

## **Sesja 5**

### **Aspekty immunologiczne inwazji pasożytniczych**



## **Modulacyjny wpływ inwazji *Heligmosomoides polygyrus* na przebieg zarażenia *Cryptosporidium parvum* u myszy C57BL/6**

### **Modulatory effect of *Heligmosomoides polygyrus* invasion on course of *Cryptosporidium parvum* infection**

**Małgorzata Bednarska, Anna Bajer i Edward Siński**

Zakład Parazytologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;  
E-mail: mabed@biol.uw.edu.pl

*Cryptosporidium parvum* jest pierwotniakiem stwierdzanym w populacjach dziko żyjących gryzoni, zazwyczaj u zwierząt zarażonych równocześnie innymi pasożytami. Inwazje te są chroniczne, co sprzyja długotrwałemu skażeniu środowiska zewnętrznego, a może być uwarunkowane obecnością innych pasożytów.

Przeprowadzone badania są pierwszymi próbami prześledzenia koinwazji *C. parvum* i nicienia *H. polygyrus* w warunkach doświadczalnych. Określono dynamikę zarażenia *C. parvum* u myszy z inwazją *C. parvum*, koinwazją *C. parvum*/*H. polygyrus* oraz liczbę dorosłych nicieni *H. polygyrus* w jelicie zarażonych myszy. Jako parametry odpowiedzi immunologicznej oznaczono poziom wytwarzania IFN- $\gamma$  i odsetek komórek, które go syntetyzują oraz koncentrację IL-12 w śluzówce jelita.

W przebiegu zarażenia *C. parvum* u myszy stwierdzono typową dla tego pierwotniaka infekcję zakończoną usunięciem pasożytów z organizmu zarażonych zwierząt. W przebiegu zarażenia *C. parvum* u myszy z koinwazją *H. polygyrus* po wystąpieniu fazy ostrej inwazji stwierdzono w kolejnych tygodniach chroniczne zarażenie pierwotniakiem. Poziom IFN- $\gamma$  badany w mysich splenocytach także był różny w zależności od grupy eksperymentalnej. Wytwarzanie IFN- $\gamma$  w grupie myszy z koinwazją nie odbiegało od wartości kontrolnych i fakt jest przypuszczalnie efektem modulacyjnego działania nicienia i wpływa ostatecznie na przedłużenie czasu inwazji *C. parvum*. Wzrost stężenia IL-12 w śluzówce zanotowano we wszystkich grupach eksperymentalnych.

Badania były finansowane z grantu KBN 6 P04C 097 21

## Adaptacja metody western-blottingu do badania antygenów larw L1 *Hypoderma bovis*

### Adaptation of Western-blott method for examination of *Hypoderma bovis* larvae antigen

Tomasz Cencek

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; E-mail: tcencek@piwet.pulawy.pl

Proteolityczne enzymy trawienne larw gzów z gatunku *Hypoderma bovis* są najsilniejszymi antygenami tych pasożytów, a jednocześnie bardzo silnymi immunosupresorami. W badaniach nad właściwościami tych białek i ich wpływem na układ odpornościowy żywicieli szeroko wykorzystywane są techniki elektroforetyczne. Szczególnie przydatną jest metoda elektroforezy natywnej umożliwiającą rozdział białek wydzielniczych larw gzów na 6-8 głównych frakcji. Elektrotransfer na membranę nitrocelulozową tak rozdzielonych białek stwarza jednak trudności i część białek antygeny w ogóle nie ulega przeniesieniu na membranę lub przenoszona jest w stopniu niewystarczającym. W odczynie westernblottingu (WB) brak jest wówczas pełnej reakcji, a uzyskiwane wyniki analizy densytometrycznej są niedokładne i niepowtarzalne. Celem pracy była taka modyfikacja metody WB, która pozwoliłaby na uzyskiwanie skutecznego transferu białek antygeny *H. bovis*, nieprzenoszonych na membranę metodą klasyczną oraz uzyskiwanie powtarzalnych wyników w reakcjach z surowicą. Dla osiągnięcia tego efektu postanowiono białka antygeny *H. bovis* rozdzielone metodą elektroforezy natywnej opłaszyc SDS-em bezpośrednio w żelu (przed transferem) poprzez jego inkubację w roztworze zawierającym ten związek. W efekcie przeprowadzonych doświadczeń określono, że optymalna temperatura wiązania SDS z cząsteczkami białek wydzielniczych larw *H. bovis* wynosi ok. 70°C. Stwierdzono, że inkubacja żelu uzyskanego po elektroforezie natywnej w roztworze SDS w takiej temperaturze nie wpływa deformująco na ten żel, a skuteczność transferu rozdzielonych białek na membranę nitrocelulozową znacznie wzrasta. W wyniku analizy densytometrycznej odczynu WB (przeprowadzonego z surowicami królików immunizowanych enzymami trawiennymi larw *H. bovis*) stwierdzono, że tak opracowana metoda charakteryzuje się niskimi błędami powtarzalności (CV% < 10%).

## **Wpływ aktywności enzymatycznej białek zawartych w antygenie *Hypoderma bovis* na jego immunogenność**

### **Influence of enzymatic activity of *Hypoderma bovis* crude antigen proteins on the immunogenicity of the antigen**

**Tomasz Cencek**

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; E-mail: tcencek@piwet.pulawy.pl

Głównym celem podjętych badań było określenie zależności pomiędzy aktywnością proteolityczną enzymów trawiennych larw pierwszego stadium gźów bydłęcych *Hypoderma bovis* (i związanymi z tym ich właściwościami immunosupresyjnymi) a ich zdolnością wywoływania swoistej odpowiedzi humoralnej u immunizowanych zwierząt. Antygen będący przedmiotem badań, zawierający te enzymy, otrzymano z larw L<sub>1</sub> *H. bovis* izolowanych z kanałów kręgowych młodego bydła ubijanego w rzeźni. Poprzez inaktywację PMSF uzyskano antygen zawierający białka o zredukowanej o ok. 90% aktywności enzymatycznej (antygen N). Metodami elektroforetycznymi porównano właściwości tego antygeny z antygenem zawierającym białka aktywne enzymatycznie (antygen A). Wykazano, że antygeny N i A nie różniły się składem białkowym ani właściwościami antygenowymi. Badania nad immunogennością antygeny N i A przeprowadzono na królikach białych nowozelandzkich. Do immunizacji królików zastosowano antygen A oraz inaktywowany antygen N. Stwierdzono szybsze pojawianie się swoistych przeciwciał i wyższe miana u królików immunizowanych antygenem N. Różnice pomiędzy grupami były wysoce istotne statystycznie. Stwierdzono również, że surowice królików immunizowanych antygenem *H. bovis* wpływają neutralizująco na aktywność enzymatyczną proteaz zawartych w tym antygenie. Silniejsze działanie neutralizujące wykazały surowice uzyskane od królików immunizowanych antygenem N. W przeprowadzonej pracy wykazano, że pozbawienie właściwości proteolitycznych i immunosupresyjnych białek wchodzących w skład antygeny *H. bovis*, znacznie zwiększa immunogenność tego antygeny, co powinno być uwzględniane przy konstrukcji ewentualnych szczepionek.

## ***Heligmosomoides polygyrus* zmienia poziom apoptozy i odpowiedź limfocytów *in vitro***

## ***Heligmosomoides polygyrus* affects lymphocytes response and apoptosis *in vitro***

**Katarzyna Donskow-Schmelter<sup>1</sup>, Justyna Rzepecka<sup>1</sup>, Nadzieja Drela<sup>2</sup>  
i Maria Doligalska<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Zakład Parazytologii i <sup>2</sup>Zakład Immunologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; E-mail: mdolig@biol.uw.edu.pl

Modyfikacja przebiegu odpowiedzi immunologicznej przez pasożyty uważana jest za jeden z mechanizmów adaptacyjnych umożliwiających zasiedlenie żywiciela. Wzbudzany stan immunosupresji lub aktywnej tolerancji przedłużają czas przeżycia pasożyta w żywicielu. Badanie mechanizmów immunosupresji wywołanej przez pasożyty ma duże znaczenie dla poznania reakcji hamujących proces zapalny. Jednym z mechanizmów wpływających na poziom odpowiedzi immunologicznej jest regulacja apoptozy różnych populacji komórek. Skład i aktywacja komórek mogą być regulowane przez czynniki pochodzenia pasożytniczego.

Podczas pierwotnego zarażenia myszy BALB/c nicieniem jelitowym *H. polygyrus* następuje obniżenie odpowiedzi immunologicznej. Badano, czy zmiany poziomu cytokin i proliferacji limfocytów krezkowych węzłów chłonnych korelują z dynamiką apoptozy tych komórek oraz z poziomem tlenu azotu wydzielanego przez makrofagi stymulowane IFN- $\gamma$  podczas zarażenia myszy tym nicieniem. Tlenek azotu jest jednym z czynników bezpośrednio wywołujących apoptozę, a jego produkcja jest hamowana w fazie enteralnej inwazji.

Po aktywacji limfocytów *in vitro* antygenem wydalniczo-wydzielniczym nicienia stwierdzono zahamowanie apoptozy, krótkotrwale wzmożoną proliferację i przejściowy wzrost produkcji IL-2, IL-4, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , i IL-10. Najwięcej komórek podlegało apoptozie w okresie zwiększonej produkcji tlenu azotu i adaptacji larw inwazyjnych w fazie histotropowej inwazji. Hamowanie produkcji cytokin, zmniejszenie poziomu apoptozy i proliferacji oznaczają osiągnięcie przez komórki stanu anergii lub obniżonej reaktywności wzbudzonej przez antygeny pasożyta. Wzrost produkcji IL-6, TGF- $\beta$ 1 i MCP-1 następuje w okresie przywracania kontrolnego poziomu apoptozy i ponownie obniżonej proliferacji komórek w fazie enteralnej inwazji. Poprzez synchronizację produkcji cytokin i apoptozę komórek *H. polygyrus* reguluje poziom odpowiedzi immunologicznej u myszy BALB/c.

## Apoptosis induction in rat hepatocytes after treatment with *Fasciola hepatica* somatic proteins

Agnieszka Gajewska<sup>1</sup>, Katarzyna Smaga-Kozłowska<sup>2</sup>, Luiza Jedlina-Panasiuk<sup>2</sup> and Grzegorz Kotomski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Parazytologii i Inwazyjologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

<sup>2</sup>Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

An induction of apoptosis in livers of *Fasciola hepatica* infected rats has not been investigated so far. In the present study alterations in nuclei of hepatocytes exposed to parasite somatic protein fractions (TBS and SDS extracts at concentration 0.4 and 1 mg/ml for 2, 24, 48 and 72 hrs) were measured using fluorescent microscopy (DAPI) and flow cytometry techniques (kit APO-Brdu). A quantitative analysis of apoptotic cells population was also carried out.

It was found that both the concentration and longevity of somatic proteins action have significant influence on apoptotic cells percentage. The higher concentration and longer time of incubation, the higher percentage of apoptotic cells was observed (after 72 hrs of TBS and SDS exposure 40%). Morphological changes such as cell shrinkage and DNA condensation were observed from 48<sup>th</sup> hour of exposure to somatic proteins.

In conclusion, results of the present *in vitro* study showed that the induction of apoptosis in hepatocytes exposed to liver fluke somatic proteins fractions occurs. It is proposed that appearance of apoptotic cells in hepatocytes population is due to the action of reactive oxygen species which are known to be inducers of programmed cell death (PCD).

## Chimeric Dr fimbriae as a vaccine against *Toxoplasma gondii* infection

Justyna Gatkowska<sup>1</sup>, Artur Gaşior<sup>2</sup>, Józef Kur<sup>2</sup> and Henryka Długońska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunoparazytologii, Uniwersytet Łódzki; E-mail: gatjus@biol.uni.lodz.pl

<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii, Politechnika Gdańska

The *Toxoplasma gondii* infection, usually asymptomatic in immunocompetent hosts may endanger life of immunodeficient individuals like AIDS patients, transplant recipients or fetuses infected *in utero*. Both primary invasion and reactivation of chronic toxoplasmosis may prove serious. That is why the need of effective vaccine inducing strong, long-lasting protection against fetal infection and reactivation in immunocompromised humans is understood. Such a vaccine would also limit economical losses due to abortion in farm animals.

The aim of this study was to test the immunogenic and immunoprotective activity of *E. coli* Dr chimeric fimbriae bearing selected antigenic epitopes of three *T. gondii* antigens (SAG1, GRA1 and MAG1), on murine experimental model. For comparative analysis recombinant antigens produced in *E. coli* expression system (SAG1, GRA1 and MAG1) and polyvalent native antigen (TLA, Toxoplasma Lysate Antigen) were used.

Obtained results revealed high protective efficacy of vaccine composed of recombinant antigens, whereas chimeric Dr fimbriae proved non-protective. Immunization with recombinant antigens induced strong specific humoral response and prevented the *T. gondii* DX brain cysts formation by 89%. This promising results need further study and confirmation on other experimental models and farm animals.



## **Studies on the immunological response of sheep vaccinated intranasally with cysteine protease (CPFhW) of *Fasciola hepatica* in the form of inclusion bodies and challenged with fluke metacercariae**

**Luiza Jedlina-Panasiuk<sup>1</sup>, Monika Kozak-Cięszczyk<sup>1</sup>, Marcin Kaliniak<sup>1</sup>, Małgorzata Kęsik<sup>2</sup>, Andrzej Płucienniczak<sup>2</sup> and Halina Wędrychowicz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>W. Stefański Institute of Parasitology, PAS, Twarda 51/55, 00-818 Warszawa, Poland; E-mail: luiza@twarda.pan.pl

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology and Antibiotics, Department of Bioengineering, Staroscińska 5, 02-516 Warszawa, Poland

The liver fluke *Fasciola hepatica* infects humans and farm animals worldwide. Sheep are very sensitive to *F. hepatica* infections and may die if grazed in fluke areas in the absence of control programmes.

Our previous studies, have shown that a recombinant cysteine protease (CPFhW) of *Fasciola hepatica* administered orally in the form of inclusion bodies confers significant protection against parasite challenge in rats. In the present experiment we investigated the ability of CPFhW delivered intranasally to induce a T cell (CD4+, CD 8+, CD 2+) response in the peripheral blood of sheep against subsequent challenge with *F. hepatica* metacercariae. Three-month-old male and female Corriedale sheep were assigned into four groups (two male and two female groups). One male and one female group of lambs were vaccinated intranasally, in four week intervals, with two doses of CPFhW in the form of inclusion bodies. A month after the second dose of the antigen, all groups of lambs were infected with 250 metacercariae per animal. During the subsequent 12 weeks after the challenge infection, blood leukocyte responses were measured in vaccinated and control lambs using flow cytometry. The vaccinated lambs showed significantly higher responses of CD2+, CD4+ and CD8+ cells than the challenge controls, with a peak at the second week post infection. The post challenge neutrophil and eosinophil levels were also higher in the blood of vaccinated sheep than in non-vaccinated but infected controls.

The results obtained so far suggest that intranasal immunization with CPFhW in the form of inclusion bodies may induce a significant cellular response in the peripheral blood of vaccinated sheep. However, these assumptions must be further investigated.

## ***Acanthamoeba* spp. u pacjentów z niedoborami immunologicznymi**

### ***Acanthamoeba* spp. in immunocompromised patients**

**Natalia Łanocha<sup>1</sup>, Wanda Kuźna-Grygiel<sup>1</sup>, Ewa Marzec-Lewenstein<sup>2</sup>  
i Tomasz Ociepa<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorska Akademia Medyczna; E-mail: nlanocha@o2.pl

<sup>2</sup>Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii, Pomorska Akademia Medyczna

<sup>3</sup>Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Pomorska Akademia Medyczna

W kwietniu 2007 r. z bronchoaspiratu dwóch pacjentów leczonych w Pomorskiej Akademii Medycznej z rozpoznaniem zapalenia płuc wyizolowano pełzaki. Na podstawie cech morfologicznych trofozoitów i cyst pierwotniaki zaklasyfikowano do rodzaju *Acanthamoeba*.

Jednym z pacjentów był mężczyzna w wieku 53 lat, który trafił do Kliniki Anestezjologii i Intensywnej Terapii z ostrym wstrząsem septycznym z powodu zapalenia otrzewnej. Pacjent znajdował się w kryzie blastycznej ostrej białaczki szpikowej. Badania mikrobiologiczne wykazały zakażenie bakteryjne i grzybami *Aspergillus* krwi i dróg oddechowych. Ponieważ w mikroskopowym badaniu parazytologicznym bronchoaspiratu stwierdzono obecność amebopodobnych komórek, z części materiału założono hodowle na podłożu NN Agar. Po upływie 72 godzin obserwowano na powierzchni podłoża liczne pełzaki *Acanthamoeba*. Z uwagi na wykrycie ameb do leczenia pacjenta włączono metronidazol. Po dwóch tygodniach hospitalizacji chory zmarł. Z fragmentów płuc, mózgu, nerek i wątroby pobranych podczas sekcji nie wyhodowano pełzaków.

Drugim pacjentem był 15-letni chłopiec z ostrą białaczką mieloblastyczną, po allogenicznym przeszczepie szpiku, leczony na zapalenie płuc. W hodowli założonej z bronchoaspiratu stwierdzono obecność ameb z rodzaju *Acanthamoeba*. Po zastosowaniu antybiotykoterapii objawy zapalenia płuc ustąpiły. Wynik posiewu kontrolnego był negatywny. Pacjent został wypisany z oddziału.

**Wniosek.** Celowe jest badanie w kierunku akantamebozy u pacjentów z immunosupresją, a zwłaszcza z rozpoznaniem zapalenia płuc.

## Wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej u chorych zarażonych *Giardia intestinalis*

### Chosen indices of immune response in patients infected with *Giardia intestinalis*

**Joanna Matowicka-Karna, Violetta Dymicka-Piekarska i Halina Kemon**

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku; E-mail: matowic@amb.edu.pl

Inwazje pasożytnicze są dla ustroju źródłem obcych antygenów oraz egzotoksyn, które wywołują miejscowy lub ogólnoustrojowy proces zapalny. Głównym mechanizmem obrony p/pasożytniczej jest cytotoxiczność komórkowa zależna od przeciwciał, w której komórkami efektorowymi są eozynofile. W przypadku odporności p/pasożytniczej zależnej od przeciwciał można wyróżnić kilka mechanizmów, które powodują blokadę receptora na powierzchni pasożyta, wywołują bezpośrednie uszkodzenie pasożyta poprzez aktywację układu dopełniacza, czy też zwiększają produkcję IgE. Celem podjętych badań była odpowiedź na pytanie: czy zarażenie pasożytem *G. intestinalis* wpływa na wskaźniki immunizacji oraz czy zastosowane leczenie przeciwpasożytnicze zmienia badane parametry?

Badaniami objęto 90 chorych (w wieku 18–72 lata) zarażonych *Giardia intestinalis* (58 kobiet i 32 mężczyzn). Rozpoznanie giardiozy ustalano w oparciu o obraz kliniczny, badanie parazytologiczne kału, oznaczanie swoistego białka GSA-65 oraz na podstawie badania mikroskopowego treści dwunastniczej. Krew do badań pobierano przed rozpoczęciem leczenia (G1), po dwóch tygodniach od zakończeniu leczenia p/pasożytniczego (grupa G2) oraz po 2 miesiącach od zakończenia leczenia (grupa G3). Grupę kontrolną (K) stanowiło 40 zdrowych osób (w wieku 20–45 lat), (22 kobiety i 18 mężczyzn). Wykonano oznaczenia stężenia całkowitego IgE, IL-5, IL-6 i IFN- $\gamma$ . Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski :

(1) Wzrost stężenia IgE, IL-5, IL-6 i IFN- $\gamma$  w przebiegu giardiozy świadczy o znacznej immunizacji organizmu żywiciela.

(2) Przeprowadzone leczenie przeciwpasożytnicze w giardiozie znamienne statystycznie obniża stężenia IL-5 i IL-6.

## ***Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats in an urban area**

**Mirosław M. Michalski, Aleksandra Platt-Samoraj<sup>1</sup> and Elżbieta Mikulska-Skupień<sup>1</sup>**

Division of Parasitology and Invasive Diseases

<sup>1</sup>Division of Epizootiology with Clinic of Infectious Diseases, UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

The invasion by the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*, is widely prevalent in humans and animals throughout the world. Infected meat, organs and tissues of different animal species are basic sources of infection in cats. The aim of the investigation was to determine the prevalence of *Toxoplasma gondii* in a population of domestic cats in an urban area of Olsztyn.

A total of 135 serum samples were examined. Examinations of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies were performed by an indirect agglutination test using the Toxo-Screen DA BioMerieux commercial test. Serum samples were examined at two dilutions: 1:40 and 1:4000, and reading was performed twice, after 5 and 18 hours. Among cat serum samples collected in 2003, 70.6% of seropositive results and almost 24% of negative results were recorded at a 1:40 dilution. At a dilution of 1:4000 the proportions of seropositive and seronegative samples were 58.8% and over 35%, respectively. Among the cats examined in 2004, percentage of seropositive results was lower at a 1:40 dilution (65.2%) and higher (69.5%) at a 1:4000 dilution, compared with the previous year. The results of two-year studies show that cats bred under different conditions (nourishment and care differentiation) in the city of Olsztyn have contact with different forms of invasive *T. gondii*. The high percentage of seropositive results at a 1:40 dilution (65.9%) suggests a past invasion, and the high percentage of seropositive cases at a 1:4000 dilution (68.1%) indicates a current or recent toxoplasmosis process. This suggests that there is a permanent source of *T. gondii* invasion in the living environment of the cats. Due to the lack of accurate data about the living conditions and nourishment of the cats examined in the study, it would be difficult to state that the only pathway of parasite transmission was infected meat.

## Wpływ lipopolisacharydów na apoptozę i nekrozę limfocytów w przebiegu inwazji *Trichinella spiralis* u myszy

## Effect of lipopolysaccharide on the lymphocytes apoptosis and necrosis in *Trichinella spiralis* infected mice

Jolanta Piekarska, Marianna Szczypka<sup>1</sup> i Bożena Obmińska-Mrukowicz<sup>1</sup>

Katedra Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Chorób Koni, Psów i Kotów, Zakład Parazytologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Pl. Grunwaldzki 47

<sup>1</sup>Katedra Biochemii, Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 31; E-mail: jola@ozi.ar.wroc.pl

Immunomodulujące właściwości lipopolisacharydów (LPS) wykorzystano w celu określenia poziomu limfocytów apoptotycznych i nekrotycznych w śledzionie, węzłach chłonnych krezkowych oraz w naciekach mięśniowych myszy zarażonych larwami *T. spiralis*. Badania przeprowadzono na 142 myszach (CFW), które podzielono na 3 grupy: I — zwierzęta zarażone *per os* 200 larwami *T. spiralis*, II — myszy, którym podano LPS (Lipopolisacharydy *E. coli* 055:B5, Sigma), 25µg/mysz, jednorazowo, dożylnie, 24 godz. przed zarażeniem *T. spiralis*, oraz grupa III — kontrolna dla podawanych LPS. Limfocyty uzyskane z badanych narządów w 7, 14, 21, 28, 35, 42 i 60 dniu po zarażeniu (dpz) inkubowano z Annexin-V-Fluos Staining Kit (Roche Diagnostic). Reakcję odczytywano w cytometrze przepływowym FACS Calibur (Becton Dickinson).

W grupie I najwięcej komórek apoptotycznych stwierdzono w 7 dpz w śledzionie (33,7%) i w węzłach chłonnych krezkowych (34,5%) oraz w 14 dpz wśród komórek nacieku mięśniowego (28,2%). Najwyższy poziom limfocytów nekrotycznych zanotowano: w 7 dpz w śledzionie (25,3%), w 28 dpz w węzłach chłonnych krezkowych (6,8%), oraz w 21 dpz w mięśniach (6,2%). W grupie II wzrost liczby limfocytów apoptotycznych, wystąpił w śledzionie we wszystkich terminach badań, (najwyższy ich odsetek notowano w 28 dpz — 43,1%). W węzłach chłonnych krezkowych w 7 dpz obserwowano obniżenie apoptozy (17,2%), a jej wzrost wystąpił w 28 dpz (23,7%), podobnie jak w mięśniowych naciekach zapalnych (38,5%). Natomiast najwięcej limfocytów nekrotycznych zanotowano: w 14 dpz w śledzionie (1,4%), w 7 dpz w węzłach chłonnych krezkowych (1,6 %) oraz w 21 dpz w naciekach mięśniowym (6,7%). U zwierząt zdrowych, poziom limfocytów apoptotycznych dochodził w śledzionie do 22%, w węzłach chłonnych krezkowych — 20,6%, a mięśniach — 2%. Limfocytów nekrotycznych w śledzionie notowano średnio 0,7%, w węzłach chłonnych krezkowych 0,5%, a w mięśniach 0,8%. Średnia liczba larw mięśniowych obliczona w 60 dpz wynosiła 23 530 (± 4 748,0) w grupie I i 22 4500 (± 4365,0) w grupie II (otrzymującej LPS).

Badania wykazały, że podawany LPS u zwierząt zarażonych *T. spiralis* zwiększa odsetek limfocytów apoptotycznych w śledzionie, obniżając jednocześnie odsetek komórek nekrotycznych zarówno w śledzionie jak i w węzłach chłonnych krezkowych. Natomiast wśród limfocytów mięśniowych nacieków zapalnych wywołuje wzrost nekrozy we wszystkich terminach badań.

## Przypadkowe stwierdzenie *Trypanosoma theileri* w hodowli *in vitro* limfocytów jałówki

### Accidental detection of *Trypanosoma theileri* in cattle lymphocyte cultures *in vitro* isolates from heifer

Z. Sołtysiak, M. Gorczykowski, M. Pawlas-Opiela, A. Chelmońska-Soyta\*  
i W. Nowacji\*

Zakład Parazytologii Katedry Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Klinika Chorób Koni, Psów i Kotów, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C. Norwida 31, 50-375 Wrocław; E-mail zenon@ozi.ar.wroc.pl

\*Zakład Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej Katedry i Kliniki Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy i Ochrony Zdrowia Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C. Norwida 31, 50-375 Wrocław

#### Wstęp

Jedynym znanym przedstawicielem rodzaju *Trypanosoma*, występującym w krwi bydła Europy Środkowej jest *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902. Jego wektorami mogą być owady z rodzaju *Haematopota*, *Hybomitra* i *Tabanus*, kleszcze *Hyalomma anatolicum*. W Europie izolacje *T. theileri* od bydła opisano m. in. w: Belgii, Niemczech, Francji, Włoszech, Anglii i Szkocji. Obecność *T. theileri* w Polsce stwierdzili jedynie Demiaszkiewicz i Lachowicz.

#### Material i metody

W czasie badań prowadzonych w Zakładzie Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej dotyczących wpływu interferonu-tau (IFN-tau) na stymulowane mitogenami komórki mononuklearne w hodowli *in vitro* przypadkowo stwierdzono kontaminację prób pierwotniakami, które później zdiagnozowano jako *T. theileri*. Krew pobrano od 6 klinicznie zdrowych jałówek w wieku 6-7 miesięcy z podwrocławskiego gospodarstwa specjalizującego się w produkcji mlecznej. Do badań zastosowano klasyczną technikę izolacji limfocytów w gradiencie gęstości. W dniu zakładania hodowli od wszystkich badanych krów wykonano standardowe rozmazy z krwi pełnej do rutynowego badania hematologicznego.

#### Wyniki i omówienie

Po 72 godzinach w czasie kontroli hodowli w mikroskopie odwróconym u jednego osobnika w jednym dołku płytki mikrotitracyjnej (komórek traktowanych IFN-tau) stwierdzono obecność żywych i bardzo ruchliwych wiciowców. Po wykonaniu rozmazów i utrwaleniu w metanolu oraz wybarwieniu metodą May Grünwalda Giemsy na podstawie pomiarów morfometrycznych, pierwotniaki oznaczono jako *Trypanosoma theileri*.

## ***Cryptosporidium* infection and CD4 T-cell count in women infected with HIV-1**

**Maria Wesółowska<sup>1</sup>, Brygida Knysz<sup>2</sup>, Beata Szostakowska<sup>3</sup>, Andrzej Gładysz<sup>2</sup> and Jerzy Okulewicz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology and Medical Parasitology, Wrocław Medical University, Mikulicza-Radeckiego 9, 50-367 Wrocław, Poland; E-mail: wesol@biolog.am.wroc.pl

<sup>2</sup>Department of Infectious Diseases, Wrocław Medical University, Koszarowa 5, 51-149 Wrocław

<sup>3</sup>Department of Tropical Parasitology, Inter-Faculty Institute of Maritime and Tropical Medicine, Medical University of Gdansk, Powstania Styczniowego 9 B, 81-519 Gdynia

*Cryptosporidium* species are intracellular parasitic protozoans which infect the gastrointestinal, biliary and respiratory tract of wide range of vertebrates including mammals. In human they cause gastroenteritis and diarrhea that are self-limited in immunocompetent persons but potentially life threatening in immunocompromised individuals, especially those with AIDS.

The purpose of this study was to evaluate prevalence of infection with *Cryptosporidium* depending on the CD4 T-cell count in HIV-infected women. The study was conducted in the years 2002-2004. We examined 37 women (19-65 years old). In 11 (30%) diagnosis of AIDS was established from other reasons than cryptosporidiosis. Mean CD4 T-cell count were 403 cells/mm<sup>3</sup> (range 15-1474). Stool samples were examined by wet smears analyzing for the *Cryptosporidium*, by stained with modified Ziehl-Neelsen technique, enzyme immunoassay tests and the direct immunofluorescent detection procedure. Some of the specimens were analyzed by PCR technique.

Cryptosporidial infection was found in 7 (19%) women (26-44 years old) of the study populations; 3 of them were with previous AIDS diagnosis. The course of *Cryptosporidium* infection depends on the state of the human immunological system. In this group the number of CD4 T-cell was low, ranged 15-262 cells/mm<sup>3</sup> (mean 99). Only in 1 case CD4 T-cell was counted 440 cells/mm<sup>3</sup>.

In Europe, HIV infections through heterosexual contact are increase, and the rate of HIV-infected women rise steadily. Therefore, opportunistic parasites, such as *Cryptosporidium* sp. may be serious problem in this population in the future.