dále podporuje zjištění významně nižších množství T-lymfocytů během reinfekce ve srovnání s jejich počty zjištěnými při primární infekci, které pravděpodobně souvisí se vznikem velmi rychlé a specifické odpovědi přítomnými paměťovými buňkami. Vznik paměťových T-lymfocytů a jejich ochranná úloha byla dosud naznačena pouze v případě střevní kryptosporidiózy (Lukin a kol. 2000, Gomez Morales a kol. 2004).

Naprostá většina studií zabývajících se imunitní odpovědí proti kryptosporidióze se přiklání k názoru, že CD4⁺ subpopulace T-lymfocytů je zcela nezbytná při kontrole kryptosporidiových infekcí (Ungar a kol. 1991, McDonald a kol. 1992, Chen a kol. 1993, Aguirre a kol. 1994, McDonald a kol. 1994, Schmidt a kol. 2001). Naše experimenty účast CD4⁺ T-lymfocytů v imunitní odpovědi také potvrdily, a to na základě jejich významné migrace (popř. proliferace) do žaludečního epitelu imunokompetentních C57BL/6 i imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myši. Navíc z jejich vysokého zastoupení v místě infekce u myši s deficitem CD8⁺ T-lymfocytů plyne efektivní podíl CD4⁺ T-lymfocytů v imunitní kontrole infekce *C. muris*, kterou dokázaly i takto imunodeficientní myši zvládnout během 56–72 DPI.

Nicméně řada zejména recentních prací nepostradatelnou roli CD4⁺ T-lymfocytů v imunitní kontrole kryptosporidiózy zpochybnila (Leav a kol. 2005, Jalovecká a kol. 2010, Kváč a kol. 2011, Korbel a kol. 2011) a nezastupitelná úloha CD4⁺ T-lymfocytů v imunitní kontrole kryptosporidiózy byla vyloučena také našimi experimenty. Ačkoliv byla účast CD4⁺ T-lymfocytů v imunitní odpovědi na kryptosporidiózu prokázána (viz výše), myši s deficitem CD4⁺ T-lymfocytů dokázaly infekci *C. muris* zvládnout a zcela se z ní vyléčit. Nicméně u takto imunodeficientních myši byla patentní perioda ve srovnání s imunokompetentními C57BL/6 myši signifikantně prodloužena a intenzita infekce dosáhla velmi vysokých hodnot OPG. Tyto poznatky, společně s velmi vysokým zastoupením CD8⁺ T-lymfocytů v žaludečním epitelu imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši, vedou k závěru, že pravděpodobnou účinnou složkou imunitní odpovědi vedoucí k vyléčení imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši jsou právě CD8⁺ T-lymfocyty,

na kterých je založena možná alternativní cesta nezávislá na CD4⁺ T-lymfocytech. Také ze zaznamenané signifikantně prodloužené patentní periody C57BL/6 CD8^{-/-} myši oproti imunokompetentním C57BL/6 myším je evidentní účast CD8⁺ T-lymfocytů v imunitní odpovědi. Významné zvýšení množství CD8⁺ T-lymfocytů v místě infekce bylo pozorováno u imunokompetentních C57BL/6 myši, u kterých dokonce tyto buňky zůstávaly v epitelu žaludku i po vyléčení z infekce *C. muris* TS03 a následně byly detekovány jejich významně zvýšené počty i během reinfekce. Účast CD8⁺ T-lymfocytů v imunitní kontrole kryptosporidiózy je podpořena studiemi, kde bylo zaznamenáno zvýšené množství CD8⁺ T-lymfocytů v místě infekce střevními i žaludečnými kryptosporidiiemi (Abrahamsen a kol. 1997, Leav a kol. 2005, Jalovecká a kol. 2010). Rovněž podání specifických protilátek proti CD8⁺ T-lymfocytům vedlo ke zvýšení intenzity infekce *C. muris* oproti kontrolním myším, kterým protilátka podána nebyla (McDonald a kol. 1994). Také studiemi, ve kterých byly využity rekonstituce imunity SCID myši různými populacemi T-lymfocytů, bylo dosaženo obdobných závěrů (Kvác a kol. 2011).

Účast dalších imunitních buněk a možnou kooperaci CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů podporuje též fakt, že chronické infekce střevními či žaludečnými kryptosporidiiemi se vyskytují převážně u těžce imunosuprimovaných hostitelů, kterými jsou v experimentálních studiích SCID myši, tedy hostitelé postrádající nejenom CD4⁺ T-lymfocyty, ale rovněž CD8⁺ či $\gamma\delta$ T-lymfocyty a rovněž B-lymfocyty (Murphy a kol. 2008). Také u lidí se chronická kryptosporidióza vyskytuje ve spojení s různými imunosupresemi, nejčastěji s HIV infekcí. Virus HIV způsobuje poruchu celého imunitního systému včetně narušení sekrece cytokinů, kde vedle nejčastěji zmiňovaných poškození CD4⁺ T-lymfocytů jsou ovlivněny i další subpopulace T-lymfocytů, B-lymfocyty či imunitní buňky účastníci se hlavně přirozené imunitní odpovědi (Taylor a kol. 1995, Clerici a kol. 2000, Roos a kol. 2000, Moir a Fauci 2008, Collini a kol. 2010).

Nicméně způsob, jakým CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty a případně další leukocyty kontrolují kryptosporidiovou infekci není dosud zcela jasný. Jako nejdůležitější funkce CD4⁺ T-lymfocytů při kontrole kryptosporidiózy je uváděna produkce IFN γ (McDonald a kol. 1992, Culshaw a kol. 1997), stejně tak již bylo ověřeno produkce IFN γ CD8⁺ T-lymfocyty v místě infekce střevní kryptosporidiózy (Leav a kol. 2005). Přítomnost IFN γ v žaludečním epitelu myši infikovaných *C. muris* byla však poprvé potvrzena až v této práci. Nejvyšší zaznamenané zvýšení exprese genu pro IFN γ během žaludeční kryptosporidiózy bylo pozorováno v žaludeční sliznici imunokompetentních C57BL/6 myši 28. DPI. U obou skupin imunodeficientních myši však byla exprese genu pro IFN γ 28. DPI zvýšena mnohem

méně ve srovnání s imunokompetentními myši. Překvapivě však bylo zvýšení mRNA pro IFN γ 28. DPI velmi podobné u imunodeficientních C57BL/6 CD4 $^{-/-}$ a C57BL/6 CD8 $^{-/-}$ myši. Tyto výsledky naznačují významnou úlohu IFN γ při kontrole kryptosporidiózy, což je v souladu s řadou studií (Hayward a kol. 2000, Tessema a kol. 2009a, b). Nicméně z našich výsledků je velmi dobře patrný také význam současné přítomnosti a kooperace CD4+ a CD8+ T-lymfocytů v produkci IFN γ při kontrole kryptosporidiózy.

Vedle produkce cytokinů je další možnou funkcí CD4+ a CD8+ T-lymfocytů jejich cytotoxické působení na buňky poškozené infekcí. CD4+ T-lymfocyty jsou schopny vyvolat buněčnou smrt cílové buňky vazbou přes Fas receptory, zatímco CD8+ T-lymfocyty indukují apoptotózu systémem perforin-granzymy, popř. cytotoxicky působí také přes Fas receptory (Murphy a kol. 2008). Cytotoxická funkce CD8+ T-lymfocytů v této práci byla studována pomocí infekce imunodeficientních C57BL/6 Pfr1 $^{-/-}$ myši. U takto deficientních myši, které nejsou schopny produkovat perforin, byly v prvních dnech patentní periody pozorovány signifikantně vyšší hodnoty OPG než u imunokompetentních C57BL/6 myši, které však byly srovnatelné s množstvím vylučovaných oocyst u imunodeficientních C57BL/6 CD8 $^{-/-}$ myši. Tento poznatek naznačuje možné cytotoxické působení CD8+ T-lymfocytů v počátečních stádiích infekce. Nicméně u C57BL/6 Pfr1 $^{-/-}$ myši byla zaznamenaná délka patetní periody téměř totožná jako u imunokompetentních C57BL/6 myši a zároveň signifikantně kratší než u imunodeficientních C57BL/6 CD8 $^{-/-}$ myši. Je tedy zcela zřejmé, že cytotoxický systém vázaný na perforin-granzymy z CD8+ T-lymfocytů nehraje při imunitní odpovědi na infekci *C. muris* TS03 zásadní úlohu.

Funkce $\gamma\delta$ T-lymfocytů dosud není zcela objasněná, předpokládá se jejich úloha ve zprostředkování přirozené a adaptivní imunity, prezentace a rozpoznání antigenu či regulace zánětlivé odpovědi (Born a kol. 2006). Účast $\gamma\delta$ T-lymfocytů v imunitní odpovědi na střevní či žaludeční kryptosporidiózu již byla popsána (Eichelberger a kol. 2000, Jalovecká a kol. 2010). V této práci bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení množství těchto buněk v epitelu žaludku u všech sledovaných imunokompetentních i imunodeficientních myši během primární infekce *C. muris* TS03, což naznačuje jejich účast v imunitní odpovědi na kryptosporidiózu, přestože jejich zastoupení bylo ve srovnání s oběmi subpopulacemi $\alpha\beta$ T-lymfocytů velmi nízké a po vyléčení nebylo u imunokompetentních C57BL/6 myši detekováno signifikantně zvýšené množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu, stejně jako během následné reinfekce. Na základě těchto výsledků můžeme předpokládat účast $\gamma\delta$ T-lymfocytů v imunitní odpovědi při kryptosporidióze. Tyto výsledky korespondují se studiemi, které rovněž prokázaly

zvýšené množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů v místě infekce střevními či žaludečními kryptosporidiiemi (Eichelberger a kol. 2000, Jalovecká a kol. 2010), a také s výsledky experimentu s myši deficientními pro TCR $\gamma\delta$ (Waters a Harp 1996).

U všech sledovaných imunokompetentních i imunodeficientních myši byl v žaludečním epitelu pozorován nárůst v množství B-lymfocytů, nicméně v mnohem menší míře ve srovnání s T-lymfocyty. Zásadní ochranná role B-lymfocytů při kryptosporidiióze byla na základě řady studií využívajících deplece subpopulací lymfocytů vyloučena (McDonald a kol. 1992, Taghi-Kilani a kol. 1990). Produkce specifických protilátek proti kryptosporidiiám byla však při tomto onemocnění pozorována (Ungar a kol. 1986, Hill a kol. 1990, Peeters a kol. 1992, Dann a kol. 2000, Guk a kol. 2003). Přestože většina těchto prací sledovala výskyt protilátek pouze v séru či v trusu hostitelů, v místě infekce střevním druhem *C. parvum* byla produkce protilátek také potvrzena a zejména IgA je přisuzován důležitý protektivní efekt během primární infekce (Guk a kol. 2003). Produkce protilátek v žaludku však dosud nebyla ověřena a právě významný nárůst počtu B-lymfocytů v žaludečním epitelu během primární infekce i reinfekce poukazuje na možnost produkce protilátek v místě infekce. Zvýšené množství B-lymfocytů v místě infekce by však také mohlo být spojeno s prezentací antigenu T-lymfocytům (Murphy a kol. 2008). Rovněž skutečnost, že množství B-lymfocytů v žaludečním epitelu bylo vyšší u C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši ve srovnání s imunokompetentními C57BL/6 myši, naznačuje jejich možnou roli, např. produkcí cytokinů, v aktivaci neúplného imunitního systému u imunodeficientních myši v odpovědi na kryptosporidiiózu. Protože B-lymfocyty zůstaly v žaludečním epitelu hostitele ve zvýšeném množství (ve srovnání s naivními myši) i po vyléčení imunokompetentních C57BL/6 myši z infekce, je pravděpodobný vznik paměťových B-lymfocytů po prodělání primární infekce kryptosporidiiemi a jejich následný protektivní efekt při reinfekci. To je v souladu i s jejich velmi významně rychlejším namnožením během reinfekce, kde však maximální počty B-lymfocytů byly oproti primární infekci zvýšené, ačkoliv jejich množství bylo ve srovnání s T-lymfocyty nižší i během reinfekce. Tato možná úloha B-lymfocytů v protektivní imunitní odpovědi na kryptosporidiiózu nebyla dosud navržena.

Na základě řady *in vivo* a *in vitro* studií se NK buňkám přisuzuje podstatná funkce při kontrole kryptosporidiiózy (Enriquez a Sterling 1991, Dann a kol. 2005, Barakat a kol. 2009), ať už jejich cytotoxickou funkcí či schopností produkovat při kontrole kryptosporidiiózy velmi důležitý IFN γ . Naše experimenty prokázaly významné zvýšení množství NK buněk v žaludečním epitelu během infekce *C. muris* TS03

u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} i C57BL/6 CD8^{-/-} myší, nicméně po celou dobu sledování byly počty NK buněk velmi nízké. Z takto nízkého zastoupení NK buněk společně se skutečností, že u imunokompetentních C57BL/6 myší nebyl nárůst množství těchto buněk během primární infekce vůbec zaznamenán, vyplývá, že NK buňky s velkou pravděpodobností nemají zásadní funkci při imunitní odpovědi a kontrole kryptosporidiózy. K obdobným závěrům došla i řada dalších studií, zejména experimenty využívající specifické protilátky proti NK buňkám, kde tato deplece neměla na průběh kryptosporidiózy žádný vliv (Ungar a kol. 1991, Rohlman a kol. 1993, McDonald a Bancroft 1994, McDonald a kol. 2000).

Ačkoliv bylo prokázáno zvýšené množství granulocytů, konkrétně neutrofilů a eosinofilů, v místě infekce během střevní kryptosporidiózy myší (Svezhova 1997) a jejich účast v imunitní kontrole kryptosporidiózy byla naznačena také v nedávné studii (Takeuchi a kol. 2008), naše experimenty neprokázaly přítomnost granulocytů v žaludečním epitelu u žádné sledované skupiny imunokompetentních a imunodeficientních myší v celém průběhu primární infekce i následné reinfekce. Tyto výsledky tedy účast granulocytů v efektivní imunitní odpovědi na *C. muris* TS03 nepodporují, což je v souladu s výsledky experimentu založeném na podání specifických protilátek proti neutrofilům myším prodávajícím střevní kryptosporidiózu (Zadrozny a kol. 2006).

Účast monocytů a makrofágů v imunitní odpovědi během kryptosporidiové infekce již byla potvrzena např. masivním nárůstem množství makrofágů v střevním epitelu myší s infekcí *C. parvum* (Svezhova 1997) či studií využívající depleci subpopulací lymfocytů (Takeuchi a kol. 2008). Také během žaludeční kryptosporidiózy myší bylo pozorováno zvýšení množství periferních monocytů/makrofágů (Miller a Schaefer 2007). V této práci byly zaznamenány velmi nízké počty těchto buněk během primární infekce a rovněž i reinfekce *C. muris* TS03 u imunokompetentních C57BL/6 myší. Početnost monocytů/makrofágů v epitelu žaludku imunodeficientních C57BL/6 CD8^{-/-} myší byla srovnatelná s jejich zastoupením v místě infekce u C57BL/6 myší, zatímco u C57BL/6 CD4^{-/-} myší bylo množství monocytů/makrofágů signifikantně zvýšené narozdíl od ostatních sledovaných skupin myší. Zde bylo pozorováno značné zvýšení množství monocytů/makrofágů v místě infekce a u imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myší byly monocyty/makrofágy dokonce druhou nejvíce početně zastoupenou subpopulací leukocytů po CD8⁺ T-lymfocytech. Na základě tohoto výsledku je tedy možné usoudit, že za vyléčením imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myší z infekce *C. muris* TS03 je zodpovědná alternativní cesta nezávislá na CD4⁺ T-lymfocytech, která je založena

na kooperaci CD8⁺ T-lymfocytů a monocytů/makrofágů. Jaká je přesná funkce těchto dvou subpopulací leukocytů v případě studované infekce je třeba ověřit. Nicméně nabízí se vysvětlení možného působení založeném na základě aktivační úlohy monocytů/makrofágů a jejich schopnosti produkovat cytokiny či prezentovat antigen (Murphy a kol. 2008), což by poté mohlo vést k aktivaci a proliferaci právě CD8⁺ T-lymfocytů a následnému vyléčení imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} myši z infekce *C. muris*. Rovněž je možné vlastní cytotoxické působení monocytů/makrofágů na kryptosporidii infikované buňky tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů (Murphy a kol. 2008).

5.2 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH BALB/c MYŠÍ *CRYPTOSPORIDIUM ANDERSONI* LI03 A NÁSLEDNÁ INFEKCE *C. MURIS* TS03

Cryptosporidium andersoni je druhým známým druhem parazitujícím v žaludečních žlázách savců, který se od *C. muris* liší mimo jiné svou hostitelskou specifitou (Lindsay a kol. 2000). Obecně je *C. andersoni* považován za druh pro myši neinfekční s jedinou výjimkou, kterou je izolát *C. andersoni* Kawatabi (Matsubayashi a kol. 2004, 2005). Tento izolát byl jako jediný úspěšně použit k infekci laboratorních SCID myši; prepatentní perioda zde trvala 14 dní a u experimentálních myši se rozvinula celoživotní chronická infekce (Satoh a kol. 2003). Experimentální infekce laboratorních hlodavců potvrdily neinfektivitu bovinních izolátů *C. andersoni*, konkrétně izolátu LI03 používaného v této práci, pro myši *Mus musculus* (Kváč a kol. 2007).

Přestože nebyla u infikovaných imunokompetentních BALB/c myši potvrzena přítomnost oocyst v trusu po celou dobu předpokládané prepatentní periody a dále ani po dobu 42 DPI, v epitelu žaludku infikovaných BALB/c myši byl pozorován vývoj imunitní odpovědi pravděpodobně na raná vývojová stádia *C. andersoni*. Následkem této primární imunitní odpovědi bylo navození rezistence k následné infekci *C. muris*, druhem běžně pro BALB/c myši infekčním (Tyzzer 1907, McDonald a kol. 1992, 1994, 1996, Tilley a kol. 1995, Jalovecká a kol. 2010, Kváč a kol. 2011). Tento poznatek, že infekce nevnímavého hostitele je schopna vyvolat rezistenci k následné infekci pro téhož hostitele infekčním druhem, dosud nebyl u kryptosporidií pozorován. Nicméně vznik zkřížené protektivní imunity proti *C. andersoni* a *C. muris* byl dříve popsán u pískomilů, kteří jsou však vnímaví k oběma druhům žaludečních kryptosporidií savců (Kváč a kol. 2009). Také ve studii, kde byla DNA vakcína založená na proteinech stěn oocyst *C. andersoni* aplikovaná imunokompetentním myším, bylo prokázáno navození protektivní ochrany. Takto imunizované myši byly po 8 týdnech po imunizaci méně vnímavé k infekci *C. parvum*, což

se projevilo pouze nižší intenzitou infekce, bez vlivu na délku prepatentní či patentní periody (Zheng a kol. 2011). Aplikovaná vakcína nedokázala vyvolat plnou rezistenci ke kryptosporidiové infekci, podobně jako u pískomilů imunizovaných žaludečnými kryptosporidii, u nichž nebyl pozorován vznik zkřížené rezistence mezi střevními a žaludečnými druhy kryptosporidií (Kváč a kol. 2009).

Vzhledem k rezistenci laboratorních myší k *C. andersoni* nebyly dosud provedeny žádné studie imunitní odpovědi na infekci tímto druhem, pouze u skotu bylo histologicky potvrzeno zvýšené množství zánětlivých buněk ve slezu skotu infikovaného *C. andersoni* (Masuno a kol. 2006). Naše experimenty potvrdily vývoj imunitní odpovědi v žaludečním epitelu BALB/c myší po infekci *C. andersoni*, jež byla charakterizovaná nárůstem různých subpopulací leukocytů obdobně jako v případě infekce druhem *C. muris* (Jalovecká a kol. 2010).

Aktivace a vývoj imunitní odpovědi v nevnímavém hostiteli je s velkou pravděpodobností způsoben proběhnutím části vývojového cyklu *C. andersoni* v epitelu žaludku, který není dokončen buď z důvodů hostitelské specifity parazita a nevhodnými podmínkami na straně hostitele či právě imunitní odpovědí rezistentního hostitele, případně kombinací obou faktorů. Nicméně tyto možnosti je třeba ještě experimentálně ověřit.

Z analyzovaných subpopulací leukocytů byly v žaludečním epitelu BALB/c myší po infekci *C. andersoni* nejvíce zastoupeny T- a B-lymfocyty, jejichž množství zůstala v žaludečním epitelu dlouhodobě zvýšená ve srovnání s naivními myši. Shodně jako v případě reinfekce *C. muris* po předchozí infekci totožným druhem, také v tomto případě byla pozorovaná velmi časná imunitní odpověď na následnou infekci *C. muris* TS03 (Jalovecká a kol. 2010). Velmi rychlé zvýšení množství T- a B-lymfocytů během následné infekce naznačuje možný vznik paměťových buněk z obou skupin lymfocytů. Pokud tedy skutečně paměťové T- a B-lymfocyty vznikají, pak zřejmě zejména tyto subpopulace leukocytů hrají významnou roli ve vzniku protektivní imunity a rezistence k následné infekci *C. muris*. Za pozornost stojí, že množství T- a B-lymfocytů bylo během následné infekce mírně zvýšené oproti primární infekci *C. andersoni* LI03. Naopak v případě reinfekce následující po vyléčení myší z primární infekce *C. muris* byla množství T-lymfocytů v žaludečním epitelu zastoupena méně než při předchozí primární infekci (Jalovecká a kol. 2010).

Ze subpopulací T-lymfocytů byly v průběhu primární infekce *C. andersoni* LI03 v žaludečním epitelu nejvíce zastoupeny CD4+ T-lymfocyty. Jejich signifikantně rychlejší nárůst v žaludečním epitelu byl pozorován po následné infekci *C. muris*, kde zastoupení

CD4⁺ T-lymfocytů dosahovalo obdobných hodnot jako u primární infekce. Také významně rychlejší zvýšení zastoupení CD8⁺ T-lymfocytů v žaludečním epitelu zaznamenané při následné infekci BALB/c myši, kde jejich počty dosáhly dvakrát vyššího množství než během primární infekce *C. andersoni*, ukazuje na nárůst množství CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů po inokulaci/infekci *C. andersoni* nevnímavému hostiteli. Ačkoliv je tato imunitní odpověď hostitele svým průběhem velmi podobná imunitní odpovědi proti *C. muris* (Jalovecká a kol. 2010), liší se zastoupením buněk v místě infekce, jenž je během primární infekce *C. andersoni* LI03 několikanásobně nižší. Nicméně i toto množství stačí k vyvolání rezistence k následné infekci *C. muris*. Navíc počet CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů při následné infekci byl srovnatelný s počty zjištěnými během reinfekce myši po prodělání primární infekce *C. muris* (Jalovecká a kol. 2010). Na základě těchto údajů lze předpokládat účast CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů v protektivní imunitní odpovědi zodpovědné za vznik rezistence, ačkoliv dosud není znám přesný mechanismus jejich působení na infikované buňky. Pravděpodobně se tak děje sekrecí cytokinů, zejména IFN γ , jehož význam v kontrole kryptosporidiózy byl již dříve objasněn (McDonald a kol. 1992, Culshaw a kol. 1997, Hayward a kol. 2000, Leav a kol. 2005, Tessema a kol. 2009a, b). Možné je však také zkřížené rozpoznání identických peptidů, které jsou prezentovány MHC molekulami T-lymfocytům.

Také naše experimenty vedou k úvaze o významu T_{H1} cytokinů, zejména IFN γ , v imunitní odpovědi vůči kryptosporidióze a ve vzniku rezistence k následné infekci. Byla prokázána produkce IFN γ v *ex vivo* kulturách splenocytů a výrazný nárůst jeho koncentrace zejména během primární infekce *C. andersoni*, zatímco během následné infekce *C. muris* byla zaznamenána nižší produkce IFN γ . Naproti tomu opačný trend byl pozorován u BALB/c myši primárně infikovaných i reinfikovaných *C. muris*, kde byla vyšší produkce IFN γ zaznamenána při reinfekci (Jalovecká a kol. 2010). Navíc u těchto myši nebyla detekována přítomnost IL-10 během primární infekce ani reinfekce *C. muris* (Jalovecká a kol. 2010), což kontrastuje s jeho zjištěnou produkcí v *ex vivo* kulturách splenocytů u BALB/c myši primárně infikovaných *C. andersoni* a následně infikovaných *C. muris*. Právě produkce T_{H2} cytokinů, mezi něž IL-10 patří (Murphy a kol. 2008) může souviset s nižším zastoupením T-lymfocytů a jejich subpopulací v žaludečním epitelu myši infikovaných *C. andersoni* ve srovnání s jejich množstvím ve sliznici žaludku totožného kmene myši s infekcí *C. muris* (Jalovecká a kol. 2010). Protože však produkce IL-10 byla ve srovnání se zjištěnou koncentrací IFN γ nižší, vede tento poznatek společně s významným nárůstem množství T-lymfocytů v místě infekce k závěru o aktivaci T_{H1} buněčné odpovědi,

což je v souladu s řadou předchozích studií (Ungar a kol. 1991, McDonald a kol. 1992, 1994, 1996, Davami a kol. 1997, Gomez Morales a kol. 2004). Navíc byla našimi experimenty navržena úloha $\text{IFN}\gamma$ v protektivní imunitní odpovědi vedoucí k rezistenci vůči následné infekci, což odpovídá obecně známé velmi důležité roli $\text{IFN}\gamma$ při kontrole střevní (Mead a You 1998, Hayward a kol. 2000, Leav a kol. 2005, Tessema a kol. 2009a, b) a žaludeční kryptosporidiózy (McDonald a kol. 1992, Culshaw a kol. 1997).

Účast $\gamma\delta$ T-lymfocytů v imunitní odpovědi na kryptosporidózu byla potvrzena řadou experimentů, ve kterých byla také naznačena jejich úloha v eliminaci kryptosporidiové infekce (Eichelberger a kol. 2000, Jalovecká a kol. 2010). Na základě detekce signifikantně zvýšeného množství $\gamma\delta$ T-lymfocytů v žaludečním epitelu BALB/c myši během primární infekce *C. andersoni* a následné infekce *C. muris* naznačují výsledky této práce analogické závěry.

Ačkoliv bylo pozorováno velmi nízké zastoupení NK buněk v žaludečním epitelu BALB/c myši jak v průběhu primární infekce *C. andersoni*, tak i následné infekce *C. muris*, signifikantní nárůst množství NK buněk zejména během primární infekce *C. andersoni* naznačuje jejich možnou účast ve vývoji imunitní odpovědi na kryptosporidiovou infekci. Obdobných závěrů bylo dosaženo např. experimenty s myšmi s nedostatečnou cytotoxickou aktivitou NK buněk, u nichž byl zaznamenán těžší průběh střevní kryptosporidiózy (Enriquez a Sterling 1991) či porovnáváním intenzity infekce *C. parvum* u myši s deficitem pouze T- a B-lymfocytů a myši, kterým navíc chyběly i NK buňky (Mead a kol. 1991, Barakat a kol. 2009). Přesto řada studií využívajících zejména protilátky cílené na NK buňky významnou úlohu NK buněk v imunitní kontrole kryptosporidiózy zpochybňuje (Ungar a kol. 1991, Rohlman a kol. 1993, McDonald a Bancroft 1994, McDonald a kol. 2000).

6. ZÁVĚRY

6.1 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE A REINFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH A IMUNODEFICIENTNÍCH C57BL/6 MYŠÍ *CRYPTOSPORIDIUM MURIS* TS03

- Bylo prokázáno vyléčení imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-}, C57BL/6 CD8^{-/-} a C57BL/6 Pfr1^{-/-} myši z kryptosporidiové infekce po vývoji imunitní odpovědi charakterizované nárůstem množství různých subpopulací leukocytů v místě infekce *C. muris*.
- U imunokompetentních C57BL/6 myši byl prokázán vznik rezistence k následné reinfekci totožným druhem kryptosporidie.
- Na základě analýz subpopulací leukocytů v žaludeční sliznici u všech skupin myši byl díky nejvyššímu zastoupení T-lymfocytů pozorován zřejmý vývoj buněčné imunitní odpovědi.
- Zvýšené počty T-lymfocytů v žaludeční sliznici imunokompetentních C57BL/6 myši přetrvávají i po vyléčení z infekce.
- Po reinfekci dochází k významně rychlejšímu nárůstu množství leukocytů v epitelu žaludku.
- Vysoké zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ subpopulací T-lymfocytů v místě infekce imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši naznačuje účast CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů v imunitní kontrole infekce *C. muris*.
- Na základě zjištěných prodloužených patentních period imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myši byla prokázána účast CD4⁺ a rovněž CD8⁺ T-lymfocytů v imunitní odpovědi na infekci *C. muris*.
- Bylo prokázáno, že během primární infekce *C. muris* dochází ke zvýšení produkce mRNA pro IFN γ v místě infekce.
- Detekovaná množství mRNA pro IFN γ v žaludečním epitelu imunokompetentních C57BL/6 a imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} naznačují, že je zde IFN γ produkován právě CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty a vzájemná přítomnost těchto buněk jeho produkci zesiluje.
- Schopnost C57BL/6 CD4^{-/-} myši zvládnout infekci *C. muris* vede k předpokladu o vzniku alternativní imunitní odpovědi nezávislé na CD4⁺ T-lymfocytech.
- Vysoké zastoupení CD8⁺ T-lymfocytů a monocytů/makrofágů v místě infekce naznačuje jejich účast v imunitní odpovědi vedoucí ke kontrole *C. muris* infekce u myši s deficitem CD4⁺ T-lymfocytů.

- Cytotoxická úloha CD8⁺ T-lymfocytů přes systém perforin-granzymy vedoucí k imunitní kontrole kryptosporidiózy byla vyloučena experimenty na imunodeficientních C57BL/6 Pfr1^{-/-} myších.
- Bylo pozorováno zvýšení zastoupení B-lymfocytů v epitelu žaludku imunokompetentních C57BL/6 i imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší při infekci *C. muris*. Zvýšené množství těchto buněk přetrvávalo v místě infekce i po vyléčení.
- Signifikantní nárůst počtu $\gamma\delta$ T-lymfocytů v místě infekce *C. muris* u imunokompetentních C57BL/6 i imunodeficientních C57BL/6 CD4^{-/-} a C57BL/6 CD8^{-/-} myší naznačuje jejich účast v imunitní kontrole žaludeční kryptosporidiózy.
- Nebyla zjištěna přítomnost granulocytů v místě infekce.

6.2 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE IMUNOKOMPETENTNÍCH BALB/c MYŠÍ *CRYPTOSPORIDIUM ANDERSONI* LI03 A NÁSLEDNÁ INFEKCE *C. MURIS* TS03

- Experimentální infekcí imunokompetentních BALB/c myší *C. andersoni* LI03 bylo potvrzeno, že laboratorní myši jsou k infekci tímto druhem kryptosporidie rezistentní.
- V žaludečním epitelu BALB/c myší byl po inokulaci oocystami *C. andersoni* LI03 pozorován vývoj imunitní odpovědi charakterizovaný zvýšenými počty různých subpopulací leukocytů.
- Experimentální infekcí BALB/c myší *C. andersoni* byla navozena rezistence k následné infekci druhem *C. muris*, která je pravděpodobně zprostředkovaná imunitní odpovědí hostitele.
- Během primární infekce *C. andersoni* byl prokázán vývoj buněčné imunitní odpovědi charakterizovaný zvýšeným množstvím T-lymfocytů v žaludečním epitelu.
- Významné zvýšení zastoupení CD4⁺, CD8⁺ a $\gamma\delta$ T-lymfocytů v epitelu žaludku při infekci *C. andersoni* naznačuje jejich účast v protektivní imunitní odpovědi zodpovědné za vznik rezistence k *C. muris*.
- Účast B-lymfocytů v protektivní imunitě při infekci *C. andersoni* podporují dlouhodobě perzistující zvýšená množství B-lymfocytů v žaludečním epitelu.
- Signifikantně zvýšená množství NK buněk při infekci *C. andersoni* a následné infekci *C. muris* naznačují účast této subpopulace leukocytů v imunitní odpovědi na kryptosporidiózu.

- Analýzou *ex vivo* kultur splenocytů bylo prokázáno, že v průběhu infekce *C. andersoni* dochází k produkci IFN γ a IL-10.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2% RPMI	RPMI obsahující 2 % BOFES
10% RPMI	RPMI obsahující 10 % BOFES
APC	antigen prezentující buňky
AUC	plocha pod křivkou (Area Under Curve)
BME	β -mercaptoethanol
BOFES	bovinní fetální sérum
BSA	bovinní sérový albumin
C57BL/6 CD4^{-/-}	myši s mutací v genu pro CD4 ⁺ T-lymfocyty
C57BL/6 CD8^{-/-}	myši s mutací v genu pro CD8 ⁺ T-lymfocyty
C57BL/6 Pfr1^{-/-}	myši s mutací v genu pro perforin 1 (Pore Forming Protein)
CD	receptory na povrchu leukocytů umožňující rozlišení na jednotlivé subpopulace (Cluster of Differentiation)
cDNA	komplementární DNA (Complementary DNA)
C_{max}	maximální množství/intenzita infekce
DTT	DiThioTreitol
dH₂O	deionizovaná voda
dNTPs	deoxyribonukleotid trifosfáty (Deoxyribonucleotide Triphosphate)
DPI	den po infekci (Day Post Infection)
DPNI	den po následné infekci
DPRI	den po reinfekci (Day Post Reinfection)
ELISA	Antibody-Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtOH	ethanol
FACC	průtoková cytometrie/cytometr (Fluorescent Activated Cell Cytometer/Cytometry)
GIT	gastrointestinální trakt
HEPA filtr	vysoce účinný filtr vzduchových částic (High Efficiency Particulate Air Filter)
HRP	vysoce rekombinantní protein (High Recombinant Protein)
HTS	robotizovaný podavač vzorků umožňující měření průtokovým cytometrem přímo z 96-jamkového mikrotitračního panelu s kulatým dnem (High Throughput Sampler)
IELs	intraepiteliální leukocyty (Intraepithelial Leukocytes)

IFNγ	interferon γ
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
ILLs	lymfocyty účastníci se nespecifické imunitní odpovědi (Innate-Like Lymphocytes)
IVC	individuálně ventilované chovné klece (Individually Ventilated Cages)
MAbs	monoklonální protilátky (Monoclonal Antibodies)
MBL	manózu vázající lektin (Mannose Binding Lectin)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
mRNA	mediátorová RNA (Messenger RNA)
NK	negativní kontrola (0. DPI)
NK buňky	přirození zabíječi (Natural Killer Cells)
Nude myši	myš bez thymu
OPG	počet oocyst na gram trusu (Oocysts Per Gram)
PaÚ BC AVČR, v.v.i.	Parazitologický Ústav, Biologické Centrum AVČR, v.v.i
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PI	propidium iodid (Propidium Iodide)
SCID myši	myši s deficitem T- a B-lymfocytů: těžká kombinovaná imunodeficiencie (Severe Combined Immunodeficiency)
SD	směrodatná odchylka (Standard Deviation)
SSU rDNA	gen kódující RNA malé ribozomální podjednotky
T_C-lymfocyty	cytotoxické T-lymfocyty (Cytotoxic Cells)
TCR	T-buněčný receptor (T Cell Receptor)
T_H-lymfocyty	pomocné T-lymfocyty (Helper Cells)
T_{max}	čas, ve kterém bylo identifikováno maximální množství/intenzita infekce (C _{max})
TMB	tetramethylbenzidin
$\alpha\beta$ T-lymfocyty	buňky s $\alpha\beta$ T-buněčným receptorem (TCR $\alpha\beta$)
$\gamma\delta$ T-lymfocyty	buňky s $\gamma\delta$ T-buněčným receptorem (TCR $\gamma\delta$)

8. 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.
- Adjei A.A., Shrestha A.K., Castro M., Enriquez F.J. 2000.** Adoptive transfer of immunity with intraepithelial lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-infected severe combined immunodeficient mice. *Am. J. Med. Sci.* 320: 304–309.
- 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.
- Alvarez-Pellitero P., Sitja-Bodadilla A. 2002.** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* 32: 1007–1021.
- Alvarez-Pellitero P., Quiroga M.I., Sitja-Bodadilla A., Redondo M.J., Palenzuela O., Padros F., Vazquez F., Nieto J.M. 2004.** *Cryptosporidium scopthalmi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Organ.* 62: 133.
- 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. 1997.** The ultrastructure of the parasite and the mucus cell relationship and endogenous stages of *Cryptosporidium muris* in the stomach of laboratory mice. *Tr. J. Vet. A. Sci.* 23: 117–125.
- 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.
- Barakat F.M., McDonald V., Di Santo J.P., Korbel D.S. 2009.** Roles for NK cells and an NK cell-independent source of intestinal gamma interferon for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 77: 5044–5049.
- 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* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Vet. Parasitol.* 77: 195–197.
- Cacció, S.M. 2005.** Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parasitology* 47: 185–192.
- 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.
- Chacín-Bonilla L. 2007.** *Cryptosporidium*: phylogeny and taxonomy. *Invest. Clin.* 48: 1–4.
- 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., Sterling C.R., Wang C., Jakubowski W., DuPont H.L. 1999.** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with preexisting anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 157–164.
- 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.
- Clerici M., Galli M., Bosis S., Gervasoni C., Moroni M., Norbiato G. 2000.** Immunoendocrinologic abnormalities in human immunodeficiency virus infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917: 956–961.

- Collini P., Noursadeghi M., Sabroe I., Miller R.F., Dockrell D.H. 2010.** Monocyte and macrophage dysfunction as a cause of HIV-1 induced dysfunction of innate immunity. *Curr. Mol. Med.* 10: 727–740.
- 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.
- Dann S.M., Okhuysen P.C., Salameh B.M., DuPont H.L., Chappell C.L. 2000.** Fecal antibodies to *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *Infect. Immun.* 68: 5068–5074.
- Dann S.M., Wang H.C., Gambarin K.J., Actor J.K., Robinson P., Lewis D.E., Caillat-Zucman S., White A.C. Jr. 2005.** Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan *Cryptosporidium*. *J. Infect. Dis.* 192: 1294–1302.
- Davami M.H., Bancroft G.J., McDonald V. 1997.** *Cryptosporidium* infection in major histocompatibility complex congenic strains of mice: variation in susceptibility and the role of T-cell cytokine responses. *Parasitol. Res.* 83: 257–263.
- 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.
- Domenéch-Sánchez A., Olea F., Berrocal C.I. 2008.** Infection related to recreational waters. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 26: 32–37.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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. 2008.** The general biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer R., Xiao L. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–42.
- 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., Santín M. 2009.** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164: 192–200.
- Fayer R., Santín M., Macarisin D. 2010.** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172: 23–32.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M. 2008.** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156: 191–198.
- Fayer R., Santín M., Xiao L. 2005.** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624–629.

- Fayer R., Speer C.A., Dubey J.P. 1997:** The general biology of *Cryptosporidium*. In Fayer R. (Ed.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 2–33.
- Fayer R., Trout J.M., Xiao L., Morgan U., Lal A.A., Dubey J.P. 2001.** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415–1422.
- Feng Y., Alderisio K.A., Yang W., Blancero L.A., Kuhne W.G., Nadareski C.A., Reid M., Xiao L. 2007.** *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6475–6483.
- Feng Y., Yang W., Ryan U., Zhang L., Kváč M., Koudela B., Modrý D., Li N., Fayer R., Xiao L. 2011.** Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J. Clin. Microbiol.* 49: 34–41.
- 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.
- Gait, R., Soutar, R.H., Hanson, M., Fraser, C., Chalmers, R. 2008.** Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *Vet. Rec.* 162: 843–845.
- 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.
- Gatei W., Ashford R.W., Beeching N.J., Kamwati S.K., Greensill J., Hart C.A. 2002.** *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 204–206.
- Gomez Morales M.A., Ausiello C.M., Guarino A., Urbani F., Spagnuolo M.I., Pignata C., Pozio, E. 1996.** Severe, protracted intestinal cryptosporidiosis associated with interferon gamma deficiency: Pediatric case report. *Clin. Infect. Dis.* 22: 848–850.
- Gomez Morales M.A., Mele R., Ludovisi A., Bruschi F., Tosini F., Rigano R., Pozio E. 2004.** *Cryptosporidium parvum*-specific CD4 Th1 cells from sensitized donors responding to both fractionated and recombinant antigenic proteins. *Infect. Immun.* 72: 1306–1310.
- Gomez Morales M.A., La Rosa G., Ludovisi A., Onori A.M., Pozio E. 1999.** Cytokine profile induced by *Cryptosporidium* antigen in peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent and immunosuppressed persons with cryptosporidiosis. *J. Infect. Dis.* 179: 967–973.
- Guk S.M., Yong T.S, Chai J.Y. 2003.** Role of murine intestinal intraepithelial lymphocytes and lamina propria lymphocytes against primary and challenge infections with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 89: 270–275.

- 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.
- 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: 233–242.
- 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.
- Heine J., Moon H.W., Woodmansee D.B. 1984.** Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect. Immun.* 43: 856–859.
- 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.
- Hommer V., Eichholz J., Petry F. 2003.** Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 359–364.
- Haupt E.R., Bushen O.Y., Sam N.E., Kohli A., Asgharpour A., Ng C.T., Calfee D.P., Guerrant R.L., Maro V., Ole-Nguyaine S., Shao J.F. 2005.** Short report: Asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 520–522.
- Hůrková L., Hajdušek O., Modrý D. 2003.** Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *J. Wildl. Dis.* 39: 441–444.
- Iseki M. 1979.** *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn. J. Parasitol.* 28: 285–307.
- Iseki M. 1986.** Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Parasitol.* 35: 521–526.
- 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.
- Jakobi V., Petry F. 2008.** Humoral immune response in IL-12 and IFN-gamma deficient mice after infection with *Cryptosporidium parvum*. *Parasite Immunol.* 30: 151–161.

- Jalovecká M., Sak B., Kváč M., Květoňová D., Kučerová Z., Salát J. 2010.** Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. *Parasitol. Res.* 106: 1159–1166.
- Jiang J., Alderisio K.A., Xiao L. 2005.** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4446–4454.
- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krížek J., Modrý D., Šlapeta J. 2008.** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol.* 55: 81–98.
- 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.
- Kirkpatrick B.D., Huston C.D., Wagner D., Noel F., Rouzier P., Pape J.W., Bois G., Larsson C.J., Alston W.K., Tenney K., Powden C., O'Neill J.P., Sears C.L. 2006.** Serum mannose-binding lectin deficiency is associated with cryptosporidiosis in young Haitian children. *Clin. Infect. Dis.* 43: 289–294.
- Kodádková A., Kváč M., Ditrich O., Sak B., Xiao L. 2010.** *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *J. Parasitol.* 96: 211–212.
- Korbel D.S., Barakat F.M., Di Santo J.P., McDonald V. 2011.** CD4+ T cells are not essential for control of early acute *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. *Infect. Immun.* 79: 1647–1653.
- 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.
- Kuo C., Wares J.P., Kissinger J.C. 2008.** The Apicomplexan whole-genome phylogeny: An analysis of incongruence among Gene Trees. *Mol. Biol. Evol.* 25: 2689–2698.
- Kváč M. 2008.** Žaludeční kryptosporidie a kryptosporidióza savců. Habilitační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 60 pp.
- Kváč M., Kodádková A., Sak B., Květoňová D., Jalovecká M., Rost M., Salát J. 2011.** Activated CD8⁺ T cells contribute to clearance of gastric *Cryptosporidium muris* infections. *Parasite Immunol.* 33: 210–216.
- 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.* 163: 33–38.
- Lasser, K.H., Lewin, K.J. and Rynning, F.W. 1979.** Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum. Pathol.* 10: 234–240.
- Laurent F., Eckmann L., Savidge T.C., Morgan G., Theodos C., Naciri M., Kagnoff M.F. 1997.** *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces polarized secretion of CX-C chemokines. *Infect. Immun.* 65: 5067–5073.
- 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.
- Lean I.S., Lacroix-Lamandé S., Laurent F., McDonald V. 2006.** Role of tumor necrosis factor alpha in development of immunity against *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 74: 4379–4382.

- 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.
- Leoni F., Amar C., Nichols G., Pedraza-Díaz S., McLauchlin J. 2006.** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* 55: 703–707.
- Levine N.D. 1980.** Some corrections of coccidian (Apicomplexa, Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66: 830–834.
- 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.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Lukin K., Cosyns M., Mithcell T., Saffry M., Hayward A. 2000.** Eradication of *Cryptosporidium parvum* infection by mice with ovalbumin-specific T cells. *Infect. Immun.* 68: 2663–2670.
- 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.
- Lv C., Zhang L., Wang R., Jian F., Zhang S., Ning C., Wang H., Feng C., Wang X., Ren X., Qi M., Xiao L. 2009.** *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7692–7699.
- Mac Kenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R., Rose J.B., Davis J.P. 1994.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Eng. J. Med.* 331: 161–167.
- Manabe Y., Clark D., Moore R., Lumadue J., Dahlman H., Belitsos P., Chaisson R., Sears C. 1998.** Cryptosporidiosis in patients with AIDS: Correlates of disease and survival. *Clin. Infect. Dis.* 27: 536–542.
- Masuno K., Yanai T., Hirata A., Yonemaru K., Sakai H., Satoh M., Masegi T., Nakai Y. 2006.** Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Vet. Pathol.* 43: 202–207.

- 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. 1993.** *Cryptosporidium muris* in adult mice: a model for investigation of the immunology of mammalian cryptosporidiosis. In: Bartha J.R., Fernando M.A. (Eds.) *Proceedings of the Vith International Coccidiosis Conference.* University of Guelph, Canada p. 133.
- 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., Bancroft G.J. 1998.** Immunological control of *Cryptosporidium* infection. *Parasite Immunol.* 16: 315–320. *Chem. Immunol.* 70: 103–123.
- 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.

- Mead J.R., You X. 1998.** Susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infection in two strains of gamma interferon knockout mice. *J. Parasitol.* 84: 1045–1048.
- 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: 208–221.
- Moir S., Fauci A.S. 2008.** Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122: 12–19.
- 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.A. 2001.** Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.* 31: 289–296.
- Morgan U.M., Xiao L., Monis P.T., Sulaiman I., Pavlásek I., Blagburn B., Olson M., Upton S.J., Kramtsov N.V., Lal A.A., Elliot A., Thompson R.C.A. 2000.** Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitol.* 120: 457–464.
- Morgan-Ryan U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R.C.A., Olsen M., Lal A.A., Xiao L. 2002.** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 433–440.
- Murphy K., Travers P., Walport M. 2008.** Janeway's Immunobiology, Seventh Edition. Garland Science Publishing 887 pp.
- 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.
- Newman R.D., Zu S.X., Wuhib T., Lima A.A.M., Guerrant R.L., Sears C.L. 1994.** Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. *Ann. Intern. Med.* 120: 500–505.
- Nime F.A., Burek, J.D., Page D.L., Holscher M.A., Yardley J.H. 1976.** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 592–598.

- Nordone S.K., Gookin J.L. 2010.** Lymphocytes and not IFN-gamma mediate expression of iNOS by intestinal epithelium in murine cryptosporidiosis. *Parasitol. Res.* 106: 1507–1511.
- 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.
- Özkul I.A., Aydin Y. 1994.** Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 55: 129–132.
- Pavlásek I. 1999.** Cryptosporidia, biology diagnosis, host spectrum, specificity and the environment. *Remedia. Clin. Microbiol.* 3: 290–302.
- 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.
- Pavlásek I., Lávička M., Horák P., Král J., Král B. 1995.** *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus*) Schegel 1893 in captivity at Prague zoo. *Gazella* 22: 99–108.
- Peeters J.E., Villacorta I., Vanopdenbosch E., Vanderghenst D., Naciri M., Ares Maras E., Yvorre 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.
- Pettoello-Mantovani M., Di Martino L., Dettori G., Vajro P., Scotti S., Ditullio M.T., Guandalini S. 1995.** Asymptomatic carriage of intestinal *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunodeficient children: A prospective study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 14: 1042–1047.
- Petry F., Jakobi V., Wagner S., Tessema T.S., Thiel S., Loos M. 2008.** Binding and activation of human and mouse complement by *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) and susceptibility of C1q- and MBL-deficient mice to infection. *Mol. Immunol.* 45: 3392–3400.
- Plutzer J., Karanis P. 2009.** Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet. Parasitol.* 165: 187–199.

- Pospischil A., Stiglmeier-Herb M.T., Hegel G., Wiener H. 1987.** Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet. Rec.* 112: 379–380.
- Power M.L., Ryan U.M. 2008.** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.* 94: 1114–1117.
- 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.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Ly C., Wang Q., Arrowood M.J., Xiao L. 2011.** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* In press.
- 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.
- Riggs M.W. 2002.** Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes Infect.* 4: 1067–1080.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S.J., Katzer F., Bartley P.M., Hunter P.R., Nath M., Innes E.A., Chalmers R.M. 2010.** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa, Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 40: 1539–1548.
- Roder J., Duwe A. 1979.** The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. *Nature* 278: 451–453.
- Rohlman V.C., Kuhls T., Mosier D.A., Crawford D.L., Greenfield R.A. 1993.** *Cryptosporidium parvum* infection after abrogation of natural killer cell activity in normal and severe combined immunodeficiency mice. *J. Parasitol.* 79: 295–297.
- Roos M.T., van Lier R.A., Hamann D., Knol G.J., Verhoofstad I., van Baarle D., Miedema F., Schellekens P.T. 2000.** Changes in the composition of circulating CD8+ T cell subsets during acute Epstein-Barr and human immunodeficiency virus infections in humans. *J. Infect. Dis.* 182: 451–458.
- 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.M., Monis P., Enemark H.L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R.C.A., Xiao L. 2004.** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J. Parasitol. 90: 769–773.
- Ryan U.M., Power M., Xiao L. 2008.** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). J. Eukaryot. Microbiol. 55: 22–26.
- 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.
- Schmidt W., Wahnschaffe U., Schafer M., Zippel T., Arvand M., Meyerhans A., Riecken E.O., Ullrich R. 2001.** Rapid increase of mucosal CD4 T cells followed by clearance of intestinal cryptosporidiosis in an AIDS patient receiving highly active antiretroviral therapy. Gastroenterology 120: 984–987.
- Slavin D. 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J. Comp. Pathol. 65: 262–270.
- 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. Parazitologija 31: 328–333.
- 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.
- Takeuchi D., Jones V.C., Kobayashi M., Suzuki F. 2008.** Cooperative role of macrophages and neutrophils in host Antiprotozoan resistance in mice acutely infected with *Cryptosporidium parvum*. Infect. Immun. 76: 3657–3663.
- Taylor J.M., Sy J.P., Visscher B., Giorgi J.V. 1995.** CD4⁺ T-cell number at the time of acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Epidemiol. 141: 645–651.

- Tessema T.S., Dauber E., Petry F. 2009a.** Adoptive transfer of protective immunity from *Cryptosporidium parvum*-infected interferon-gamma and interleukin-12-deficient mice to naive recipients. *Vaccine* 27: 6575–6581.
- Tessema T.S., Schwamb B., Lochner M., Förster I., Jakobi V., Petry F. 2009b.** 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* 214: 454–466.
- Theodos C.M. 1998.** Innate and cell-mediated immune responses to *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* 40: 87–119.
- 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.
- Tiangtip R., Jongwutiwes S. 2002.** Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 7: 357–364.
- 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.
- Turkcapar N., Kutlay S., Nergizoglu G., Atli T., Duman N. 2002.** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. *Nephron* 90: 344–346.
- 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.P., 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.P., 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.
- Uni S., Iseki M., Maekawa T., Moriva K., Takada S. 1987.** Ultrastructure of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) parasitizing the murine stomach. *Parasitol. Res.* 74: 123–132.
- 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.
- Valigurová A., Jirků M., Koudela B., Gelnar M., Modrý D., Šlapeta J. 2008.** Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int. J. Parasitol.* 38: 913–922.
- Vetterling J.M., Jervis H.R., Merrill T.G., Sprinz H. 1971.** *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus* with an emendation of the genus. *J. Protozool.* 18: 243–247.
- 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.
- Wang Y., Feng Y., Cui B., Jian F., Ning C., Wang R., Zhang L., Xiao L. 2010.** Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitol. Res.* 106: 341–347.
- 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.
- Weisburger, W.R., Hutcheon, D.F., Yardley, J.H., Roche, J.C., Hillis, W.D., Charache, P. 1979.** Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* 72: 473–478.

- Wetzel R. 1938.** Ein neus Coccid (*Cryptosporidium vulpis* ap. Nov.) aus dem Rotfuchs. Arch. Wissenschaftl. Prakt. Tierheilk. 74: 39–40.
- 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., Fayer R., Ryan U., Upton S. J., 2004a.** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 17: 72–97.
- 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. 2004b.** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. Appl. Environ. Microbiol. 70: 891–899.
- Zadrozny L.M., Stauffer S.H., Armstrong M.U., Jones S.L., Gookin J.L. 2006.** Neutrophils do not mediate the pathophysiological sequelae of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal piglets. Infect. Immun. 74: 5497–5505.
- Zheng J., Ren W., Pan Q., Wang Q., Elhag I.A., Li J., Li M., Gong P., Liu Y., Zhang X. 2011.** A recombinant DNA vaccine encoding *C. andersoni* oocyst wall protein induces immunity against experimental *C. parvum* infection. Vet. Parasitol. 179: 7–13.
- Zhu G., Marchewka M.J., Keithly J.S. 2000.** *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. Mikrobiology 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.