

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Katedra parazitologie

Bakalářská práce



**Dynamika zastoupení CD4+ a CD8+ T-lymfocytů ve střevě
a mesenterických lymfatických uzlinách u králíčat
různého věku infikovaných kokcidiemi
Eimeria intestinalis a *Eimeria flavescens***

Vypracovala: Věra Chromá
Vedoucí práce: RNDr. Michal Pakandl Csc.
Rok vypracování: 2009

Chromá Věra 2009: Dynamika zastoupení CD4+ a CD8+ T-lymfocytů ve střevě a mesenterických lymfatických uzlinách u králíčat různého věku infikovaných kokcidiemi *Eimeria intestinalis* a *Eimeria flavescens*. Bakalářská práce [Dynamics of CD4+ and CD8+ lymphocytes in the intestine and mesenteric lymph nodes of suckling rabbits of various age infected with coccidia *Eimeria intestinalis* a *Eimeria flavescens* . Bc. Thesis in Czech] -27 pp., University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The percentage of CD4+ and CD8+ lymphocytes in suckling rabbits was investigated by use of flow cytometry. Two coccidia species were used in the experiments: highly immunogenic *Eimeria intestinalis* and weakly immunogenic *E. flavescens*. No significant changes were observed in mesenteric lymph nodes except in rabbit inoculated at 33 days of age with *E. intestinalis*, when the percentage of CD8+ cells was significantly enhanced compared to control animals. After infection with *E. intestinalis*, the percentage of both CD4+ and CD8+ cells was enhanced in the intestinal epithelium from 22 days of age onwards. In contrast, only the percentage of intraepithelial CD4+ cells was increased in the rabbits inoculated at 33 days of age after infection with *E. flavescens*.

Tato práce byla financována z grantu GA ČR - projekt č. 524/05/2328

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě - v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 30. 4. 2009

.....
Věra Chromá

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi pomohli s vypracováním mé práce. Zejména mému školiteli Michalu Pakandlovi za poskytnutí materiálu, ale hlavně za čas a trpělivost, které mi věnoval po celou dobu mé práce. Dále děkuji Lence Hláskové za praktické rady a pomoc v laboratoři a Jiřímu Salátovi za čas, který mi věnoval při práci s cytometrem a za pomoc při statistickém zpracování dat.

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Přehled problematiky.....	5
2.1. Kmen Apikomplexa.....	5
2.2. Čeleď Eimeridae.....	5
2.3. Imunita proti kokcidiím.....	8
2.4. Hlavní rysy imunitního systému zajícovců.....	9
2.5. Migrace sporozoitů a její vztah k imunitní odpovědi.....	11
3. Materiál a metody.....	13
3.1. Zvířata.....	13
3.2. Parasiti.....	13
3.3. Uspořádání pokusu.....	13
3.4. Metody.....	13
3.5. Statistické zpracování.....	16
3.6. Příprava roztoků.....	17
4. Výsledky.....	18
4.1. Dynamika CD4+ a CD8+ T buněčných subpopulací v intraepiteliálních lymfocytech a MLN.....	18
5. Diskuse.....	23
6. Závěr.....	26
7. Použitá literatura.....	27

1. Úvod

Kokcidioza je onemocnění způsobené parazitickými prvky, kokcidiemi rodu *Eimeria* (kmen Apicomplexa), vyznačujícími se vysokou hostitelskou specifitou. Toto onemocnění způsobuje vysoké ekonomické ztráty v živočišné produkci u domestikovaných zvířat, včetně králíků.

Tato práce se zabývá imunitní odpovědí vůči kokcidióze v závislosti na věku králíčat. Byl sledován jeden z imunologických parametrů, zastoupení CD4 a CD8 lymfocytů.

2. Přehled problematiky

2.1. Kmen Apicomplexa

Tato skupina zahrnuje protista, která jsou alespoň po část svého životního cyklu intracelulárními parazity bezobratlých i obratlovců. Na vrcholu buňky je vytvořen apikální komplex sestávající z prekonoidálního prstence, polárního prstence a konoidu. Další organely patřící k apikálnímu komplexu jsou sekreční váčky (rhoptrie, mikronemy, denzní tělíska), které se podílejí na adhezi k buňce a její penetraci. V místě uvolnění sekretů z těchto organel se v hostitelské buňce vytvoří prohlubeň, do které se prvek zasune a nakonec je pohlcen (indukovaná fagocytóza). V hostitelské buňce se prvek nachází v parazitoforní vakuole, která nesplývá s lysozomy. Vývojového cyklus těchto organismů zahrnuje sexuální a asexuální část. Tento kmen obsahuje 3 třídy: Gregarinida, Haematozoa a Coccidea

2.2. Čeleď Eimeridae

Třída Coccidea sestává ze tří čeledí: Cryptosporidiidae, Sarcocystidae a Eimeriidae. Posledně jmenovaná čeleď zahrnuje výhradně jednohostitelské (monoxenní) kokcidie schopné v některých případech vytvářet klidová stádia v rezervoárových hostitelích. Eimerie jsou striktně hostitelsky, orgánově a tkáňově specifické. Vývojový cyklus se dělí na exogenní a endogenní a má tyto hlavní části: excystace a migrace sporozoitů, merogonie, gametogonie a sporogonie (Chroust 1998).

1. Excystace sporozoitů: Po pozření oocysty vhodným hostitelem dochází k uvolnění sporozoitů z oocyst (excystace). Mezi faktory ovlivňující excystaci patří tělesná teplota hostitele, koncentrace CO₂ a redukční prostředí v zažívacím traktu. Jejich působením dochází k dezintegraci stěny oocysty a uvolnění sporocyst. Z těch se pak vlivem trypsinu a žlučových solí uvolňují pohybliví sporozoiti do lumenu střeva.
2. Merogonie (schizogonie): Proces merogonie začíná penetrací sporozoitů do buněk hostitele. Uvnitř buňky se sporozoiti zakulacují a mění na jednojaderný meront. V něm dochází k merogonii zahrnující mnohočetné mitotické dělení jader a formování invazních rohlíčkovitých stádií- merozoitů. Počet generací merontů je charakteristický pro každý druh kokcidie.
3. Gametogonie: Merozoiti se po penetraci do hostitelské buňky transformují na pohlavní stádia, tzv. gamonty. Zatímco někteří merozoiti dávají vzniknout samčím mikrogamontům, jiné se přemění na samičí makrogamonty. Jádro mikrogamontu se mnohočetně dělí za vzniku početných mikrogamet. Mikrogamety jsou protáhlé buňky vybavené dvojicí bičíků, které jim po uvolnění se z hostitelské buňky umožňují při vyhledávání makrogamontů pohyb. Makrogamonty neprodělávají dělení, pouze rostou a po oplodnění mikrogametou se mění v zygotu, což je u kokcidií totéž co mladá oocysta. Ta následně opouští hostitelskou buňku a posléze i tělo. Zygota je jediné diploidní stádium v celém životním cyklu kokcidie, všechna ostatní stádia jsou haploidní.
4. Sporogonie: Označení pro finální část vývojového cyklu, během něhož dochází k uvolnění oocysty z hostitelské buňky a jejímu dělení ze stádia jedné buňky, sporontu, přes sporoblasty na finální, infekce schopné sporozoity. Při sporulaci probíhá meióza a následně mitóza, což dá vzniknout 8 sporozoitům. Tato část cyklu je exogenní a vyžaduje ke svému průběhu aerobní podmínky (Chroust 1998).

Řada druhů *Eimeria* je patogenní pro ptáky a savce a způsobuje vážná, i smrtelná onemocnění. Většina kokcidií se vyvíjí ve střevním epitelu, jednou z vyjímek je *Eimeria steidai*, která se vyvíjí v epitelu žlučovodů králíka.

2.2.1. Druhy *Eimerií* parazitující na králíkovi (Coudert a kol. 1995):

Eimeria coecicola

Eimeria exigua

Eimeria flavescens

Eimeria intestinalis

Eimeria irresidua

Eimeria magna

Eimeria media

Eimeria perforans

Eimeria piriformis

Eimeria stiedai

Eimeria vej dovskyi

2.2.2. Patogeneze

Jednotlivé druhy eimerií cizopasíci v trávicím traktu králíků mají rozdílnou patogenitu, vesměs se však v chovech jedná o smíšené infekce více druhů. Na závažnosti onemocnění se podílí i jiné faktory, uplatňuje se i sekundární infekce především *Escherichia coli* (Gregory a Catchpole 1986, Chroust 1998). K nejvíce patogením druhům střevních kokcií se řadí *E. flavescens* a *E. intestinalis* (Coudert a kol. 1995). Většina z nich prodělává vývoj v epitelu střevní sliznice. Rozsáhlé destrukce buněk epitelu střeva vyvolávají těžké katarální až difteroidní záněty, při zvláště silných infekcích i hemoragické záněty. Postupně dochází k atrofii klků, k těžkým poruchám trávení v důsledku posunu pH do alkalického prostředí, což podmiňuje patogenní uplatnění *E. coli*. Zvláště u zvířat, u nichž není vyvinuta imunita vedou tyto procesy k rychlému vyčerpání a rozsáhlým úhynům. Patologický obraz střevní kokciózy se projevuje především překrvením a infiltrací sliznice, jejíž stěna je vždy zesílená. Pravidelným nálezem při střevní kokcióze jsou bělošedá případně šedožlutá ložiska velikosti až několik milimetrů (Chroust 1998).

Eimerie králíků čítají 11 druhů. V této práci byla použita silně patogenní a imunogenní *E. intestinalis*, která postihuje zadní třetinu tenkého střeva a silně patogenní, ale málo imunogenní *E. flavescens*, která zasahuje slepé střevo a v menším rozsahu kolon.

2.2.3. Klinické příznaky kokcidiózy

Kokcidiózou onemocní králíci všech plemen. Příznaky jsou zejména inapetence, apatie, rychle se vyvíjející tympanie a při akutním průběhu průjem, někdy i s příměsí krve. Tyto příznaky jsou doprovázeny bolestivostí v krajině břišní, žíznivostí a často i záněty spojivek a zvýšenou salivací. Klinicky se kokcidióza projevuje zejména při špatném výživovém stavu, při stresu, při špatných zoohygienických podmínkách. Trvalý kontakt s infekcí, případně překonání onemocnění kokcidiózou vede u mladých kusů k určitému stupni imunity v dospělosti, která zpravidla zabrání novému vzplanutí onemocnění (Chroust 1998).

2.3. Imunita proti kokcidiím

Imunitní odpověď vůči kokcidiím byla předmětem řady studií. Byly zkoumány různé druhy eimerií, hlavně u kuřat a myši. O imunitní odpovědi králíků vůči kokcidióze však není mnoho literárních údajů. Nejpodrobnější studie publikovala Renaux a kol. (2003), která pracovala s vysoce imunogenní *E. intestinalis*. Další studii zabývající se imunogenitou *E. intestinalis* zpracoval Coudert a kol. (1993) a stejným tématem se zabýval například i Norton a kol. (1979), který pracoval s *E. flavescens* a *E. irresidua*.

2.3.1. Nespecifická imunita

Nespecifická imunita působí prostřednictvím řady odlišných mechanismů. Nespecifickými bariérami jsou například žaludeční sekrety, lysozymy a žlučové soli, střevní peristaltika. Nespecifické složky imunity reagují na přítomnost škodliviny rychle a narozdíl od specifických složek nemají tzv. imunologickou paměť (Hořejší a Bartůňková 2001).

2.3.2. Specifická imunita

Specifická imunita je zprostředkována protilátkami a lymfocyty. V této práci bylo zjišťováno zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů v mezenterických lymfatických uzlinách, v epitelu ilea a slepého střeva.

Hlavní část vývoje T lymfocytů probíhá v thymu. Thymus opouštějí dvě hlavní fenotypicky odlišné subpopulace. Obecně se předpokládá, že subpopulace CD4⁺ funguje jako

pomocné T buňky (Th) a CD8+ funguje jako cytotoxické T buňky (Tc) (Hořejší a Bartůňková 2001).

Je prokázáno, že buňkami zprostředkovaná imunita hraje velkou roli v ochraně proti kokcidiózám (Wakelin a Rose 1990, Rose 1996, Lillehoj 1998, Yun a kol. 2000). Bylo zjištěno, že CD4+ T buňky a pro některé druhy eimerií i CD8+ T buňky jsou velmi důležité v imunitní odpovědi, která potlačuje rozvoj parazita během primární infekce. Při sekundární infekci se v závislosti na druhu parazita různou měrou uplatňují CD4+ a CD8+ buňky, zpravidla však větší roli hrají CD8+ buňky (Wakelin a Rose 1990, Ovington a kol. 1995, Rose 1996, Lillehoj 1998).

2.4. Hlavní rysy imunitního systému zajícovců

2.4.1. Sliznicím přidružené lymfoidní tkáně (MALT- mucosal associated lymphoid tissue) a střevu přidružené lymfoidní tkáně (GALT- gut-associated lymphoid tissue)

Slizniční imunitní systém je tvořen ze sliznicím přidružených lymfoidních tkání (mucosa-associated lymphoid tissue - MALT), které se nacházejí v nosní sliznici, průduškách, mléčných žlázách, genitálním traktu a střevě. Část MALT, která se nachází ve střevě se nazývá střevu přidružené lymfoidní tkáně (gut-associated lymphoid tissue - GALT). Nejdůležitější úlohou MALT je zneškodnit invazivní patogeny v místě jejich vstupu a zabránění rozšíření infekce v celém těle. Součástí MALT jsou i M buňky (M-cells), které fungují jako antigen-prezentující buňky (Mage a kol. 1998).

GALT tvoří tkáně a buňky stále vystavené antigenům z potravy, normální střevní mikroflóře a požitým patogenům. Více než polovina z celkového počtu lymfocytů MALT je obsažena v GALT (Mage a kol. 1998). GALT u králíků zahrnuje apendix, sacculus rotundus, Peyerovy plaky, intraepiteliální lymfocyty a leukocyty lamina propria. Střevní imunitní systém postupně dozrává od narození do dospělosti. Celkové uspořádání lymfoidního systému je podobné jako u jiných savců s výjimkou apendixu, který je přítomen v kaudální části slepého střeva a sacculus rotundus nacházející se v přechodu mezi ileem a slepým střevem. Tyto dvě části GALT jsou specifické pouze pro zajícovce. U králíků je kolem 2- 10 Peyerových plaků podél tenkého střeva (Yun a kol. 2000).

V králičím apendixu se nachází lymfoidní tkáň, jejíž struktura a funkce je jiná než je tomu u ostatních savčích druhů (Mage a kol. 1998). Králičí apendix je při narození dlouhý

okolo 2,5 cm a obsahuje oblasti s převládajícími B nebo T lymfocyty. Největší velikosti dosáhne appendix kolem 6 týdne věku (okolo 9 cm) a v tomto stáří je složen z několika stovek jednotlivých folikulů. B-buňky jsou umístěny v zárodečném centru folikulů a oblasti dómů, později leží přímo pod epitelem nasedajícím na folikuly. U králíka v 6 týdnu věku nejsou v těchto regionech žádné T-buňky. Ty ale mohou být detekovány v interfolikulární oblasti. Od začátku 9 týdne po narození do konce dospívání podstupuje králičí appendix změny v celkové morfologii a distribuci B- a T-buněk, což u dospělých králíků nakonec vede ke vzniku lymfoidního orgánu, který je jen málo podobný appendixu u malého králíka. Ve skutečnosti je appendix dospělého králíka svou strukturou a buněčnou distribucí velmi podobný Peyerovým plakům. Appendix dospělého králíka obsahuje germinální centra, která jsou však menší než u šestitýdenních králíků. Navíc u dospělých zvířat mohou být nalezeny rozptýlené T buňky i tam, kde byly dříve pouze zóny B-buněk. T-buňky nesoucí povrchový znak CD4 jsou rozmístěny jak v oblasti dómů tak v germinálních centrech. CD8+ buňky jsou ve zralém appendixu většinou umístěny v interfolikulárních oblastech a pod epitelem pokrývajícím folikuly (FAE - follicle-associated epithelium) (Yun a kol. 2000).

Sacculus rotundus, další část GALT, která je lokalizována v přechodu mezi ileem a slepým střevem, je u šestitýdenního králíka podobný appendixu u stejně starého králíka. Tyto tkáně se liší v počtu germinálních center a folikulů. Stejně jako appendix se i sacculus rotundus během svého zrání mění a zralý sacculus rotundus má pravděpodobně stejnou funkci jako appendix (Yun a kol. 2000).

GALT má tři hlavní funkce v hostitelské obraně proti patogenním infekcím, včetně kokciidií: a) zpracování a prezentace antigenu, b) produkce střevních protilátek a c) aktivace buňkami zprostředkované imunity (Mage a kol. 1998).

2.4.2. Střevní intraepiteliální lymfocyty

Další částí GALT jsou samostatné buňky- intraepiteliální lymfocyty. Ve střevní sliznici jsou přítomny buňky náležející k imunitnímu systému, hlavně T a B lymfocyty a plasmatické buňky přítomné ve sliznici tenkého a tlustého střeva. Většinu lymfocytů tvoří T buňky, převažují CD4+ paměťové/ efektorové buňky. B buňky a plasmatické buňky vytvářejí převážně imunoglobulin A (Yun a kol. 2000) . Ve střevě, jsou lymfocyty přítomny v epitelu (intraepiteliální lymfocyty - IEL) i v lamina propria (lymfocyty lamina propria, LPL). IEL jsou umístěny převážně v bazální části epitelu, poblíž bazální membrány a poměr IEL k absorpčním epiteliálním buňkám je přibližně 1:6. Ačkoli antigení stimulace není pro rozvoj

intraepiteliálních lymfocytů nezbytná, absolutní počet buněk je značně ovlivněn přítomností potravních a jiných antigenů ve střevě. (Yun a kol. 2000).

Jsou známy dvě formy T buněčných receptorů (T cell receptor, TCR) pro existující antigeny, $\alpha\beta$ heterodimer ($\alpha\beta$ TCR+ buňky) a $\gamma\delta$ heterodimer ($\gamma\delta$ TCR+ buňky). V epitelu typ $\gamma\delta$ TCR převažuje (Yun a kol. 2000).

Intraepiteliální lymfocyty je možné pokládat za jednu z prvních specifických obranných bariér imunitního systému. Mají významný cytolytický potenciál a zasahují i regulačně do slizniční a systémové imunity. Intraepiteliální lymfocyty jsou nezbytné pro vývoj epitelových buněk.

2.5. Migrace sporozoitů a její vztah k imunitní odpovědi

V některých ohledech se migrace sporozoitů králičích kokcidií podobá invazi do hostitelských tkání kuřat. Sporozoiti *Eimeria tenella* nejprve pronikají do enterocytů v povrchovém epitelu slepého střeva a poté vstupují do intraepiteliálních lymfocytů (IEL). Tyto buňky opouštějí epitel a sporozoiti jsou jimi transportováni přes lamina propria do epitelia krypt (Lawn a Rose 1982). Fernando a kol. (1987) zjistili obdobnou migraci u různých druhů kuřecích kokcidií bez ohledu na to zda jejich prvotní vývoj probíhá v kryptách (*E. acervulina* a *E. maxima*) nebo v povrchovém epitelu (*E. praecox* a *E. bruneti*).

Pakandl a kol. (1995) a Drouet- Viard a kol. (1994) zjistili významný rozdíl mezi králičími a kuřecími kokcidiemi. Zatímco sporozoiti kuřecích kokcidií penetrují do stejné části střeva, ve které se následně vyvíjejí (Lawn a Rose 1982, Fernando a kol. 1987), sporozoiti králičích druhů vstupují do tkáně hostitele v tenkém střevě (zejména v duodenu), nehledě na specifické místo dalšího vývoje (Pakandl a kol. 1993, 1995, 1996, Drouet-Viard a kol. 1994). O další migraci často na velkou vzdálenost není mnoho známo. Možným vysvětlením je migrace mimo střevo, která byla ovšem prokázána pouze u *Eimeria coecicola* (Pakandl a kol. 2006).

Drouet-Viard a kol. (1994) našli u králíků 10 minut po inokulaci sporozoity v dvanácterníkové mukóze a o 4 hodiny později byli sporozoiti zjištěni v ileu, specifické oblasti vývoje parazita. Pakandl a kol. (1993, 1996) studovali endogenní vývoj *E. coecicola*. Ačkoliv se tato kokcidie vyvíjí v GALT (1. asexuální generace) a v epitelu appendixu (další stadia), sporozoiti nejdříve pronikli do tenkého střeva a teprve 48 hodin po inokulaci byli nalezeni v místě jejich dalšího vývoje. Podobných výsledků bylo dosaženo po infekci *E. magna*, kdy byli sporozoiti nalezeni v epiteliálních buňkách klků v duodenu, poté ve střevních intraepiteliálních

lymfocytech a v lamina propria stejné části střeva a o několik hodin později v jejunu a ještě hojněji v ileu (Pakandl a kol. 1995).

Pakandl a kol. (2006) pozorovali migraci sporozoitů po infekci *E. coecicola* a *E. intestinalis* pomocí imunohistochemie. Zatímco sporozoitů *E. coecicola* byli nalezeni v extraintestinální oblasti, mesenterických lymfoidních uzlinách a slezině, po infekci *E. intestinalis* nebyla v žádném z těchto orgánů stadia parazita nalezena. Sporozoitů *E. coecicola* tedy migrují mimo střevo, pravděpodobně přes lymfatický systém. Důvody takovéto migrace mohou být ve vývoji v odlišných částech střeva (appendix, sacculus rotundus, Peyerovy plaky) a neobvyklá subepiteliální lokalizace první asexuální generace v lymfoidních buňkách. Cesta migrace u *E. intestinalis*, stejně jako u jiných králičích kokcidií, není známa a pravděpodobně se liší od migrace *E. coecicola*, protože v extraintestinální oblasti nebyli nalezeni žádní sporozoitů *E. intestinalis* (Pakandl a kol. 2006).

V migraci sporozoitů hrají úlohu i CD8+ T buňky. Studie Lillehoj a Trout (1994) ukázala, že invaze sporozoitů do CD8+ lymfocytů je aktivní, ne fagocytický proces, ačkoli vstup do makrofágů může být způsoben buď aktivně nebo fagocytózou. Stejná buněčná subpopulace je zapojena do transportu sporozoitů po primární a sekundární infekci; větší množství sporozoitů přítomných v CD8+ T buňkách při sekundární infekci naznačuje, že přenos sporozoitů je blokován. Za součást imunitní odpovědi proti invazi kokcidiemi tedy může být mimo cytotoxický efekt (CD 8+ T lymfocyty jsou efektorové buňky imunitní odpovědi) považována i blokáda transportu sporozoitů.

3. Materiál a metody

3.1. Zvířata

SPF (specific patogen- free) novozélandští králíci pocházející z firmy Charles River, Německo, poskytnul AnLab s.r.o., Praha.

3.2. Paraziti

Byly použity 2 druhy kokcií. *Eimeria flavescens*, kmen izolovaný v Laboratoři kokcií parazitologického ústavu, BC AV ČR v.v.í. Kmen *Eimeria intestinalis* poskytl Pierre Coudert (INRA, BASE, Francie). K inokulaci experimentálních zvířat byly použity pouze čerstvě vysporulované oocysty (1- 40 dní po sporulaci).

3.3. Uspořádání pokusu

Celkem 48 králíků bylo inokulováno dvěma tisíci oocystami buď *E.intestinalis* nebo *E. flavescens* v 19, 22, 25, 29 a 33 dnech věku. Navíc byli králíci infikováni 14 a 16 den věku *E. intestinalis*. 4 zvířata byla zabita pro každý interval a druh parazita 14 dní po inokulaci. Další skupina 24 zvířat sloužila jako neinfikovaná kontrola a byla usmrcena ve stejném věku jako infikovaní králíci.

3.4. Metody

3.4.1. Postup při izolaci lymfocytů

3.4.1.1. Izolace lymfocytů z mezenterických lymfatických uzlin (MLN)

Byla použita upravená metoda podle Renaux a kol. (2003). Uzliny byly odebrány do zkumavky (15 ml) s médiem RPMI s přidavkem 2% séra Fetalclone (Hyclone) a uchovány na ledu. Poté byly protlačeny přes sítko pomocí pistu injekční stříkačky. Tato homogenizovaná suspenze byla 3x promyta v RPMI s obsahem 2% séra Fetalclone a vždy zcentrifugována 10

minut při 1000 otáčkách, byl odsán supernatant a znovu přidáno čisté RPMI. Po posledním odsátí média byla suspenze zředěna PBS s přídavkem 1% séra. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce - 10 μ l suspenze+ 500 μ l trypanové modři + 500 μ l RPMI a naředěny na vhodnou koncentraci (viz dále). Trypanovou modří byla zjišťována životaschopnost buněk.

3.4.1.2. Izolace intraepiteliálních lymfocytů z ilea

Pro izolaci intraepiteliálních lymfocytů byla použita upravená metoda dle Todd a kol. (1999). Ileum bylo vyjmuto z těla králíka, zbaveno tuku a byly odstraněny Peyerovy plaky. Poté bylo ileum injekční stříkačkou propláchnuto čistým PBS o teplotě 4°C zhruba po 3 minuty. Ileum bylo vloženo do 4°C RPMI s přídavkem 2% séra Fetalclone, stříkačkou propláchnuto a kousky ilea byly ponořeny do média a dány na 1- 2 hodiny do lednice (přežijí lymfocyty, ale ne absorpční epitelové buňky). Po 1-2 hodinách byly kousky střeva po dobu cca 15 minut pomalu proplachovány 5x injekční stříkačkou naplněnou 37°C médiem (viz dále). Mezi proplachováním byl opatrně vymačkáván obsah lumenu. Obsah byl přecezen přes silonovou vatu a ponechán 10 minut v klidu. Po dekantaci byl tento supernatant zcentrifugován 5 minut při 350 g a rozmíchán v Percollu 30% a dále zcentrifugován 15 minut při 350 g při laboratorní teplotě. Byl odebrán sediment, rozmíchán ve 45% Percollu a podvrstven 75% Percollem a zcentrifugován 30 minut při 350 g při laboratorní teplotě. Lymfocyty zachycené v interfázi byly sebrány a dány do PBS s obsahem 1% séra, zcentrifugovány při 350 g při teplotě 4°C, poté byl odsát supernatant a přidáno čisté PBS s přídavkem 1% séra. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce stejně jako buňky z MLN a naředěny na vhodnou koncentraci.

3.4.1.3. Izolace lymfocytů ze slepého střeva

Slepé střevo bylo vyjmuto z těla králíka a zbaveno tuku. Poté bylo podélně rozstříhnuto a opakovaně proplachováno PBS o teplotě 4°C dokud PBS nebylo čisté. Dále bylo střevo nastříháno na kousky a ponořeno do 4°C RPMI+ 2% séra a vloženo na 1- 2 hodiny do lednice. Po vyndání byly kousky střeva intenzivně třepány v mediu při 37°C. Další postup byl stejný jako při izolaci intraepiteliálních lymfocytů z ilea.

3.4.2. Společný postup pro značení lymfocytů z MLN, ilea a slepého střeva

Připravené suspenze buněk byly naředěny pomocí PBS s přidavkem 1% séra tak, že v každé mikrozkušavce 1,5 ml bylo v 50 μ l 0,5 milionu buněk. Bylo potřeba 10 mikrozkušavek pro každou izolaci buněk (kontrola, FITC, isotypová kontrola 1, isotypová kontrola 2a, 3x CD4 a 3x CD8). Do mikrozkušavek označených kontrola a FITC bylo napipetováno po 5 μ l PBS se sérem a do ostatních po 5 μ l monoklonální protilátky (Serotec UK) proti CD4 (MCA 799) a CD8 (MCA1576) nebo isotypové kontroly IgG1 (isotypová kontrola k CD8, MCA928) a IgG2a (isotypová kontrola k CD4, MCA 1576). Tyto myší IgG1 a IgG2a isotypové kontroly byly použity proto, že použité monoklonální protilátky patřily k těmto isotypům. Označené suspenze byly protřepány a nechány inkubovat 30 minut ve tmě na ledu. Po inkubaci bylo přidáno po 1 ml PBS se sérem do každé mikrozkušavky, po centrifugaci 10 min při 1000 otáčkách byl z každé odsát supernatant.

Dalším krokem byla inkubace s konjugátem fluorescein-isothiocyanátu (FITC) s kozími protilátkami proti myším imunoglobulinům (Sigma). Do kontrol nebyly přidávány protilátky a buňky byly inkubovány bez konjugátu. Místo něj byl do mikrozkušavek přidán 50 μ l PBS se sérem. Tyto mikrozkušavky byly opět dány na led, po dobu 30 min. Mezitím bylo do stejného počtu zkumavek dáno po 3 ml PBS se sérem. Po inkubaci bylo do mikrozkušavek dáno po 1 ml PBS se sérem a obsah mikrozkušavky kvantitativně přenesen do připravených zkumavek. Dále byly zkumavky zcentrifugovány na 10 min při 1250 otáčkách. Takto připravené buňky byly dále použity na stanovení procentuálního zastoupení lymfocytů pomocí průtokové cytometrie.

Procento buněk nespecificky označených isotypovou kontrolou (obvykle méně než 1,5%) bylo odečteno z hodnot získaných po inkubaci s anti CD4 nebo anti CD8 monoklonálními protilátkami.

3.4.3 Průtoková cytometrie

Pro zjišťování dynamiky CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů v jednotlivých vzorcích byla použita metoda průtokové cytometrie. Tato technika umožňuje kvantitativně analyzovat velké množství částic a na základě přesně definovaných parametrů umožňuje identifikovat částice splňující požadované parametry.

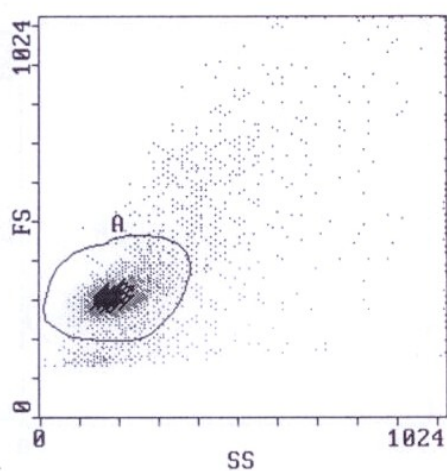
Připravený materiál byl měřen na průtokovém cytometru EPICS XL MLC, kde bylo zjišťováno procentuální zastoupení příslušné subpopulace lymfocytů. Bylo změřeno nejméně 10 000 buněk.

Obr. 1 a,b

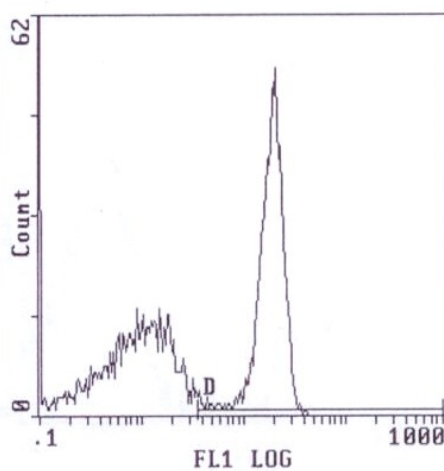
Příklad z výsledků získaných průtokovou cytometrií

Vzorek z MLN, značeno protilátkou proti CD4.

a)



b)



1a) Graf tzv. DOT- PLOT kde osa X znázorňuje vnitřní strukturu buňky a osa Y její velikost. Tento graf může zjistit morfologii buněk a odhalit tak hledaný typ lymfocytů.

1b) Graf. tzv. HISTOGRAM kde osa X znázorňuje intenzitu fluorescence a osa Y počet buněk.

3.5. Statistické zpracování

Pro statistické vyhodnocení byla použita metoda Studentova t- testu ($P \leq 0,05$), která je součástí programu Statistica.

3.6. Příprava roztoků

PBS (phosphate- buffered-saline)

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	2,17 g (heptahydrát) 1,15 g (anhydrát)
KH ₂ PO ₄	0,20 g

1x koncentrovaný = to vše na 1000 ml destilované H₂O

5x koncentrovaný = na 200 ml destilované H₂O

10x koncentrovaný = na 100 ml destilované H₂O

Hanksův roztok

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,10 g
Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	0,06 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Glukosa	1,00 g
NaHCO ₃	0,35 g
Destilovaná H ₂ O	1000 ml

Percoll

100% (90%) Percoll = 9 dílů roztoku Percoll a 1 díl 10 krát koncentrovaného PBS

= upravit pH na 7,2 – 7,4

75% Percoll = 3 díly Percollu 100% + 1 díl RPMI se 2% Fetalclone

45% Percoll = 9 dílů Percollu 100% + 11 dílů RPMI se 2% séra

30% Percoll = 3 díly Percollu 100% + 7 dílů RPMI se 2% séra

Medium pro izolaci IEL z ilea a tlustého střeva

Hanksův roztok + 5% séra Fetalclone + 0,1mM 1,4- dithioerythritol (DTE)

4. Výsledky

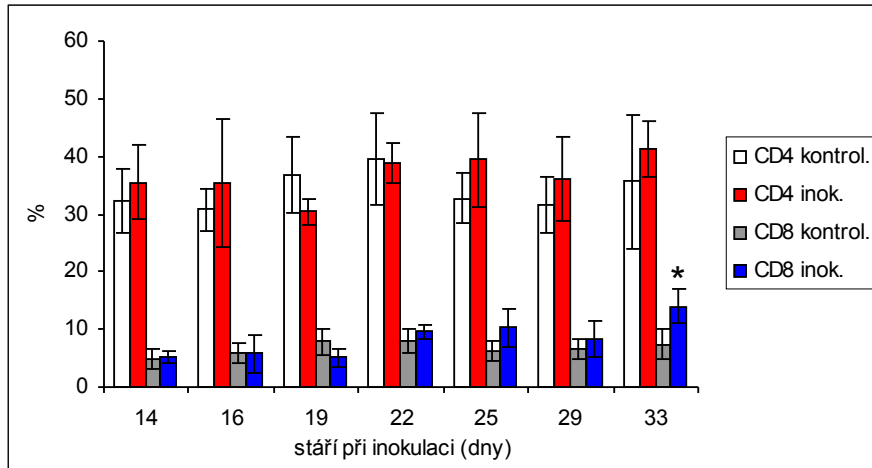
4.1. Dynamika CD4+ a CD8+ T buněčných subpopulací v intraepiteliálních lymfocytech a MLN

Po infekci oběma druhy kokcií se procentuální zastoupení CD4+ lymfocytů v MLN nelišilo od kontrolních zvířat. Poměr CD8+ buněk v MLN byl signifikantní pouze u králíků inokulovaných *E. intestinalis* (33 dní stáří v den inokulace- SDI), kdy zmíněné hodnoty byly 7,4 % v kontrolních zvířatech a 14% v infikovaných (obr. 2). V MLN u králíků nakažených *E. flavescens* nebyl žádný poměr s kontrolními králíky statisticky významný (obr.3) Ve střevním epitelu se zastoupení CD4+ buněk zvyšovalo po infekci *E. intestinalis* (od 22 dní SDI s výjimkou 25 dní) a zastoupení CD8+ buněk od 25 dnů SDI (obr. 4). Nejvýznamnější rozdíl byl zaznamenán u králíků inokulovaných 33 den SDI, kdy byly u CD4+ buněk naměřeny hodnoty 19,4 % u kontrolních a 60,0% buněk u inokulovaných králíků. Procento CD8+ lymfocytů bylo zvláště vysoké také u zvířat inokulovaných v 33 SDI. Jediná významná změna související s infekcí *E. flavescens* byla zjištěna u králíků infikovaných ve stáří 33 dnů, kdy zmíněné hodnoty CD4+ buněk byly 5,4% u kontrolních a 14,3 % u inokulovaných zvířat (obr.5).

Procentuální zastoupení CD8+ buněk mělo tendenci se zvyšovat se stářím v den inokulace, ale hodnoty se nikdy průkazně nelišily od hodnot u kontrolních zvířat.

Obr. 2

Zastoupení (v %) CD4+ a CD8+ T lymfocytů v mezenterických lymfatických uzlinách králíků nakažených *E. intestinalis*.

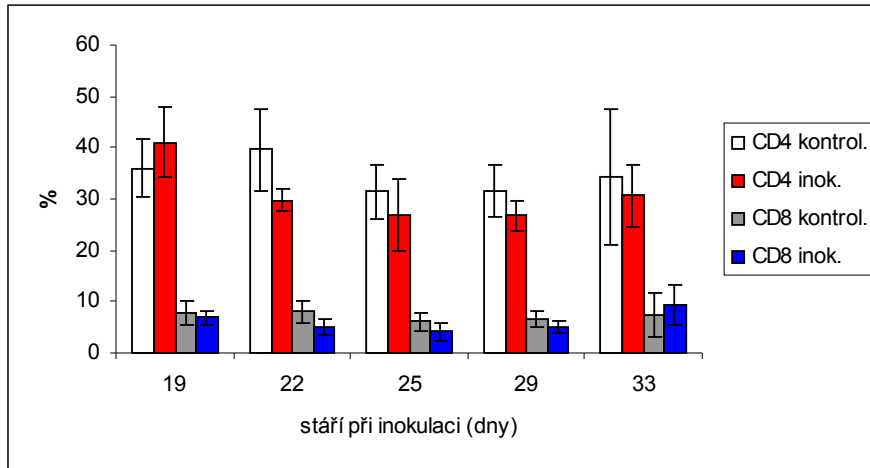


* statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$)

Jediný významný rozdíl mezi nenakaženými a infikovanými králíky byl zjištěn v CD8+ zastoupení T lymfocytů u králíků inokulovaných 33 SDI.

Obr. 3

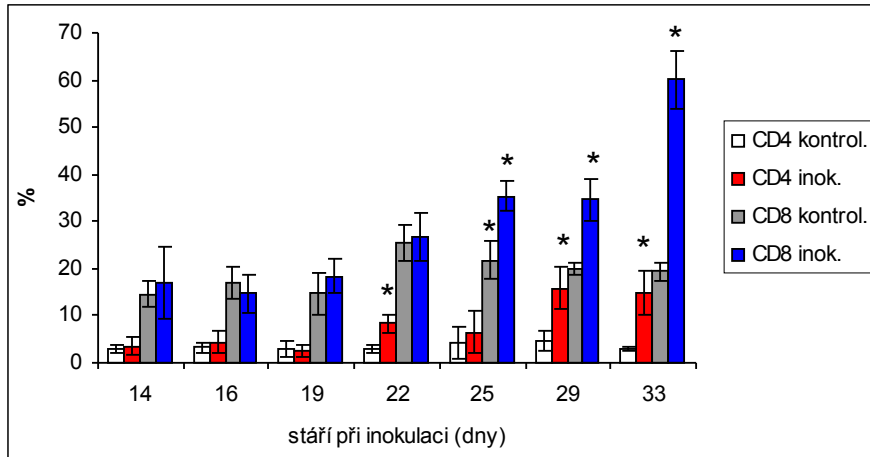
Zastoupení (v %) CD4+ a CD8+ T lymfocytů v mezenterických lymfatických uzlinách králíků nakažených *E. flavescens*.



V mezenterických lymfatických uzlinách nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl mezi kontrolními a nakaženými králíky.

Obr. 4

Poměr mezi CD4+ a CD8+ T lymfocytů v intraepiteliálních lymfocytech u králíků nakažených *E. intestinalis*.

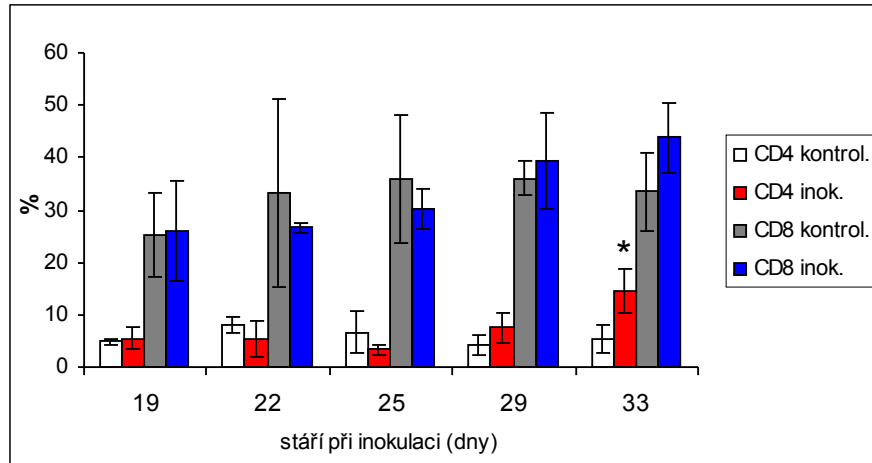


* statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$)

Procento CD4+ buněk v inokulovaných králících v poměru s kontrolními zvířaty bylo významně zvýšené u králíků nakažených 22, 29 a 33 SDI. Procento CD8+ buněk se zvyšuje u králíků inokulovaných 25 SDI a dále.

Obr. 5

Poměr mezi CD4+ a CD8+ T buňkami v intraepiteliálních lymfocytech králíků infikovaných *E. flavescens*.



* statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$)

Jediný významný rozdíl mezi nenakaženými a infikovanými králíky byl nalezen v poměru CD4+ buněk u zvířat inokulovaných 33 SDI.

5. Diskuse

Srovnávací studie imunitní reakce u 7- 8 týdenních králíků infikovaných *E. intestinalis* a *E. flavescens* ukazují, že oba druhy parazitů vyvolávají podobnou imunitní odpověď navzdory jejich rozdílné imunogenicitě (Pakandl a kol. 2008). Jediný zjevný rozdíl v odpovědi na infekci dvou druhů kokcií byl v procentu CD8+ lymfocytů ve specifickém místě vývoje parazita (poslední třetina tenkého střeva u *E. intestinalis* a tlusté střevo u *E. flavescens*), které se zvyšuje u králíků infikovaných *E. intestinalis*, ale ne u *E. flavescens*. Dynamika subpopulace lymfocytů ve střevním epitelu nakažených králíků kokciemi s vysokou (*E. intestinalis*) a nízkou (*E. flavescens*) imunogenicitou, ukazuje podstatnou úlohu místní reakce v imunitní odpovědi vůči nákaze kokciemi.

Od 25 SDI dále, jsou kokcie schopny relativně dobré reprodukce (Pakandl a Hlásková 2007), od tohoto SDI byl podíl CD4+ a CD8+ buněk ve střevním epitelu sajících králíků nakažených *E. intestinalis* zvýšený (Pakandl a Hlásková 2007). Ve srovnání s 7-8 týdenními králíky (Pakandl a kol. 2008) byl podíl CD8+ buněk ve střevním epitelu mladých kontrolních králíků nižší a zřejmě i proto rozdíl mezi kontrolními a infikovanými králíky byl ještě výraznější než u starších zvířat. Antigenní stimulace kokciemi pravděpodobně přispívá k osidlování epitelu CD8+ lymfocyty. Je zajímavé, že procento CD4+ buněk ve střevním epitelu se významně liší u sajících králíků inokulovaných v 22, 29, 33 SDI oproti kontrolním zvířatům. Jinak tomu bylo u starších králíků, u kterých byla průměrná hodnota 4,3% u kontrolních a 8,4% u inokulovaných (14 SDI), ale rozdíl nebyl statisticky významný (Pakandl a kol. 2008). Podíl CD8+ lymfocytů byl mimořádně vysoký u králíků inokulovaných ve 33 SDI a procento těchto buněk u stejných zvířat bylo rovněž významně zvýšeno i v mezenterických lymfatických uzlinách. Zastoupení této subpopulace lymfocytů v MLN se naopak nelišilo po infekci u starších králíků (Pakandl a kol. 2008). Ačkoli nebyl nalezen žádný rozdíl mezi 7-8 týdenními kontrolními králíky a stejně starými králíky nakaženými *E. flavescens* (Pakandl a kol. 2008), po inokulaci králíků ve 33 dnech SDI vzrostl podíl CD4+ buněk v epitelu tlustého střeva (5,4% u kontrolních oproti 14,4% u inokulovaných králíků). Překvapivě tedy některé parametry, které se v důsledku infekce neměnily u starších králíků, se významně odlišovaly u sajících králíků.

Nejpodrobnější studie byla publikována Renaux a kol. (2003), která pracovala s vysoce imunogenní *E. intestinalis*. Imunitní odpověď proti parazitovi byla po primární infekci králíků po odstavu velmi výrazná a vyznačovala se přechodným zvýšením v procentu střevních CD4+ lymfocytů a CD8+ lymfocytů v MLN 14 dní po inokulaci. Procentuální zastoupení CD8+

lymfocytů v epitelu bylo výrazně zvýšené od 14 dní po inokulaci i po delších intervalech. V této práci se u sajících králíčat poměr CD8+ lymfocytů v MLN zvyšoval pouze při infekci *E. intestinalis* ve 33 dnech SDI. Ve 33 dnech SDI bylo u sajících králíčat také nejvyšší procento zastoupení střevních CD4+ i CD8+ lymfocytů. Lze tedy říci, že výsledky Renaux a kol. (2003) se s výsledky uvedenými v této práci v podstatě shodují.

Shi a kol. (2001) zjišťovali časnou odpověď krys (0, 1 a 2 dny po inokulaci) na infekci *E. separata*. Po primární infekci převládaly ve střevě CD4+ buňky, zatímco CD8+ buňky představovaly hlavní subpopulaci lymfocytů po sekundární infekci. Rose a kol. (1992) demonstrovali na myších, u kterých byly zničeny CD4+ i CD8+ lymfocyty, že CD4+ lymfocyty jsou důležité při mechanismech uplatňujících se při primární infekci Eimeriemi a jejich závěry také ukázaly, že CD8+ lymfocyty hrají roli v obraně zvířete při sekundární infekci.

U telat nakažených *E. bovis* bylo pozorováno v MLN pouze zvýšení CD4+ buněk a to u zvířat zabitých 35 dní po inokulaci. V lymfocytech v periferní krvi bylo zastoupení obou subpopulací lymfocytů přechodně zvýšené 12 dní po inokulaci, ale klesalo od 25 dní po infekci a nakonec dosáhlo stejné hodnoty jako u kontrolních zvířat (Hermosilla a kol. 1999). Naopak v této studii byl v MLN zjištěn pouze signifikantní rozdíl v nárůstu CD8+ buněk.

Obecně lze říci, že u každého savčího druhu je odpověď na infekci kokcidiemi jiná, většinou se však v primární infekci uplatňují hlavně lymfocyty subpopulace CD4+ a v sekundární CD8+. V našem případě se i při primární infekci výrazněji uplatňovaly CD8+ lymfocyty.

Studie provedená Rothwell a kol. (1995) na kuřatech inokulovaných *E. maxima* ukázala, že po primární infekci došlo jak v epitelu tenkého střeva, tak v lamina propria ke zvýšení počtu T- lymfocytů. Počty CD4+ a CD8+ buněk byly zvýšeny po 3-5 dnech a podruhé ještě výrazněji 11 dní po infekci, ale zatímco počet CD8+ buněk vzrůstal jak v epitelu tak v lamina propria, počet CD4+ lymfocytů byl vyšší pouze v lamina propria. Autoři zobecňují, že jak CD4+ tak CD8+ lymfocyty hrají úlohu v imunitní odpovědi, ale celkově se na ní více podílejí CD8+ buňky (Rothwell a kol. 1995), což bylo zjištěno i v této práci.

Parametr sledovaný v této práci (procentuální zastoupení CD4+ a CD8+ lymfocytů v MLN, ileu a slepém střevě) společně s dalšími imunologickými parametry (Pakandl a kol. 2008) ukazují, že imunitní odpověď ke kokcidióze může být vyvolána i u mladých králíků před odstavením od 22 dne věku a dále. Tento výsledek je významný z hlediska vakcinace sajících králíčat proti kokcidióze, která musí být provedena co nejdříve, aby se předešlo spontánním infekcím virulentními kmeny kokcidií a zároveň ve věku, kdy imunitní systém je natolik vyvážený, že může být vyvolána imunitní odpověď vůči parazitovi.

6. Závěr

Pomocí průtokové cytometrie bylo sledováno procento zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů v epitelu ilea, slepého střeva a v mezenterických lymfatických uzlinách u sajících králíček nakažených *E. intestinalis* a *E. flavescens*. Bylo zjištěno, že se po infekci vysoce imunogenním druhem *E. intestinalis* dochází k významnému zvýšení zastoupení obou subpopulací intraepiteliálních lymfocytů přibližně od 22 dnů stáří v den inokulace, zatímco po infekci slabě imunogenní kokcií *E. flavescens* došlo pouze ke zvýšení zastoupení CD4⁺ lymfocytů v epitelu střeva králíček inokulovaných ve stáří 33 dnů. Po infekci oběma druhy kokcií nebyly v mezenterických lymfatických uzlinách zjištěny žádné významné rozdíly mezi kontrolními a inokulovanými zvířaty kromě králíček inokulovaných *E. intestinalis* v 33 dnech stáří, kdy bylo signifikantně zvýšeno zastoupení CD8⁺ lymfocytů.

Práce ukázala významný rozdíl mezi silně a slabě imunogenní kokcií, kdy při infekci slabě imunogenním druhem nebyly zjištěny žádné významné změny, a naopak při infekci vysoce imunogenním druhem je odpověď výrazná a spočívá jak ve zvýšení zastoupení pomocných T buněk, tak cytotoxických T lymfocytů. Zjištění, že ke změnám v zastoupení lymfocytů dochází hlavně v epitelu střeva vede k závěru že při primární infekci kokcií je důležitá lokální imunitní odpověď.

7. Použitá literatura

Coudert P., Licois D., Provôt F., Drouet-Viard F. 1993: *Eimeria* sp. from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): pathogenicity and immunogenicity of *Eimeria intestinalis*. Parasitol. Res. 79: 186-190.

Coudert P., Licois D., Drouet-Viard F. 1995: *Eimeria* species and strains of the rabbits. In: Eckert J., Braun R., Shirley M.W., Coudert P., editors. Guidelines on techniques in coccidiosis research. European Commission, Directorate-General XII, Science, Research and Development Environment Research Programme, pp. 52-71.

Drouet-Viard F., Licois D., Provôt F., Coudert P. 1994: The invasion of the rabbit intestinal tract by *Eimeria intestinalis* sporozoites. Parasitol. Res. 80:706-7.

Fernando M.A., Rose M.E., Millard B.J. 1987: *Eimeria* sp of domestic fowl: the migration of sporozoites intra- and extraenterically. J. Parasitol. 73: 561-7.

Gregory M.W., Catchpole J. 1986: Coccidiosis in rabbits: the pathology of *Eimeria flavescens* infection. Int. J. Parasitol 16:131-145.

Hermosilla C., Bürger H.-J., Zahner H. 1999: T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. Vet. Parasitol. 84: 49-64.

Hořejší V., Bartůňková J. 2001: Základy imunologie, 2. vydání. Triton, Praha, 260 p.

Chroust K., Lukešová D., Modrý D., Svobodová V. 1998: Veterinární protozoologie- Vyd. 1., Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 113 s. - Fakulta veterinárního lékařství. - Ústav parazitologie, Brno. -(brož.)

Lawn A.M., Rose M.E. 1982: Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. J. Parasitol. 68: 1117-23.

Lillehoj H.S., Trout J.M. 1994: CD8+ T cell- coccidia interactions. *Parasitology Today* 10: 10-14.

Lillehoj H.S. 1998: Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *Int. J. Parasitol.* 28: 1071-1081.

Mage R.G. 1998: Immunology of lagomorphs. In: Pastoret P.P., Bazin H., Griebel P., Govaerts A.S. (eds) *Handbook of vertebrate immunology*. Academic, London, pp 223-260.

Norton C. C., Catchpole J., Joyner L. P. 1979: Redescriptions of *Eimeria irresidua* Kessel & Jankiewicz, 1931 and *E. flavescens* Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. *Parasitology* 79: 231-248.

Ovington K.S., Alleva L.M., Kerr E.A. 1995: Cytokines and immunological control of *Eimeria* sp. *Int. J. Parasitol.* 25: 1331-1351.

Pakandl M., Coudert P., Licois D. 1993: Migration of sporozoites and merogony of *Eimeria coecicola* in gut-associated lymphoid tissue. *Parasitol. Res.* 79: 593-598.

Pakandl M., Drouet-Viard F., Coudert P. 1995: How do sporozoites of rabbit *Eimeria* species reach their target cells? *C R Acad Sci Paris* 318: 1213-1217.

Pakandl M., Gaca K., Drouet-Viard F., Coudert P. 1996: *Eimeria coecicola* Cheissin 1947: endogenous development in gut-associated lymphoid tissue. *Parasitol. Res.* 82: 347-351.

Pakandl M., Sewald B., Drouet-Viard F. 2006: Invasion of the intestinal tract by sporozoites of *Eimeria coecicola* and *Eimeria intestinalis* in naive and immune rabbits. *Parasitol Res* 98:310-316.

Pakandl M., Hlásková L., Poplštejn M., Nevečeřalová M, Vodička T., Salát J., Mucksová J., 2008: Immune response to rabbit coccidiosis: a comparison between infections with *Eimeria flavescens* and *E. intestinalis*. *Folia Parasitol.* (in press).

Renaux S., Drouet-Viard F., Chanteloup N.K., Le Vern Y., Kerboeuf D., Pakandl M., Coudert P. 2001: Tissues and cells involved in the invasion of the rabbit intestinal tract by sporozoites of *Eimeria coecicola*. *Parasitology Research* 87: 98-106.

Renaux S., Quéré P., Buzoni-Gatel D., Sewald B., Le Vern Y., Coudert P., Drouet-Viard F. 2003: Dynamics and responsiveness of T-lymphocytes in secondary lymphoid organs of rabbits developing immunity to *Eimeria intestinalis*. *Vet. Parasitol.* 110: 181–195.

Rose M.E., Leopard J.V., Hobbs S.M. 1984: Coccidiosis: characterization of antipody response to infection with *Eimeria nieschulzi*. *Parasite Immunol.* 6: 1-12.

Rose M.E. 1996: Immunity to coccidia In: Davison T.F., Morris T.R., Payne L.N., Eds.: *Poultry immunology*. *Poultry Sci. Symp. Series, Volume 24*, pp 265-299.

Rothwell L., Gramzinski R.A., Rose M.A., Kaiser P. 1995: Avian coccidiosis: changes in intestinal lymphocyte populations associated with the development of immunity to *Eimeria maxima*. *Parasite Immunol.* 17: 525-533.

Shi M.Q., Huther S., Burkhart E., Zahner H. 2001: Lymphocyte subpopulations in caecum mucosa of rats after infection with *Eimeria separata*: early responses in naive and immune animals to primary and challenge infections. *Int. J. Parasitol.* 84: 328-337.

Wakelin D., Rose M. E. 1990: Immunity to coccidiosis. In P. L Long (Ed.), *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 281-306

Yun C.H., Lillehoj H.S., Lillehoj E.P. 2000: Intestinal immune response to coccidiosis. *Dev. Comp. Immunol.* 24: 303-324.