

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát dizertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Imunitní odpověď paratenického hostitele na infekci *Toxocara canis*, možné ovlivnění průběhu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy

Immune response of the paratenic host to *Toxocara canis* infection, possible influence on the course of experimental autoimmune encephalomyelitis

Jan Novák
Praha, 2022

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav imunologie a mikrobiologie 1.LF UK a VFN

Školitel: prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

ABSTRACT.....	iv
ABSTRAKT	iv
1. ÚVOD	1
1.1. Roztroušená skleróza.....	1
1.1.1. Charakteristika roztroušené sklerózy.....	1
1.1.2. Mechanismy vzniku roztroušené sklerózy.....	1
1.1.3. Role populací CD ⁺ T lymfocytů	2
1.1.4. Virové infekce, genetické predispozice, epigenetické faktory a vliv střevního mikrobiomu	2
1.1.5. Helminti jako imunomodulační terapie RS.....	3
1.2. Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE)	3
1.2.1. Model EAE	3
1.2.2. Imunologie EAE	3
1.2.3. Mechanismy imunoregulačního působení helmintů	4
1.2.4. Vliv helmintů na průběh EAE	4
1.3. <i>Toxocara canis</i>	4
1.3.1. Charakteristika, prevalence u psovitých šelem	4
1.3.2. Parateničtí hostitelé a globální séroprevalence v lidské populaci	5
1.3.3. Séroprevalence v populaci v ČR.....	5
1.3.4. Sérologická diagnostika <i>T. canis</i>	5
1.3.5. Důsledky infekce lidské populace, toxokaróza	6
1.3.6. Imunitní odpověď na infekci <i>T. canis</i> v CNS - neurotoxokaróza	6
2. CÍLE PRÁCE	7
3. MATERIÁL A METODY	7
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	8
5. ZÁVĚR	9
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	10
7. SEZNAM PUBLIKACÍ	18

ABSTRACT

The most complex interactions between host and infectious agent are generated during helminth infections, which represent a significant source of serious health problems worldwide. Because many helminths migrate after entering the host, these infections are characterized by the gradual development of a range of clinical symptoms. The published studies show that, on the one hand, the immune response is stimulated in order to eliminate the parasite, but on the other hand, helminths possess a number of mechanisms that may lead to immune modulation and thus ensure their long-term survival in the host. An indirect consequence of such a situation may then be an amelioration of the symptoms of autoimmune diseases. Therefore, in order to contribute to the elucidation of the course of the immune response of the paratenic host to one of the most common infections caused by *Toxocara canis*, we also studied the effect of infection on experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis.

Although *T. canis* is a parasite of canids, it often infects a variety of paratenic hosts, including humans. In these hosts, the larvae survive in various tissues at the L3 larval stage, with a large proportion found in the brain. The pathogenesis of infection is the result of mechanical damage to the tissues and the action of excretory-secretory products of larvae. Our experiments in immunocompetent mice have shown that even a small number of larvae leads to a serologically significant response without pathological changes. However, after subsequent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis, we observed that infection with L3 *T. canis* larvae worsened the course of this model disease. Compared to the uninfected control group, we observed higher clinical symptom scores and higher weight loss in these mice. These negative effects were associated with significant increases in serum cytokine levels, probably as a consequence of dysfunctional regulation of the immune system. In the central nervous system, we found an increased percentage of CD4⁺ cells of non-Treg phenotype, suggesting infiltration of additional CD4⁺ cell populations, which are probably responsible for the worsening course of experimental autoimmune encephalomyelitis in infected mice.

Larval toxocariasis is one of the most globally important tissue parasitoses. Older data from the Czech Republic indicate that almost one out of every five individuals has encountered the infection. These studies indicate seroprevalence levels of 18.4% (1998) and 19% (2006). We found a decrease in this value to 3.6% (2020). We suppose that the reduction in seroprevalence might be associated with increased public hygiene and use of anthelmintics in dogs. The majority of the existing tests for the detection of *T. canis*-specific antibodies is limited by lower specificity because they are based on excretory-secretory antigens that cross-react with sera from patients infected with other helminths. In this part of the work, our goal was to identify recombinant excretory-secretory antigens for the detection of *T. canis*-specific antibodies. The use of these alternative recombinant antigens illustrated their possible diagnostic potential as well as differences in the reactivity of mice and human sera.

ABSTRAKT

K nejsložitějším interakcím mezi hostitelem a infekčním agens dochází v průběhu infekcí vyvolaných helminty, kteří představují celosvětově významný zdroj závažných zdravotních problémů. Vzhledem k tomu, že řada helmintů po průniku do hostitele migruje, je pro tyto infekce typický postupný rozvoj různých klinických obtíží. Z literárních údajů vyplývá, že na jedné straně sice dochází ke stimulaci imunitní reakce s cílem zlikvidovat parazita, na druhé straně ale helminti disponují řadou mechanismů, které mohou vést k modulaci imunity, a zajistit tak jejich dlouhodobé přežívání v hostiteli. Nepřímým důsledkem takové situace pak může být zlepšení projevů autoimunitních onemocnění. S cílem přispět k objasnění průběhu imunitní odpovědi paratenického hostitele na jednu z nejčastějších infekcí vyvolanou *Toxocara canis* jsme se proto zabývali i vlivem infekce na experimentální autoimunitní encefalomyelitidu, která je modelem pro studium roztroušené sklerózy.

Přestože je *T. canis* parazitem psovitých šelem, infikuje často celou řadu paratenických hostitelů včetně člověka. V těchto hostitelích hlístice přežívají v různých tkáních ve stadiu L3 larev, přičemž velká část se nalézá v mozku. Patogeneze infekce je výsledkem mechanického poškození tkání a působením exkrečně-sekrecních produktů larev. Naše experimenty na imunokompetentních myších ukázaly, že již malé množství larev sice vede k sérologicky významné odpovědi, která však není doprovázena závažnými patologickými změnami. Po následném navození experimentální autoimunitní encefalomyelitidy jsme ale zaznamenali, že infekce larvami L3 *T. canis* zhoršila průběh tohoto modelového onemocnění. V porovnání s kontrolní neinfikovanou skupinou jsme u těchto myší zaznamenali horší skóre klinických příznaků a vyšší úbytek hmotnosti. Tyto negativní efekty byly spojeny s velkým zvýšením hladin sérových cytokinů, pravděpodobně jako důsledek nefunkční regulace imunitního systému. V centrální nervové soustavě jsme zjistili zvýšené procento CD4⁺ buněk non-Treg fenotypu, což naznačuje infiltraci dalších populací CD4⁺ buněk, pravděpodobně zodpovědných za zhoršení průběhu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy infikovaných myší.

Larvální toxokaróza je řazena mezi globálně nejvýznamnější tkáňové parazitózy. Starší údaje z České republiky uvádějí, že zhruba každý pátý jedinec se s infekcí setkal. Tyto studie uvádějí hodnoty séroprevalence 18,4% (rok 1998) a 19% (rok 2006). V porovnání s nimi jsme zjistili snížení této hodnoty na 3,6% (2020). Domníváme se, že ke snížení séroprevalence došlo zřejmě v souvislosti se zvýšenou hygienou obyvatelstva a používáním anthelmintik u psů. Většina současných testů k průkazu *T. canis*-specifických protilátek je zatížena nižší specificitou, protože jejím základem jsou exkrečně-sekrecní antigeny, které vykazují křížovou reaktivitu se séry pacientů infikovaných jinými helminty. V této části práce byla naším cílem identifikace rekombinantních exkrečně-sekrecních antigenů pro detekci *T. canis*-specifických protilátek. Použití těchto alternativních rekombinantních antigenů ukázalo jejich možný diagnostický potenciál a zároveň i rozdíly v reaktivitě myších a lidských sér.

1. ÚVOD

1.1. Roztroušená skleróza

1.1.1. Charakteristika roztroušené sklerózy

Roztroušená skleróza (RS) patří k nejčastějším autoimunitním onemocněním (AI) centrálního nervového systému (CNS). Celkový odhadovaný počet pacientů je 2,8 milionu s frekvencí 35,9 pacientů na 100.000 obyvatel. Vyšší výskyt onemocnění je spojen s narůstající zeměpisnou šířkou (Koch-Henriksen & Sorensen, 2010; Sabel *et al.*, 2021) a odlišnou vnímavostí populací, přičemž nejvyšší výskyt je v indoevropské populaci. Dalším rizikovým faktorem je kouření a socioekonomické faktory spojené s vyšší úrovní hygieny a sanitace související s nižším výskytem infekčních onemocnění včetně nižšího výskytu helmintů (Correale & Gaitan, 2015). I přes velké pokroky v léčbě je toto invalidizující onemocnění závažným zdravotním i sociálním problémem (Walton *et al.*, 2020). Onemocnění je charakterizováno demyelinizací axonů a vznikem zánětlivých ložisek v bílé hmotě mozkové a míše. Konečná diagnóza se opírá o průkaz těchto ložisek magnetickou rezonancí (MRI).

1.1.2. Mechanismy vzniku roztroušené sklerózy

Pro pochopení mechanismů vedoucích ke vzniku RS je nutné detailní porozumění interakcím a komunikaci periferního imunitního systému a CNS. Dnes častěji používané označení „imunologicky unikátní“ CNS (Louveau *et al.*, 2015), namísto používaného „imunoprivilegovaného“ postavení CNS, není negací původního konceptu, ale rozšiřuje ho o poznatky o komunikačních kanálech pro vstup a výstup solubilních a buněčných komponent mezi periferními složkami imunitního systému a CNS. Existuje řada mechanismů, které umožňují překonat anatomické bariéry: (a) Solubilní antigeny z CNS mohou být prostřednictvím CSF transportovány přes cribriformní pláty do hlubokých krčních lymfatických uzlin, kde mohou být prezentovány naivním T lymfocytům, (b) hematoencefalická bariéra je zřejmě obecně propustnější pro molekuly malé velikosti (Lao *et al.*, 2019; Pardridge, 2009; Sharif *et al.*, 2018), (c) i za běžných fyziologických podmínek mohou v omezené míře procházet buňky imunitního systému do CNS a zpět do periferie, tento proces je pak akcelerován při fyzikálním poškození/poranění (Erickson & Banks, 2022; Kivisakk *et al.*, 2003; Ransohoff & Engelhardt, 2012; Shechter *et al.*, 2013). Prostupnost hematoencefalické bariéry mezi krevním řečištěm a CSF je ovlivněna i infekčními agens, ale také doznává změn díky stárnutí organismu (Erickson & Banks, 2019).

Na vzniku a rozvoji RS se podílí řada faktorů. Kromě genetických predispozic, častějšího výskytu u žen, stanovení diagnózy typicky mezi 20.—40. rokem věku, etnicity (Lu *et al.*, 2022) a dalších, hrají významnou úlohu i externí faktory včetně mikrobiálních infekcí. Prvním impulzem je aktivace a klonální expanze autoreaktivních Th1 a Th17 lymfocytů. Tato aktivace, jejíž příčinou je sekvenční analogie či lépe „podobnost antigenu pro imunitní systém“, je základem fenoménu molekulárního mimikry (Croxford *et al.*, 2005; Harkiolaki *et al.*, 2009), kdy je proliferace myelin-autoreaktivních buněk spuštěna např. cizorodým proteinem viru během virové infekce. Stejně tak může dojít k nespecifické aktivaci autoreaktivních Th1 a Th17 buněk, tzv. „bystander“ efektem (Dendrou *et al.*, 2015; Vanderlugt & Miller, 2002). Ve všech těchto případech pak dochází k migraci autoreaktivních buněk do CNS, a produkci prozánětlivých cytokinů. Výsledkem je infiltrace a následná vzájemná interakce dalších buněk IS se všemi patologickými důsledky. Společným působením všech komponent dochází k degradaci myelinu, poškození neuronů i oligodendrocytů a kaskádovému opakování celého procesu. Svou roli hraje pravděpodobně i

fenomén „rozšiřování epitopů“ („epitope spreading“). Následkem tohoto procesu je rozšiřování antigenní specifity efektorových buněk na další oblasti v rámci jednoho proteinu, ale pravděpodobně zahrnuje i epitopy dalších myelinových proteinů (Katz-Levy *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2001; Vanderlugt & Miller, 2002).

1.1.3. Role populací CD⁺ T lymfocytů

Zatímco CD4⁺ Th1 a Th17 linie indukované cytokiny a chemokiny, které jsou produkovány prozánětlivými makrofágy (M1) a mikroglie, jsou jednoznačně asociovány s patogenezi RS, vliv Th2 buněk není dosud zcela objasněn. Produkci vlastních cytokinů a dalších faktorů se Th2 buňky zřejmě podílejí na reparačních a imunoregulačních procesech v CNS (Chu *et al.*, 2018; Sasaki, 2017) a spolupůsobí jako negativní regulátor Th1 a Th17 linií. Makrofágy M2 také blokují indukovatelnou syntázu oxidu dusnatého (iNOS), čímž dále zmírňují zánět, podporují angiogenezi a remodelaci tkání (Banerjee *et al.*, 2013; Chu *et al.*, 2018). Vedle již zmíněné role Th1 a Th2 hrají klíčovou úlohu v regulaci této rovnováhy, a tím v rozvoji RS nebo její remisi, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulační buňky (Treg) (Sakaguchi *et al.*, 2011). Treg mají řadu funkcí v regulacích prozánětlivých procesů u řady autoimunitních onemocnění včetně RS (Kleinewietfeld & Hafler, 2014).

1.1.4. Virové infekce, genetické predispozice, epigenetické faktory a vliv střevního mikrobiomu

Velký význam při vzniku RS se přikládá virovým infekcím, zejména infekcím lidskými herpetickými viry a retroviry, zvláště pak virem Epsteinova a Barrové (EBV) a lidským herpesvirem 6 (HHV-6) (Ferreira, 2010; Marrodan *et al.*, 2019; Salehi *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2022). Klíčovou roli má velmi pravděpodobně primoinfekce EBV v dospělosti. Tuto teorii potvrzuje i nízký výskyt RS u lidí s negativním sérologickým nálezem EBV (Belbasis *et al.*, 2020; Bjornevik *et al.*, 2022). Uvádí se, že tímto virem je promožena většina populace (>90%). Zdá se, že primoinfekce obvykle proběhne v dětství s minimálními příznaky, přičemž dospělá populace je již většinou séropozitivní. Infekce séronegativních dospělých je pak spojena se zvýšeným rizikem RS (Bjornevik *et al.*, 2022; Winter *et al.*, 2020).

Mezi důležité faktory podílející se na modifikaci rovnováhy vzájemných vztahů mezi vnějšími a vnitřními rizikovými faktory a následným zvýšeným rizikem RS patří řada genetických predispozic. K nejdůležitějším patří asociace RS s HLA haplotypem HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB5*0101 a HLA-A*03:01 (Batoulis *et al.*, 2011; Friese *et al.*, 2008; Gregersen *et al.*, 2006). Naproti tomu se zdá, že haplotyp HLA-A*02:01 má spíše protektivní charakter (Batoulis *et al.*, 2011). Mimo lokusy MHC I a II existuje také řada genů, které negativně ovlivňují vznik a průběh RS. Mezi nejdůležitější patří geny pro IL-2 (Dendrou *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2014), pro receptory IL-17 (Gregory *et al.*, 2007; Lundmark *et al.*, 2007) a pro TNF- α (Patsopoulos *et al.*, 2013).

Vývoj RS je ovlivněn i epigenetickými faktory (Brooks *et al.*, 2010; Kucukali *et al.*, 2015). Svou roli sehrává i střevní mikrobiom ovlivňující patogenezi autoimunitních onemocnění včetně RS (Chen *et al.*, 2016). Pravděpodobným vysvětlením je, že omezený výskyt přirozených komensálů a zvýšený výskyt patobiontů ve střevním mikrobiomu, jedna z forem tzv. dysbiózy, může vést k prozánětlivé reakci, poškození epitelu a chronickému zánětu a vyústit v syndrom zvýšené propustnosti střev (Leaky gut syndrome). Mikrobiální a další antigeny se strukturální podobností vlastním autoantigenům, které se takto ve zvýšené míře translokují ze střeva, a stávají se tak dostupnými systémové imunitě, pak mohou být v zánětlivém prostředí spouštěčem

autoimunitních onemocnění včetně RS (Kinashi & Hase, 2021; Levy *et al.*, 2017; Weiss & Hennet, 2017).

1.1.5. Helminti jako imunomodulační terapie RS

V posledních letech byl zaznamenán výrazný úspěch v léčbě zejména relaps-remitentní RS. Pro progresivní formy onemocnění jsou ale terapeutické možnosti výrazně omezenější (Dargahi *et al.*, 2017; Hauser & Cree, 2020; Montalban *et al.*, 2017). Všechny terapie RS jsou založené na imunomodulaci a supresi autoimunity. Hledání dalších možností účinné a bezpečné léčby vedlo ke studiu využití helmintů v léčbě RS, vzhledem k jejich schopnostem modulovat imunitní systém hostitele (Elliott *et al.*, 2007; Elliott & Weinstock, 2009; Elliott & Weinstock, 2012; Weinstock & Elliott, 2009). Tyto úvahy byly ve shodě s hygienickou hypotézou (Strachan, 1989) a hypotézou starých přátel (Old Friends Hypothesis) (Bach, 2021; Rook *et al.*, 2004). Řada studií s lidskými dobrovolníky infikovanými helminty (HIT, helminth immunotherapy) prokázala zlepšení průběhu RS (Correale *et al.*, 2021; Maizels *et al.*, 2018). Testy na lidských dobrovolnících nebo přirozeně infikovaných jedincích narážejí ale jak na mnohá etická a legislativní omezení, tak i na omezené možnosti zobecnění z důvodů velikosti vzorků a dostupnosti vhodných kontrol (McSorley & Maizels, 2012).

1.2. Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE)

1.2.1. Model EAE

Možnosti výzkumu RS jsou výrazně rozšířeny použitím zvířecího modelu, konkrétně experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE), což je autoimunitní patologický stav CNS různých laboratorních zvířat charakterizovaný zánětlivým procesem s přítomností CD4⁺ Th1 a Th17 lymfocytů a mononukleárních buněk a následnou demyelinizací axonů a vzniku lézí. Následné neurologické a patologické změny jsou velmi podobné změnám pozorovaným u pacientů s RS. Pro vyvolání EAE je nejčastěji používán model aktivně indukované EAE (Bittner *et al.*, 2014; Krishnamoorthy & Wekerle, 2009; Stromnes & Goverman, 2006). Alternativní méně užívanou možností studia demyelinizačního procesu a EAE jsou infekce picornavirem Theilerovy myši encefalomyelitidy (Dalcanto *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1997; Njenga *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2003; Vanderlugt & Miller, 2002), Semliki forest virem (Mokhtarian *et al.*, 1999) a v omezené míře je také využíván virus myši hepatitidy (MHV, mouse hepatitis virus) (Biswas *et al.*, 2016; Lavi *et al.*, 1984). Demyelinizační procesy podobné EAE je možné vyvolat i aplikací řady chemikálií, mezi které patří cuprizon, lysolecithin a ethidium bromid. Tyto modely jsou užívány zejména pro detailní studium demyelinizačních a remyelinizačních mechanismů a možností jejich ovlivnění (Procaccini *et al.*, 2015). U experimentálních zvířat s aktivně indukovanou EAE dochází k postupnému ochrnutí začínajícímu na ocase a zadních končetinách, následně pak k celkové paralýze, inkontinenci a smrti (Miller *et al.*, 2007).

1.2.2. Imunologie EAE

Na vzniku a rozvoji EAE u myši C57BL/6J se podílejí Th1 buňky produkující IFN- γ a TNF- α (Abreu, 1982; Baron *et al.*, 1993; Bettelli *et al.*, 2004; Segal & Shevach, 1996; Sospedra & Martin, 2005). Dalším důležitým hráčem jsou pak Th17 buňky produkující IL-17 a TNF- α (Oppmann *et al.*, 2000). Na diferenciaci v Th17 buňky se významně podílí také IL-6 a TGF- β . Jak Th1, tak Th17 jsou klíčové pro vznik a rozvoj EAE, přičemž se zdá, že za závažnější průběh EAE je odpovědná populace Th17 (Jager *et al.*, 2009). Stejně jako u pacientů s RS, i u myši s EAE jsou pro regulaci zánětlivých procesů důležité Treg buňky (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) indukované

TGF- β . Kromě klasického vnímání diferenciace CD4⁺ Th buněk do Th subpopulací je třeba vzít v rámci regulace imunitní odpovědi v úvahu i určitou fenotypovou plasticitu CD4⁺ Th linií. Th17 mohou být za určitých podmínek konvertovány v Th1, event. mohou získat i určité vlastnosti Th2. Tento fenomén se netýká pouze Th17 populace, ale zřejmě i Treg a Th1 (Batoulis *et al.*, 2011; Murphy & Stockinger, 2010; Qiu *et al.*, 2020; Sakaguchi *et al.*, 2013).

1.2.3. Mechanismy imunoregulačního působení helmintů

Infekce helminty obvykle vede k řadě procesů, které mohou ovlivnit různými způsoby imunitní systém hostitele (Loukas *et al.*, 2021). Antigeny helmintů a ES imunomodulační komponenty mohou prostřednictvím DC indukovat diferenciaci směrem k Th2 a Treg liniím, což má za následek inhibici Th1 a Th17 polarizace. Indukované Treg produkují cytokiny IL-10 a TGF- β , kdy TGF- β zprostředkovává konverzi na M2 makrofágy a IL-10 indukuje u B buněk produkci IgG4. TGF- β (s přítomným IL-2) vede k další expanzi populace Treg. Výsledkem je navození tolerance. Jiným mechanismem regulace je působení molekul produkovaných helminty se strukturální a funkční podobností cytokinům. Příkladem je molekula imitující TGF- β (Hp-TGM) přítomná v ES produktech *Heligmosomoides polygyrus*, která aktivuje TGF- β signalizaci vazbou na TGF- β receptor s následnou expanzí Treg a navození tolerance (Johnston *et al.*, 2017) prostřednictvím potlačení Th2, produkce IL-13 a následně inhibice indukce M2 a produkce mucinu. Další ES komponenta *Heligmosomoides polygyrus*, označená jako alarmin release inhibitor (Hp-ARI) inhibuje produkci IL-33, a tím aktivaci přirozených lymfoidních buněk typu 2 (ILC2) a aktivaci M2. (Ryan *et al.*, 2020). Další možností je produkce inhibitorů cysteinových proteáz s protizánětlivým účinkem (Coronado *et al.*, 2019; Schierack *et al.*, 2003), kde je principem inhibice zpracování a prezentace antigenu, a také produkce proteinů podobajících se cytokinům a jejich receptorům a ovlivňujících jejich funkci (Bancroft *et al.*, 2019; Loukas *et al.*, 2021).

1.2.4. Vliv helmintů na průběh EAE

Imunomodulační potenciál helmintů a pozitivní vliv na autoimunitní a alergická onemocnění byl prokázán mnoha studiemi na laboratorních zvířatech (McSorley & Maizels, 2012). Výjimkou nebyla ani EAE, kde byl studován potenciál helmintů jako možná alternativa léčby RS. HIT by tak mohla představovat experimentální doplňující terapii ke stávající imunosupresivní léčbě (Dargahi *et al.*, 2017; Hauser *et al.*, 2021). V léčbě EAE byla dosud testována široká škála helmintů a jejich produktů. Naprostá většina studií ukázala na pozitivní účinek HIT, zejména v případě, kdy infekce nebo aplikace produktů helmintů předcházela indukci EAE, tedy jako profylaxe onemocnění. Pouze v jedné studii byl popsán negativní vliv na EAE, kdy podání rekombinantního galektinu 9 (rT1-gal) *Toxascaris leonina* inhibovalo remisi onemocnění (Bing *et al.*, 2015). Společnými rysy studií s pozitivním účinkem bylo zejména snížení periferní i CNS lokalizované exprese IFN- γ a IL-12, ale i IL-17, IL-6 a TNF- α . Naopak byly zjištěny zvýšené koncentrace a exprese IL-10 a TGF- β , ale i IL-4 a IL-5 (Charabati *et al.*, 2020).

1.3. *Toxocara canis*

1.3.1. Charakteristika, prevalence u psovitých šelem

Toxocara canis (Werner, 1782), (škrkavka psí), kmen *Nematoda*, řád *Ascarida* je světově široce rozšířený parazit psovitých šelem. Vajíčka se dostávají do prostředí s fekáliemi, po cca 2-5 týdnech v nich dojde k vývoji larvy stadia L3, která se po požití definitivním hostitelem v gastrointestinálním traktu uvolní a po penetraci střevní stěny migruje do plicní tkáně, posléze

do jícnu, po vykašlání je spolknuta a dokončuje svůj vývoj do dospělosti v tenkém střevě. U starších jedinců je část larev nalézána i v dalších tkáních v klidovém stadiu. Globální proměřenost psů je 11,1%, tzn. odhadem cca 100 miliónů infikovaných psů, kteří tak představují velký rezervoár tohoto parazita (Rostami *et al.*, 2020).

1.3.2. Parateničtí hostitelé a globální séroprevalence v lidské populaci

Kromě psovitých šelem může být infikována i řada dalších paratenických hostitelů (Strube *et al.*, 2013; Wu & Bowman, 2020), včetně člověka (Holland, 2017; Ma *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2020). Kromě savců (Dubinský *et al.*, 1995; Krucken *et al.*, 2017) mohou být infikováni i ptáci a bezobratlí (Cardillo *et al.*, 2016; Sasmal *et al.*, 2008). V těchto hostitelích *T. canis* nedokončí svůj vývoj, ale larvy po migraci zůstávají v klidovém stadiu v různých tkáních po dlouhou dobu (Glickman & Summers, 1983). Po pozření psovitými šelmami (nebo jinými paratenickými hostiteli) mohou být tito hostitelé dalším zdrojem infekce.

Většina infekcí člověka je způsobena neúmyslným pozřením zralých vajíček spolu s kontaminovanou potravou, vodou nebo půdou v důsledku špatné hygieny, u dětí pak i geofágií (Manini *et al.*, 2012). Předpokládá se, že je globálně infikováno 1,4 miliardy lidí a průměrná séroprevalence je 19% (Ma *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2020; Rostami *et al.*, 2019; Strube *et al.*, 2020a). Tento odhad řadí *T. canis* mezi původce jedné z nejčastějších parazitárních infekcí člověka, a to i v rozvinutých zemích. Největší výskyt (>80%) byl zaznamenán v tropických a subtropických oblastech. V Evropě je podle těchto analýz séroprevalence cca 11%. Velké rozdíly mezi jednotlivými zeměmi jsou vysvětlitelné zeměpisnými faktory a souvisejícími klimatickými podmínkami (Azam *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2020). Roli hrají i sociodemografické faktory (Antolová *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2018), veterinární péče (odčervování), úroveň hygieny a další faktory.

1.3.3. Séroprevalence v populaci v ČR

V České republice byla v roce 1998 zjištěna na náhodně vybraném vzorku zdravé populace séroprevalence 18,4% (Uhlíková & Hübner, 1998). Další studie v roce 2006 uvádí 19% (Kolářová, 2006). Zajímavé výsledky přineslo i testování 62 pacientů s RS, kde byla zjištěna 1,6% pozitivita (Posová *et al.*, 2017).

1.3.4. Sérologická diagnostika *T. canis*

Standardem pro diagnostiku infekce *T. canis* jsou sérologické testy prokazující přítomnost specifických protilátek, zejména ELISA a Western Blot (WB). Většina těchto testů je založena na využití exkrečně-sekrecčních (TES) antigenů, které produkují larvy L3 v průběhu *in vitro* kultivace do kultivačního média (DeSavigny, 1975). Potvrzení WB testem je doporučeno zejména v oblastech s možným výskytem dalších parazitů, zejména helmintů (Fillaux & Magnaval, 2013). ELISA testy založené na detekci TES antigen-specifických IgG mají určité limity v senzitivitě (97%) a specifitě (36%) (Ma *et al.*, 2018; Noordin *et al.*, 2005; Noordin *et al.*, 2020), což může vést k falešně pozitivním výsledkům. Tato skutečnost je ovlivněna křížovými reakcemi protilátek po infekci jinými zástupci rodu *Toxocara*, ale i dalšími helminty (Fillaux & Magnaval, 2013; Ishida *et al.*, 2003). Další zvýšení senzitivity a specifity bylo a je zaměřeno na možné využití rekombinantních TES antigenů, jejichž reaktivita by mohla při zachování vysoké senzitivity vést i ke zvýšení specifity při infekci *T. canis*. (Fillaux & Magnaval, 2013; Wickramasinghe *et al.*, 2008; Yunus *et al.*, 2018) Přes velké pokroky v oblasti využití rekombinantních antigenů v sérologických testech je většina komerčních ELISA souprav založena na využití TES antigenů

získaných kultivací larev L3. Při hodnocení sérologických studií je třeba mít na paměti možné limity jejich interpretace a rozdíly mezi jednotlivými studiemi (věk, pohlaví, zeměpisnou lokalitu, sociodemografické parametry, datum, kdy byla studie provedena a další), stejně tak i rozdíly v použitých laboratorních metodách. I přes možné odlišnosti způsobené uvedenými faktory je zřejmé, že kontakt s parazitem a promořenost lidské populace *T. canis* jsou velmi vysoké (Ma *et al.*, 2020).

1.3.5. Důsledky infekce lidské populace, toxokaróza

Vzhledem k vysoké promořenosti lidské populace je *T. canis* jedním z nejrozšířenějších zoonotických patogenů člověka, který může mít závažné zdravotní i socioekonomické důsledky, zejména v subtropických a tropických oblastech a v ekonomicky znevýhodněných komunitách (Antolová *et al.*, 2015; Holland, 2017; Ma *et al.*, 2018). Výsledkem infekce je lokální zánětlivá reakce spojená s eosinofilií, zvýšenou produkcí cytokinů a specifických protilátek. Přestože většina infekcí člověka proběhne asymptomaticky, u některých jedinců, v závislosti na infekční dávce a následné reakci a stavu imunitního systému, se může objevit řada symptomů označovaných jako larvální toxokaróza. Rozlišujeme dle klinických projevů 4 formy tohoto onemocnění: (1) Viscerální toxokaróza (*visceral larva migrans*), (2) oční toxokaróza (*ocular larva migrans*), (3) neurotoxokaróza (NT, též cerebrální toxokaróza, *neural larva migrans*) a (4) skrytá (covert, common toxocarosis) toxokaróza (Ma *et al.*, 2018; Nicoletti, 2020).

1.3.6. Imunitní odpověď na infekci *T. canis* v CNS - neurotoxokaróza

Neurotoxokaróza (*neural larva migrans*) je přímým důsledkem migrace, přítomnosti a setrvání L3 larev v CNS. U lidí je tato diagnóza velmi vzácná (Lee *et al.*, 2021), a proto nabývá na důležitosti studium patogeneze, exprese cytokinů a dalších markerů neurotoxokarózy na myších modelech (Fan, 2020).

Pro infekce myši je charakteristická somatická migrace L3 larev tkáněmi, kdy je posléze největší procento nalézáno v CNS a lze ji definovat 3 fázemi (Strube *et al.*, 2020b) – akutní (0-14 dní po infekci), subakutní (14-28 dní po infekci) a chronickou (28 dní a více). Přítomnost L3 larev v CNS je spojena s neurobehaviorálními změnami jako jsou motorické dysfunkce, poruchy rovnováhy, snížení aktivity a agresivity a změny ve schopnosti učení se a paměti (Cox & Holland, 1998; Dolinsky *et al.*, 1985; Hamilton *et al.*, 2006; Janecek *et al.*, 2017). Zajímavá je pravděpodobná korelace s velikostí infekční dávky (Cox & Holland, 1998; Cox & Holland, 2001).

Přítomnost larev *T. canis* v CNS vede k aktivaci mikroglie a makrofágů. Aktivace Th1 odpovědi indukovaná makrofágy M1 je odpovědná za neuropatologické změny a byla zaznamenána zejména na úrovni transkripce, ale koncentrace byly obvykle zvýšené jen mírně, jak shrnuje Strube *et al.* (2020b). Naproti tomu aktivované M2 jsou odpovědné za imunoregulaci a remodelaci tkáně (Subramaniam & Federoff, 2017). Zvýšená Th2 odpověď obvykle koresponduje se snížením prozánětlivé Th1 a Th17 odpovědi. Kromě toho dochází i k aktivaci Treg a produkci IL-10 a TGF- β (Loukas *et al.*, 2021). To usnadňuje dlouhodobé přežívání larev v imunologicky unikátním prostředí CNS. Důsledkem může být dlouhodobá aktivace Th2 a Treg v CNS, kde larvy nejsou obklopeny infiltrátem leukocytů, což může být způsobeno i omezeným vstupem komponent IS (Holland & Hamilton, 2013).

2. CÍLE PRÁCE

Toxocara canis je široce studovaným parazitem již mnoho let. Přesto je mnoho oblastí, které vyžadují další výzkum, a to vzhledem k tomu, že se jedná o světově velmi rozšířeného helminta s dopadem na zdraví lidské populace. Předložená práce se zabývá imunitní odpovědí paratenického hostitele na infekci *T. canis*, vlivem této infekce na vznik a průběh autoimunitního onemocnění, konkrétně experimentální autoimunitní encefalomyelitidy jako modelu pro studium roztroušené sklerózy, vývojem séroprevalence v populaci v České republice a potenciálně ve skupině pacientů s roztroušenou sklerózou. Dílčí cíle této práce jsou:

- Popsat dynamiku specifických protilátek při různých infekčních dávkách u myši, a to s cílem definovat dávku, která je schopna vyvolat infekci, ale nemá vliv u infikovaných zvířat na změny v chování a motorice.
- Objasnit vliv infekce *T. canis* na vznik a průběh experimentální autoimunitní encefalomyelitidy u myši, zjistit koncentrace vybraných cytokinů a četnost populace Treg.
- Vyhodnotit současnou séroprevalenci *T. canis* u lidí a její vývoj v čase v populaci ČR, a to srovnáním získaných dat s dříve publikovanými studii.
- Ověřit možnosti použití nových rekombinantních ES antigenů *T. canis* v sérologické diagnostice.

3. MATERIÁL A METODY

Materiál a metody jsou detailně popsány v uvedených publikacích. Zde je uveden pouze stručný výčet.

Toxocara canis: Infekční materiál pro experimenty na myších byl získán po izolaci vajec z dospělců, po inkubaci a vývoji larev byly tyto izolovány a kultivovány v kultivačním mediu a používány k infekčním experimentům (Schváleno Etickou komisí 1.LF UK a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy). Zároveň byly z média izolovány exkrementně-sekrecní antigeny, které byly používány jako základ pro ELISA testy jak s myšími, tak i s lidskými séry.

Experimentální autoimunitní encefalopatie byla indukována subkutánní aplikací MOG peptidu v kompletním Freundově adjuvans a intraperitoneální aplikací pertusového toxinu.

Průkaz *Toxocara canis*-specifických protilátek byl prováděn ELISA testem a u rekombinantních antigenů i Western blottingem.

Příprava rekombinantních exkrementně-sekrecních antigenů: Po SDS elektroforéze a následném Western blottingu s pozitivními myšími séry byly hmotnostní spektrometrií identifikovány pozitivně reagující proteiny. Z nich byly vybrány 4 proteiny a připraveny rekombinantní antigeny, které byly následně testovány s lidskými a myšími séry (ELISA a WB).

Lidská séra: V publikované studii byly použity výsledky testování vzorků zaslaných do Národní referenční laboratoře pro tkáňové helmintózy (2012-2016), další lidská séra (dosud nepublikované výsledky) byla získána ze serologických přehledů (1996, 2001), od zdravých dárců krve (2000) a od pacientů s RS (2020-2022). Studie byla schválena Etickou komisí 1.LF UK.

Stanovení populace buněk Treg průtokovou cytometrií: Myši byly narkotizovány, následně byla provedena perfuze krevního oběhu studeným pufrovaným fyziologickým roztokem, odebrána slezina, mezenterické uzliny, mozek a mícha. Po izolaci byly buňky označeny specifickými protilátkami proti markerům Treg buněk (CD4, CD25, FoxP3, Helios).

Stanovení koncentrace cytokinů: Byla použita metoda Cytokine Bead Array (CBA), BD. Koncentrace byla vypočtena z kalibrační křivky (BD firemní software) v pg/ml.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato práce se zabývala vztahem parazita *Toxocara canis* a paratenických hostitelů a reakcí imunitního systému hostitelů na jeho přítomnost. Vzhledem ke své globální přítomnosti u člověka a mnoha dalších hostitelů představuje *T. canis* ideální model pro studium vlivu této infekce na imunitní systém hostitele a jeho regulaci s ohledem na zvýšený výskyt alergických a autoimunitních onemocnění. I přes skutečnost, že se jedná o jednoho z nejrozšířenějších parazitů, a přes detailní znalost jeho patogenity, reakcí a regulací imunitního systému zůstává stále otevřená otázka jeho role právě u autoimunitních onemocnění včetně roztroušené sklerózy. Ke studiu těchto mechanismů, vzhledem k omezeným možnostem studia na lidské populaci, jsou využívány laboratorní zvířecí modely. Klíčové je odlišení patologických důsledků samotné infekce z projevů laboratorně navozeného testovaného onemocnění.

Na myším modelu jsme ověřovali, jaká je minimální velikost infekční dávky *T. canis*, která je schopna vyvolat infekci, ale nemá vliv u infikovaných zvířat na změny v chování a motorice - **publikace 1: Novák et al. (2017)**. K infekci myši jsou využívána vajíčka *T. canis* obsahující larvu stadia L3. Alternativně a méně často jsou používány izolované larvy kultivované *in vitro*, což byl postup používaný v našich experimentech. Při infekci larvami lze vizuálně kontrolovat jejich životnost a při podání v napájecí vodě lze efektivně kontrolovat podanou infekční dávku. Výhodou této aplikace je i minimalizace stresu laboratorních zvířat. Zjistili jsme, že i podání minimální dávky 10 larev denně vyvolalo sérologicky prokazatelnou infekci již po 12 dnech. První specifické protilátky se objevily ve třídě IgM a IgG1 - **publikace 1: Novák et al. (2017)**.

Převaha pozitivních výsledků HIT u EAE nás vedla k experimentu, kdy jsme infikovali dvěma dávkami (každá 100 larev) L3 larev *T. canis* myši C57BL/6J a v chronické fázi infekce (s předpokladem přítomnosti larev v CNS) jsme indukovali EAE. Zvolili jsme takovou infekční dávku, která nevede k viditelnému poškození a změnám chování myši - **publikace 1: Novák et al. (2017)**, abychom mohli pozorovat symptomy EAE. Překvapivě jsme zjistili negativní působení předcházející infekce jak z pohledu monitorovaných symptomů EAE, tak z pohledu úbytků hmotnosti zvířat. U infikované skupiny s EAE byly zjištěny také výrazně zvýšené hladiny monitorovaných cytokinů IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-4 a IL-10 ve srovnání s neinfikovanými zvířaty. V CNS bylo pozorováno více CD4⁺ T buněk non-Treg fenotypu. Zhoršení příznaků by pak mohlo být vysvětleno přítomností prozánětlivých Th1 a Th17 buněk - **publikace 4, Novák et al. (2022)**. Je otázkou, zda uvedená infekční dávka byla dostatečně malá a zda by ještě nižší dávka měla stejný prozánětlivý efekt. Za úvahu stojí i možná profylaktická či terapeutická aplikace izolovaných ES produktů, u které odpadá přímý patologický vliv migrace larev v CNS. V tomto smyslu zajímavá, i když s našimi výsledky poněkud kontrastující, je studie Borhani Zarandi et al. (2017), ve které byl popsán pozitivní vliv ES produktů *T. canis* na průběh EAE. V této studii byly použity ES produkty, které byly získány kultivací dospělců v kultivačním médiu, což je méně obvyklý způsob získávání ES produktů.

Asociace infekce parazitem a konkrétního onemocnění v lidské populaci, v našem případě RS, lze studovat jen několika omezenými přístupy. Jedním z nich je monitorování séroprevalence pomocí specifických protilátek proti parazitovi u skupiny pacientů s definovaným onemocněním a u kontrolní skupiny zdravých (normálních), demograficky odpovídajících jedinců. Otázkou, která je aktuální pro infekci *Toxocara canis*, je i dynamika výskytu protilátek v čase a porovnatelnost výsledků z časově předcházejících studií. Ve skupině pacientů, jejichž séra byla zaslána do Národní referenční laboratoře pro tkáňové helmintózy v letech 2012-2016, byla zjištěna séroprevalence 3,6% - **publikace 2: Skulinová et al. (2020)**, což je výrazné snížení ve srovnání s předcházejícím publikacemi, kde byla zjištěna séroprevalence 18,4% (Uhlíková & Hübner, 1998) a 19% (Kolářová, 2006). Vzhledem k tomu, že séra pacientů zaslána do Národní referenční laboratoře pro tkáňové helmintózy v naší studii můžeme považovat za suspektní z pohledu možného vyššího výskytu infekce helminty, lze předpokládat i nižší výskyt (než uvedených 3,6%) této infekce v současné zdravé populaci. Lze spekulovat o mnoha příčinách poklesu. Jedním z možných faktorů může být i zlepšená veterinární péče majitelů psů a koček, konkrétně jejich pravidelné odčervování.

Naše dosud nepublikované výsledky ze sérologických přehledů z let 1996 (8,3% séropozitivity), 2001 (4,9%) a zdravých dárců krve z roku 2020 (3,5%) jsou ve shodě se současným trendem, přičemž rozdíly publikovaných výsledků z roku 1998 (18,3%)(Uhlíková & Hübner, 1998) s námi zjištěnou hodnotou v roce 1996 (8,3%) mohou jít na vrub rozdílu mezi vzorky studované populace a použité metodice. Zajímavé z pohledu možného ovlivnění RS infekcí *T. canis* je studie zjišťující séroprevalenci u pacientů s RS, kde byla zjištěna hodnota 1,6% (1 pozitivní pacient z 62)(Posová et al., 2017). Naše dosud nepublikované vyšetření 411 pacientů s RS ukázalo 1,7% pozitivních vzorků. To je v dobré shodě s předcházející studií a ve srovnání se zdravou populací lze spekulovat, že nižší promořenost lidské populace hlísticí *T. canis* může být spojena s vyšším rizikem vzniku RS.

Sérologická diagnostika (identifikace specifických protilátek různými metodami) *T. canis* má řadu aspektů, které mohou ovlivnit interpretaci výsledků. Cílem identifikace vhodných antigenů je dosažení maxima citlivosti a specificity pro detekci *T. canis*-specifických protilátek. Připravili jsme a otestovali řadu rekombinantních ES antigenů (Tc-TES-26 (25-30 kDa), Tc-ASA (45-50 kDa), Tc-PDP (25-30 kDa) a Tc-ASP (25-30 kDa)), které v ELISA testech reagovaly s myšími i lidskými séry infikovaných jedinců a které mohou být potenciálním základem pro další vývoj sérologických testů - **publikace 3: Skulinová et al. (2022)**.

5. ZÁVĚR

Závěrem můžeme shrnout, že tato práce ukázala, že k sérologicky detekovatelné infekci myši dochází již po 12 dnech i při podání malé dávky a infekce *T. canis* vede ke zhoršení EAE u myši. Prokázali jsme také snižující se výskyt této infekce v běžné lidské populaci České republiky a využitelnost rekombinantních antigenů pro sérologickou diagnostiku. Na rozdíl od zhoršení průběhu EAE u myši ukázaly naše dosud nepublikované výsledky nižší séroprevalenci ve skupině pacientů s RS ve srovnání s kontrolní skupinou, což nepřímo ukazuje na možný protektivní účinek ve vztahu k RS. Další směřování naší práce by mělo vést k potvrzení pozitivního vlivu infekce *T. canis* u pacientů s RS a potenciálně i s dalšími autoimunitními onemocněními.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abreu, S. L.** (1982). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by interferon. *Immunological Communications*, **11**, 1-7.
- Antolová, D., Jarčuška, P., Janičko, M., Madarasová-Gecková, A., Halanová, M., Cislaková, L., Kalinová, Z., Reiterová, K., Škutová, M., Pella, D., Mareková, M. and HepaMeta, T.** (2015). Seroprevalence of human *Toxocara* infections in the Roma and non-Roma populations of Eastern Slovakia: a cross-sectional study. *Epidemiology and Infection*, **143**, 2249-2258.
- Azam, D., Ukpai, O. M., Said, A., Abd-Allah, G. A. and Morgan, E. R.** (2012). Temperature and the development and survival of infective *Toxocara canis* larvae. *Parasitology Research*, **110**, 649-656.
- Bach, J. F.** (2021). Revisiting the hygiene hypothesis in the context of autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article Number 615192.
- Bancroft, A. J., Levy, C. W., Jowitt, T. A., Hayes, K. S., Thompson, S., McKenzie, E. A., Ball, M. D., Dubaissi, E., France, A. P., Bellina, B., Sharpe, C., Mironov, A., Brown, S. L., Cook, P. C., MacDonald, A. S., Thornton, D. J. and Grecis, R. K.** (2019). The major secreted protein of the whipworm parasite tethers to matrix and inhibits interleukin-13 function. *Nature Communications*, **10**, Article Number 2344.
- Banerjee, S., Cui, H. C., Xie, N., Tan, Z., Yang, S. Z., Icyuz, M., Thannickal, V. J., Abraham, E. and Liu, G.** (2013). miR-125a-5p Regulates differential activation of macrophages and inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 35428-35436.
- Baron, J. L., Madri, J. A., Ruddle, N. H., Hashim, G. and Janeway, C. A.** (1993). Surface expression of alpha-4 integrin by CD4+ T-cells is required for their entry into brain parenchyma. *Journal of Experimental Medicine*, **177**, 57-68.
- Batoulis, H., Recks, M. S., Addicks, K. and Kuerten, S.** (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis - achievements and prospective advances. *Apms*, **119**, 819-830.
- Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E. and Tzoulaki, I.** (2020). Environmental factors and risk of multiple sclerosis: Findings from meta-analyses and Mendelian randomization studies. *Multiple Sclerosis Journal*, **26**, 397-404.
- Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S. J., Sobel, R. A., Glimcher, H. and Kuchroo, V. K.** (2004). Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, **200**, 79-87.
- Bing, S. J., Ha, D., Ahn, G., Cho, J., Kim, A., Park, S. K., Yu, H. S. and Jee, Y.** (2015). Galectin isolated from parasite inhibits remission of experimental autoimmune encephalomyelitis by up-regulating autoantibody. *Clinical and Experimental Immunology*, **180**, 419-431.
- Biswas, K., Chatterjee, D., Addya, S., Khan, R. S., Kenyon, L. C., Choe, A., Cohrs, R. J., Shindler, K. S. and Das Sarma, J.** (2016). Demyelinating strain of mouse hepatitis virus infection bridging innate and adaptive immune response in the induction of demyelination. *Clinical Immunology*, **170**, 9-19.
- Bittner, S., Afzali, A. M., Wiendl, H. and Meuth, S. G.** (2014). Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG(35-55)) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, **86**, Article Number e51275.
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y. M., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L. and Ascherio, A.** (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, **375**, 296-301.

- Borhani Zarandi, M., Hoseini, S., Jalousion, F., Etebar, F. and Vojgani, M.** (2017). Evaluate *Toxocara canis* excretory-secretory antigens in experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Iran J Vet Med*, **11**, 175-182.
- Brooks, W. H., Le Dantec, C., Pers, J. O., Youinou, P. and Renaudineau, Y.** (2010). Epigenetics and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, **34**, J207-J219.
- Cardillo, N., Prous, C. G., Krivokapich, S., Pittaro, M., Ercole, M., Perez, M., Pasqualetti, M., Farina, F., Rosa, A., Gatti, G. and Ribicich, M.** (2016). First report of *Toxocara cati* in the domestic land snail *Rumina decollata*. *Revista Argentina De Microbiologia*, **48**, 206-209.
- Coronado, S., Zakzuk, J., Regino, R., Ahumada, V., Benedetti, I., Angelina, A., Palomares, O. and Caraballo, L.** (2019). *Ascaris lumbricoides* cystatin prevents development of allergic airway inflammation in a mouse model. *Frontiers in Immunology*, **10**, Article Number 2280.
- Correale, J. and Gaitan, M. I.** (2015). Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein-Barr virus infection. *Acta Neurologica Scandinavica*, **132**, 46-55.
- Correale, J., Marrodan, M. and Contentti, E. C.** (2021). Interleukin-35 is a critical regulator of immunity during helminth infections associated with multiple sclerosis. *Immunology*, **164**, 569-586.
- Cox, D. M. and Holland, C. V.** (1998). The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis*-infected mice and social behaviour and anxiety in the host. *Parasitology*, **116**, 579-594.
- Cox, D. M. and Holland, C. V.** (2001). Relationship between three intensity levels of *Toxocara canis* larvae in the brain and effects on exploration, anxiety, learning and memory in the murine host. *Journal of Helminthology*, **75**, 33-41.
- Dalcanto, M. C., Melvold, R. W., Kim, B. S. and Miller, S. D.** (1995). 2 Models of multiple-sclerosis - experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and Theilers murine exncephalomyelitis virus (TMEV) infection - a pathological and immunological comparison. *Microscopy Research and Technique*, **32**, 215-229.
- Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M. E., de Courten, M., Matsoukas, J. and Apostolopoulos, V.** (2017). Multiple sclerosis: Immunopathology and treatment update. *Brain Sciences*, **7**, Article Number 78.
- Dendrou, C. A., Fugger, L. and Friese, M. A.** (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, **15**, 545-558.
- Dendrou, C. A., Plagnol, V., Fung, E., Yang, J. H. M., Downes, K., Cooper, J. D., Nutland, S., Coleman, G., Himsforth, M., Hardy, M., Burren, O., Healy, B., Walker, N. M., Koch, K., Ouweland, W. H., Bradley, J. R., Wareham, N. J., Todd, J. A. and Wicker, L. S.** (2009). Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource. *Nature Genetics*, **41**, 1011-1015.
- DeSavigny, D. H.** (1975). In vitro maintenance of *T. canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for the uses in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Journal of Parasitology*, **61**, 781-782.
- Dolinsky, Z. S., Hardy, C. A., Burrignt, R. G. and Donovan, P. J.** (1985). The progression of behavioral and pathological effects of the parasite *Toxocara canis* in the mouse. *Physiology & Behavior*, **35**, 33-42.
- Dubinský, P., Havasiová Reiterová, K., Petko, B., Hovorka, I. and Tomašovicová, O.** (1995). Role of small mammals in the epidemiology of toxocariasis. *Parasitology*, **110**, 187-193.
- Elliott, D. E., Summers, R. W. and Weinstock, J. V.** (2007). Helminths as governors of immune-mediated inflammation. *International Journal for Parasitology*, **37**, 457-464

- Elliott, D. E. and Weinstock, J. V.** (2009). Helminthic therapy: Using worms to treat immune-mediated disease. In *Pathogen-Derived Immunomodulatory Molecules*, Vol. 666 (ed. Fallon, P. G.), pp. 157-166.
- Elliott, D. E. and Weinstock, J. V.** (2012). Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. In *Year in Immunology*, Vol. 1247 (ed. Rose, N. R.), pp. 83-96.
- Erickson, M. A. and Banks, W. A.** (2019). Age-associated changes in the immune system and blood-brain barrier functions. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, Article Number 1632.
- Erickson, M. A. and Banks, W. A.** (2022). Transcellular routes of blood-brain barrier disruption. *Experimental Biology and Medicine*, **247**, 788-796.
- Fan, C. K.** (2020). Pathogenesis of cerebral toxocariasis and neurodegenerative diseases. In *Toxocara and Toxocariasis Advances in Parasitology*, Vol. 109 (ed. Bowman, D. D.), pp. 233-259.
- Ferreira, M. L. B.** (2010). Cognitive deficits in multiple sclerosis A systematic review. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*, **68**, 632-641.
- Fillaux, J. and Magnaval, J. F.** (2013). Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary Parasitology*, **193**, 327-336.
- Friese, M. A., Jakobsen, K. B., Friis, L., Etzensperger, R., Craner, M. J., McMahon, R. M., Jensen, L. T., Huygelen, V., Jones, E. Y., Bell, J. I. and Fugger, L.** (2008). Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Nature Medicine*, **14**, 1227-1235.
- Glickman, L. T. and Summers, B. A.** (1983). Experimental *Toxocara canis* infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *American Journal of Veterinary Research*, **44**, 2347-2354.
- Gregersen, J. W., Kranc, K. R., Ke, X. Y., Svendsen, P., Madsen, L. S., Thomsen, A. R., Cardon, L. R., Bell, J. I. and Fugger, L.** (2006). Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature*, **443**, 574-577.
- Gregory, S. G., Schmidt, S., Seth, P., Oksenberg, J. R., Hart, J., Prokop, A., Caillier, S. J., Ban, M., Goris, A., Barcellos, L. F., Lincoln, R., McCauley, J. L., Sawcer, S. J., Compston, D. A. S., Dubois, B., Hauser, S. L., Garcia-Blanco, M. A., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L. and Multiple Sclerosis Genetics, G.** (2007). Interleukin 7 receptor a chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature Genetics*, **39**, 1083-1091.
- Hamilton, C. M., Stafford, P., Pinelli, E. and Holland, C. V.** (2006). A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. *Parasitology*, **132**, 791-801.
- Harkiolaki, M., Holmes, S. L., Svendsen, P., Gregersen, J. W., Jensen, L. T., McMahon, R., Friese, M. A., van Boxel, G., Etzensperger, R., Tzartos, J. S., Kranc, K., Sainsbury, S., Harlos, K., Mellins, E. D., Palace, J., Esiri, M. M., van der Merwe, P. A., Jones, E. Y. and Fugger, L.** (2009). T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity*, **30**, 348-357.
- Hartmann, F. J., Khademi, M., Aram, J., Ammann, S., Kockum, I., Constantinescu, C., Gran, B., Piehl, F., Olsson, T., Codarri, L. and Becher, B.** (2014). Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human T-H cells. *Nature Communications*, **5**, Article Number 6056.
- Hauser, S. L. and Cree, B. A. C.** (2020). Treatment of multiple sclerosis: A review. *American Journal of Medicine*, **133**, 1380-1390.

- Holland, C. V.** (2017). Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. *Parasitology*, **144**, 81-94.
- Holland, C. V. and Hamilton, C. M.** (2013). The significance of cerebral toxocariasis: a model system for exploring the link between brain involvement, behaviour and the immune response. *Journal of Experimental Biology*, **216**, 78-83.
- Charabati, M., Donkers, S. J., Kirkland, M. C. and Osborne, L. C.** (2020). A critical analysis of helminth immunotherapy in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, **26**, 1448-1458.
- Chen, J., Chia, N., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Novotna, M., Soldan, M. M. P., Luckey, D. H., Marietta, E. V., Jeraldo, P. R., Chen, X. F., Weinshenker, B. G., Rodriguez, M., Kantarci, O. H., Nelson, H., Murray, J. A. and Mangalam, A. K.** (2016). Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific Reports*, **6**, Article Number 28484.
- Chu, F. N., Shi, M. C., Zheng, C., Shen, D. H., Zhu, J., Zheng, X. Y. and Cui, L.** (2018). The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, **318**, 1-7.
- Ishida, M. M. I., Rubinsky-Elefant, G., Ferreira, A. W., Hoshino-Shimizu, S. and Vaz, A. J.** (2003). Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Tropica*, **89**, 73-84.
- Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. and Kuchroo, V. K.** (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *Journal of Immunology*, **183**, 7169-7177.
- Janecek, E., Waindok, P., Bankstahl, M. and Strube, C.** (2017). Abnormal neurobehaviour and impaired memory function as a consequence of *Toxocara canis*- as well as *Toxocara cati*-induced neurotoxocarosis. *Plos Neglected Tropical Diseases*, **11**, Article Number e0005594.
- Johnston, C. J. C., Smyth, D. J., Kodali, R. B., White, M. P. J., Harcus, Y., Filbey, K. J., Hewitson, J. P., Hinck, C. S., Ivens, A., Kemter, A. M., Kildemoes, A. O., Le Bihan, T., Soares, D. C., Anderton, S. M., Brenn, T., Wigmore, S. J., Woodcock, H. V., Chambers, R. C., Hinck, A. P., McSorley, H. J. and Maizels, R. M.** (2017). A structurally distinct TGF-beta mimic from an intestinal helminth parasite potently induces regulatory T cells. *Nature Communications*, **8**, Article Number 01886-6.
- Katz-Levy, Y., Neville, K. L., Padilla, J., Rahbe, S., Begolka, W. S., Girvin, A. M., Olson, J. K., Vanderlugt, C. L. and Miller, S. D.** (2000). Temporal development of autoreactive Th1 responses and endogenous presentation of self myelin epitopes by central nervous system-resident APCs in Theiler's virus-infected mice. *Journal of Immunology*, **165**, 5304-5314.
- Kinashi, Y. and Hase, K.** (2021). Partners in Leaky gut syndrome: Intestinal dysbiosis and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article Number 673708.
- Kivisakk, P., Mahad, D. J., Callahan, M. K., Trebst, C., Tucky, B., Wei, T., Wu, L. J., Baekkevold, E. S., Lassmann, H., Staugaitis, S. M., Campbell, J. J. and Ransohoff, R. M.** (2003). Human cerebrospinal fluid central memory CD4(+) T cells: Evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 8389-8394.
- Kleinewietfeld, M. and Hafler, D. A.** (2014). Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunological Reviews*, **259**, 231-244.
- Koch-Henriksen, N. and Sorensen, P. S.** (2010). The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurology*, **9**, 520-532.

- Kolářová, L.** (2006). Tkáňové helmintózy. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, **12**, 131-134.
- Krishnamoorthy, G. and Wekerle, H.** (2009). EAE: An immunologist's magic eye. *European Journal of Immunology*, **39**, 2031-2035.
- Kucukali, C. I., Kurtuncu, M., Coban, A., Cebi, M. and Tuzun, E.** (2015). Epigenetics of multiple sclerosis: An updated review. *Neuromolecular Medicine*, **17**, 83-96.
- Lao, K. J., Ji, N. C., Zhang, X. H., Qiao, W. W., Tang, Z. S. and Gou, X. C.** (2019). Drug development for Alzheimer's disease: review. *Journal of Drug Targeting*, **27**, 164-173.
- Lavi, E., Gilden, D. H., Highkin, M. K. and Weiss, S. R.** (1984). Persistence of mouse hepatitis-virus A59 RNA in a slow virus demyelinating infection in mice as detected by insitu hybridization. *Journal of Virology*, **51**, 563-566.
- Lee, K. P., Shen, P. C., Shih, Y. C., Chou, C. M., Tsai, C. S., Sun, Y. T. and Fan, C. K.** (2021). The first two cases of neurotoxocarasis in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association*, **120**, 1520-1525.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A. and Elinav, E.** (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, **17**, 219-232.
- Loukas, A., Maizels, R. M. and Hotez, P. J.** (2021). The yin and yang of human soil-transmitted helminth infections. *International Journal for Parasitology*, **51**, 1243-1253.
- Louveau, A., Harris, T. H. and Kipnis, J.** (2015). Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege. *Trends in Immunology*, **36**, 569-577.
- Lu, M., Shi, H., Korner, H. and Taylor, B. V.** (2022). Alterations of subset and cytokine profile of peripheral T helper cells in PBMCs from multiple sclerosis patients or from individuals with MS risk SNPs near genes CYP27B1 and CYP24A1. *Cytokine*, **153**, Article Number 155866.
- Lundmark, F., Duvefelt, K., Iacobaeus, E., Kockum, I., Wallstrom, E., Khademi, M., Oturai, A., Ryder, L. P., Saarela, J., Harbo, H. F., Celius, E. G., Salter, H., Olsson, T. and Hillert, J.** (2007). Variation in interleukin 7 receptor a chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nature Genetics*, **39**, 1108-1113.
- Ma, G. X., Holland, C. V., Wang, T., Hofmann, A., Fan, C. K., Maizels, R. M., Hotez, P. J. and Gasser, R. B.** (2018). Human toxocarasis. *Lancet Infectious Diseases*, **18**, E14-E24.
- Ma, G. X., Rostami, A., Wang, T., Hofmann, A., Hotez, P. J. and Gasser, R. B.** (2020). Global and regional seroprevalence estimates for human toxocarasis: A call for action. In *Toxocara and Toxocarasis*, Advances in Parasitology, Vol. 109 (ed. Bowman, D. D.), pp. 275-290.
- Maizels, R. M., Smits, H. H. and McSorley, H. J.** (2018). Modulation of host immunity by helminths: The expanding repertoire of parasite effector molecules. *Immunity*, **49**, 801-818.
- Manini, M. P., Marchioro, A. A., Colli, C. M., Nishi, L. and Falavigna-Guilherme, A. L.** (2012). Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara spp.* in children. *Veterinary Parasitology*, **188**, 48-52.
- Marrodan, M., Alessandro, L., Farez, M. F. and Correale, J. E.** (2019). The role of infections in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, **25**, 891-901.
- McSorley, H. J. and Maizels, R. M.** (2012). Helminth infections and host immune regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, **25**, 585-608.
- Miller, S. D., Karpus, W. J. and Davidson, T. S.** (2007). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology*, **Chapter: Unit-15.1**.
- Miller, S. D., Katz-Levy, Y., Neville, K. L. and Vanderlugt, C. L.** (2001). Virus-induced autoimmunity: Epitope spreading to myelin autoepitopes in Theiler's virus infection of the central nervous system. *Advances in Virus Research*, Vol 56, **56**, 199-217.

Miller, S. D., Vanderlugt, C. L., Begolka, W. S., Pao, W., Yauch, R. L., Neville, K. L., KatzLevy, Y., Carrizosa, A. and Kim, B. S. (1997). Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nature Medicine*, **3**, 1133-1136.

Mokhtarian, F., Zhang, Z. G., Shi, Y., Gonzales, E. and Sobel, R. A. (1999). Molecular mimicry between a viral peptide and a myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces autoimmune demyelinating disease in mice. *Journal of Neuroimmunology*, **95**, 43-54.

Montalban, X., Hauser, S. L., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Comi, G., de Seze, J., Giovannoni, G., Hartung, H. P., Hemmer, B., Lublin, F., Rammohan, K. W., Selmaj, K., Traboulsee, A., Sauter, A., Masterman, D., Fontoura, P., Belachew, S., Garren, H., Mairon, N., Chin, P., Wolinsky, J. S. and Investigators, O. C. (2017). Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, **376**, 209-220.

Murphy, K. M. and Stockinger, B. (2010). Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature Immunology*, **11**, 674-680.

Nicoletti, A. (2020). Neurotoxocariasis. In *Toxocara and Toxocariasis, Advances in Parasitology*, Vol. 109 (ed. Bowman, D. D.), pp. 219-231.

Njenga, M. K., Marques, C. and Rodriguez, M. (2004). The role of cellular immune response in Theiler's virus-induced central nervous system demyelination. *Journal of Neuroimmunology*, **147**, 73-77.

Noordin, R., Yunus, M. H., Farrizam, S. N. T. and Arifin, N. (2020). Serodiagnostic methods for diagnosing larval toxocariasis. In *Toxocara and Toxocariasis, Advances in Parasitology*, Vol. 109 (ed. Bowman, D. D.), pp. 131-152.

Olson, J. K., Croxford, J. L. and Miller, S. D. (2003). Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced CNS autoimmunity. *Asm News*, **69**, 449-455.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y. M., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M. R., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y. J., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F. and Kastelein, R. A. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, **13**, 715-725.

Pardridge, W. A. (2009). Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood-brain barrier. *Alzheimers & Dementia*, **5**, 427-432.

Patsopoulos, N. A., Barcellos, L. F., Hintzen, R. Q., Schaefer, C., Van Duijn, C. M., Noble, J. A., Raj, T., Gourraud, P. A., Stranger, B. E., Oksenberg, J., Olsson, T., Taylor, B. V., Sawcer, S., Hafler, D. A., Carrington, M., De Jager, P. L., De Bakker, P. I. W., Imsgc and Anzgene (2013). Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *Plos Genetics*, **9**, Article Number 1003926.

Posová, H., Hrušková, Z., Havrdová, E. and Kolářová, L. (2017). *Toxocara spp.* seronegativity in Czech patients with early form of multiple sclerosis clinically isolated syndrome. *Epidemiologie Mikrobiologie Immunologie*, **66**, 124-127.

Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L. and Matarese, G. (2015). Animal models of multiple sclerosis. *European Journal of Pharmacology*, **759**, 182-191.

Qiu, R. Z., Zhou, L. Y., Ma, Y. J., Zhou, L. L., Liang, T., Shi, L., Long, J. and Yuan, D. P. (2020). Regulatory T cell plasticity and stability and autoimmune diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, **58**, 52-70.

Ransohoff, R. M. and Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, **12**, 623-635.

- Rook, G. A. W., Adams, V., Hunt, J., Palmer, R., Martinelli, R. and Brunet, L. R.** (2004). Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. *Springer Seminars in Immunopathology*, **25**, 237-255.
- Rostami, A., Riahi, S. M., Hofmann, A., Ma, G. X., Wang, T., Behniafar, H., Taghipour, A., Fakhri, Y., Spotin, A., Chang, B. C. H., Macpherson, C. N. L., Hotez, P. J. and Gasser, R. B.** (2020). Global prevalence of *Toxocara* infection in dogs. In *Toxocara and Toxocarosis, Advances in Parasitology*, Vol. 109 (ed. Bowman, D. D.), pp. 561-583.
- Ryan, S. M., Eichenberger, R. M., Ruscher, R., Giacomini, P. R. and Loukas, A.** (2020). Harnessing helminth-driven immunoregulation in the search for novel therapeutic modalities. *Plos Pathogens*, **16**, Article Number 1008508.
- Sabel, C. E., Pearson, J. F., Mason, D. F., Willoughby, E., Abernethy, D. A. and Taylor, B. V.** (2021). The latitude gradient for multiple sclerosis prevalence is established in the early life course. *Brain*, **144**, 2038-2046.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M.** (2011). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25) breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, **186**, 3808-3821.
- Sakaguchi, S., Vignali, D. A. A., Rudensky, A. Y., Nieuwenhuis, R. E. and Waldmann, H.** (2013). The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 461-467. doi: 10.1038/nri3464.
- Salehi, Z., Beheshti, M., Nomanpour, B., Khosravani, P., Naseri, M., Sahraian, M. A. and Izad, M.** (2021). The association of EBV and HHV-6 viral load with different NK and CD8(+) T cell subsets in the acute phase of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cell Journal*, **23**, 626-632.
- Sasmal, N. K., Pahari, T. K. and Laha, R.** (2008). Experimental infection of the cockroach *Periplaneta americana* with *Toxocara canis* and the establishment of patent infections in pups. *Journal of Helminthology*, **82**, 97-100.
- Segal, B. M. and Shevach, E. M.** (1996). IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice. *Journal of Experimental Medicine*, **184**, 771-775.
- Sharif, Y., Jumah, F., Coplan, L., Krosser, A., Sharif, K. and Tubbs, R. S.** (2018). Blood brain barrier: A review of its anatomy and physiology in health and disease. *Clinical Anatomy*, **31**, 812-823.
- Shechter, R., London, A. and Schwartz, M.** (2013). Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 206-218. doi: 10.1038/nri3391.
- Schierack, P., Lucius, R., Sonnenburg, B., Schilling, K. and Hartmann, S.** (2003). Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infection and Immunity*, **71**, 2422-2429. doi: 10.1128/iai.71.5.2422-2429.2003.
- Sospedra, M. and Martin, R.** (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annual Review of Immunology*, **23**, 683-747.
- Strachan, D. P.** (1989). Hay-fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal*, **299**, 1259-1260.
- Stromnes, I. M. and Goverman, J. M.** (2006a). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, **1**, 1810-1819.
- Strube, C., Heuer, L. and Janeczek, E.** (2013). *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology*, **193**, 375-389.

- Strube, C., Waindok, P., Raulf, M. K. and Springer, A.** (2020b). *Toxocara*-induced neural larva migrans (neurotoxocarosis) in rodent model hosts. In *Toxocara and Toxocarosis, Advances in Parasitology*, Vol. 109 (ed. Bowman, D. D.), pp. 189-218.
- Subramaniam, S. R. and Federoff, H. J.** (2017). Targeting microglial activation states as a therapeutic avenue in parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **9**, Article Number 00176.
- Tao, C. R., Simpson-Yap, S., Taylor, B., Blizzard, L., Lucas, R., Ponsonby, A. L., Broadley, S., van der Mei, I. and AusLong Ausimmune Investigators, G.** (2022). Markers of Epstein-Barr virus and Human Herpesvirus-6 infection and multiple sclerosis clinical progression. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, **59**, Article Number 103561.
- Uhlíková, M. and Hübner, J.** (1998). Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in Czech Republic. *Central European Journal of Public Health*, **6**, 195-198.
- Vanderlugt, C. L. and Miller, S. D.** (2002). Epitope spreading in immunemediated diseases: Implications for immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, **2**, 85-95.
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Napier, C. A., Rijke, N. and Baneke, P.** (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal*, **26**, 1816-1821.
- Weinstock, J. V. and Elliott, D. E.** (2009). Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflammatory Bowel Diseases*, **15**, 128-133.
- Weiss, G. A. and Hennet, T.** (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **74**, 2959-2977.
- Wickramasinghe, S., Yatawara, L., Nagataki, M., Takamoto, M., Watanabe, Y., Rajapakse, R., Uda, K., Suzuki, T. and Agatsuma, T.** (2008). Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model. *Parasitology Research*, **103**, 853-858.
- Winter, J. R., Jackson, C., Lewis, J. E. A., Taylor, G. S., Thomas, O. G. and Stagg, H. R.** (2020). Predictors of Epstein-Barr virus serostatus and implications for vaccine policy: A systematic review of the literature. *Journal of Global Health*, **10**, Article Number 010404.
- Wu, T. and Bowman, D. D.** (2020). Visceral larval migrans of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* in non-canid and non-felid hosts. In *Toxocara and Toxocarosis, Advances in Parasitology*, Vol. 109 (ed. Bowman, D. D.), pp. 63-88.
- Yunus, M. H., Farrizam, S. N. T., Karim, I. Z. A. and Noordin, R.** (2018). A lateral flow rapid test for human toxocarosis developed using three *Toxocara canis* recombinant antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**, 32-38.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace *in extenso* v přímé souvislosti s tématem dizertační práce

Novák, J., Panská, L., Macháček, T., Kolářová, L. and Horák P. (2017). Humoral response of mice infected with *Toxocara canis* following different infection schemes. *Acta Parasitologica*, 62(4), 823-835. doi: [10.1515/ap-2017-0099](https://doi.org/10.1515/ap-2017-0099) JIF₂₀₁₇: 1,039

Skulinová, K., Novák, J., Kašný M., Kolářová L. (2020). Seroprevalence of larval toxocarosis in the Czech Republic. *Acta Parasitologica*, 65(1), 68-76. doi: [10.2478/s11686-019-00121-0](https://doi.org/10.2478/s11686-019-00121-0) JIF₂₀₂₀: 1,44

Skulinová, K., Novák, J., Kolářová L., Kašný M. (2022). Antigenic proteins from the excretory–secretory products of *Toxocara canis* larvae and evaluation of their potential for immunodiagnosics of larval toxocarosis. *Acta Parasitologica*, 67(2), 705-713. doi: [10.1007/s11686-021-00485-2](https://doi.org/10.1007/s11686-021-00485-2) JIF₂₀₂₂: 1,534

Novák, J., Macháček, T., Majer, M., Kostelanská, M., Skulinová, K., Černý, V., Kolářová, L., Hrdý, J. and Horák P. (Accepted for publication August 2022, on-line September 2nd 2022). *Toxocara canis* infection worsens the course of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Parasitology*, 148(4). doi: [10.1017/S0031182022001238](https://doi.org/10.1017/S0031182022001238) JIF₂₀₂₂: 3,243

Publikace *in extenso* bez přímé souvislosti s tématem dizertační práce

Štys, D., Novák, J., Krchňák, V., Vágner, J., Štrop, P., Buděšínský, M. (1995). Time-dependence of immunoreponse of different epitopes of GP41 and its relation to the structure of short peptide-fragment of GP41. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 60(6), 1054-1064. doi: [10.1135/cccc19951054](https://doi.org/10.1135/cccc19951054) JIF₁₉₉₇: 0,550

Hamšíková, E., Novák, J., Hofmannová, V., Munoz, N., Bosch, FX., Desanjose, S., Shah, k., Roth, Z., Vonka, V. (1994). Presence of antibodies to 7 human papillomavirus type 16 derived peptides in cervical cancer patients and healthy controls. *Journal of Infectious Diseases*, 170(6), 1424-1431. doi: [10.1093/infdis/170.6.1424](https://doi.org/10.1093/infdis/170.6.1424) JIF₁₉₉₇: 5,099

Suttnar, J., Dyr, JE., Hamšíková, E., Novák, J., Vonka, V. (1994). Procedure for refolding and purification of recombinant proteins from Escherichia coli inclusion bodies using a strong anion exchanger. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 656(1), 123-126. doi: [10.1016/0378-4347\(94\)00078-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00078-6) JIF₁₉₉₇: 1,588

Turánek, J., Toman, M., Novák, J., Krchňák, V., Hořavová, P. (1994). Adjuvant effect of liposomes and adamantylamide dipeptide on antigenicity of entrapped synthetic peptide derived from HIV-1 transmembrane region glycoprotein GP41. *Immunology Letters*, 39(2), 157-161. doi: [10.1016/0165-2478\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0165-2478(94)90101-5) JIF₁₉₉₇: 1,096

Novák, J., Sova, P., Krchňák, V., Hamšíková, E., Zavadová, H., Roubal, J. (1991). Mapping of serologically relevant regions of human cytomegalovirus phosphoprotein pp150 using synthetic peptides. *Journal of General Virology*, 72, 1409-1413. doi: [10.1016/0378-4347\(94\)00078-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00078-6) JIF₁₉₉₇: 2,863

Krchňák, V., Vágner, J., Novák, J., Suchánková, A., Roubal, J. (1990). A general procedure for evaluation of immunological relevance of synthetic peptides – peptides synthesized on paper in enzyme-linked-immunosorbent-assay. *Analytical Biochemistry*, 189(1), 80-83. doi: [10.1016/0003-2697\(90\)90047-D](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90047-D) JIF₁₉₉₇: 2,017

Celkem 10 publikací, H index 6