

**Univerzita Karlova
1.lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

Mgr. Kateřina Skulinová

Dominantní proteinové antigeny *Toxocara canis*

Dominant protein antigens of Toxocara canis

Disertační práce

Školitel: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Konzultantka: prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.

Praha

2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30. 3. 2023

Mgr. Kateřina Skulinová

Identifikační záznam:

SKULINOVÁ, Kateřina. *Dominantní proteinové antigeny Toxocara canis [Dominant protein antigens of Toxocara canis]*. Praha, 2023. 145 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK. Vedoucí práce: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Martinu Kašnému, Ph.D. za velkou trpělivost, optimistický přístup, podporu po celou dobu mého doktorského studia a heslo: „Malými krůčky k velkému úspěchu.“, které v budoucnu určitě ještě mnohokrát použiju.

Také bych velmi ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D. za možnost pracovat v jeho skvělém helmintologickém týmu na Katedře parazitologie, PřF UK a bez kterého bych výzkum nikdy nedokončila.

Dále děkuji prof. RNDr. Libuši Kolářové, CSc. za příležitost pracovat v NRL pro tkáňové helmintózy a poskytnutí cenných vzorků.

Mé poděkování patří celému helmintologickému týmu na Katedře parazitologie, zejména Mgr. Tomáši Macháčkovi, Ph.D. a Mgr. Romanu Leontovyčovi, Ph.D., za udržování přátelského pracovního prostředí a jejich ochotu s čímkoli a kdykoli pomoci. Také děkuji kolegovi RNDr. Honzovi Novákovi, Ph.D. z ÚIM 1. LF UK za obrovskou pomoc v začátcích, podporu po celou dobu studia a vždy pozitivní přístup k jakékoliv nesnázi.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově v projektech GAUK 902 217, SVV 260 520, SVV 260 369 a Progres Q25.

V neposlední řadě děkuji své rodině, Waltrovi, přátelům, kolegům a kočkám za psychickou podporu a toleranci během celého mého studia.

ABSTRAKT

Larvální toxokaróza je celosvětově rozšířená zoonóza vyskytující se v rozvinutých státech i zemích třetího světa. Původcem onemocnění jsou škrkavky rodu *Toxocara*, primárně střevní paraziti psů, koček a dalších šelem. Životoschopnými vajíčky, uvolněnými do prostředí se stolicí psa, se mohou nakazit nejen definitivní hostitelé, ale také hostitelé parateničtí, mezi které kromě mnoha obratlovců a některých bezobratlých patří i člověk. U člověka může migrace larev způsobit vážné a nenávratné poškození tkání, které je charakterizováno různými klinickými formami onemocnění.

Pro účely rutinní diagnostiky larvální toxokarózy je dosud nejčastěji využívanou metodou ELISA a Western blot, které umožňují průkaz reakce specifických protilátek s larválním exkrečně-sekrečním produktem (TES). TES je pro účely diagnostiky získáván z larev kultivovaných larev v živném médiu. Příprava takové antigenní směsi je velmi pracná a v jednotlivých laboratořích se může lišit. Současný výzkum v oblasti diagnostiky larvální toxokarózy je proto zaměřen i na standardizaci sérodiagnostických postupů. Zásadní předpokladem je znalost detailního složení TES, zejména antigenních (proteinových) molekul. U *Toxocara canis* je však počet prací věnujících se charakterizaci TES produktů larev zatím stále velmi omezen.

Klíčová slova: *Toxocara canis*, larvální toxokaróza, TES, rekombinantní proteiny, séroprevalence

ABSTRACT

Larval toxocarosis is a worldwide widespread zoonosis occurring in developed countries as well as developing countries. The disease is caused by roundworms of the genus *Toxocara*, primarily intestinal parasites of dogs, cats and other animals. Viable eggs released into the environment with the dog's faeces can infect not only definitive hosts, but also paratenic hosts, which include many vertebrates, some invertebrates, and also humans. In humans, larval migration can cause severe and irreversible tissue damage, which is characterized by various clinical forms of the disease.

For the purposes of routine diagnosis of larval toxocarosis, the most frequently used method so far is ELISA and Western blot, which enable the reaction demonstration of specific antibodies with the larval excretory-secretory product (TES). TES is obtained for diagnostic purposes from larvae cultured in nutrient medium. The preparation of such an antigenic mixture is very laborious and may vary across the laboratories. Current research in the field of diagnosis of larval toxocarosis is therefore focused on the standardization of serodiagnostic procedures. A fundamental prerequisite is knowledge of the detailed composition of TES, especially antigenic (protein) molecules. However, the number of studies devoted to the characterization of larval TES products is still very limited.

Key words: *Toxocara canis*, larval toxocarosis, toxocariasis, TES, recombinant proteins, seroprevalence

OBSAH

1. ÚVOD.....	13
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	15
2.1 Škrkavka <i>Toxocara canis</i>	15
2.1.1 Životní cyklus.....	16
2.1.2 Larvální toxokaróza	19
2.1.2.1 Klinické formy	21
2.1.2.2 Terapie	26
2.1.2.3 Séroprevalence larvální toxokarózy.....	26
2.1.2.4 Regulace imunitní odpovědi u člověka.....	29
2.1.2.5 Laboratorní diagnostika	32
2.2 Funkční molekuly exkrementně-sekrecčních produktů larev <i>T. canis</i>	36
2.2.1 Proteinové molekuly exkrementně-sekrecčních produktů larev <i>T. canis</i>	37
2.2.1.1 Proteinové antigeny.....	39
2.2.1.2 Další potenciální proteinové antigeny.....	44
3 CÍLE PRÁCE.....	47
4 MATERIÁL A METODIKA	49
4.1 Publikace č. 1 – Séroprevalence larvální toxokarózy v České republice.....	49
4.1.1 Kultivace larev <i>T. canis</i> a příprava TES.....	49
4.1.2 Lidská séra.....	51
4.1.3 Imunologické metody	51
4.1.4 Statistická analýza	52
4.2 Publikace č. 2 – Antigenní proteiny exkrementně-sekrecčních produktů larev <i>Toxocara canis</i> a hodnocení jejich potenciálu pro imunodiagnostiku larvální toxokarózy	52
4.2.1 Myší a lidská séra	53
4.2.2 Separace proteinů	54

4.2.3 Bioinformatické analýzy	55
4.2.4 Molekulárně-biochemické analýzy	56
4.2.4.1 Schéma experimentu č. 1	56
4.2.4.2 Schéma experimentu č. 2	59
4.2.5 Imunologické metody	61
4.3 Publikace č. 3 – Infekce <i>Toxocara canis</i> zhoršuje průběh experimentální autoimunitní encefalomyelitidy u myši.....	63
4.3.1 Experimentální infekce myších hostitelů	63
4.3.2 Kultivace a infekce larvami <i>T. canis</i>	63
4.3.3 Indukce experimentální autoimunitní encefalomyelitidy	64
4.3.4 Odběr séra a izolace leukocytů z vybraných orgánů	64
4.3.5 Stanovení cytokinů	65
4.3.6 Statistická analýza	65
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	67
5.1 Publikace č. 1 – Séroprevalence larvální toxokarózy v České republice.....	67
5.1.1 Vyšetření pacienti.....	67
5.1.2 Celková séroprevalence a srovnání ženy vs. muži	67
5.1.3 Séroprevalence podle věkových kategorií.....	69
5.1.4 Séroprevalence v krajích ČR	70
5.1.5 Závěry publikace č. 1	71
5.2 Publikace č. 2 – Antigenní proteiny exkrečně-sekrečních produktů larev <i>Toxocara canis</i> a hodnocení jejich potenciálu pro imunodiagnostiku larvální toxokarózy	73
5.2.1 Výsledky hmotnostně-spektrometrické analýzy.....	73
5.2.2 Vybrané identifikované proteiny a proteinové skupiny	74
5.2.3 Výběr potenciálních antigenních proteinů.....	79
5.2.4 Sérologické testování vybraných rekombinantních antigenů.....	80
5.2.5 Závěry publikace č. 2	85

5.3	Publikace č. 3 – Infekce <i>Toxocara canis</i> zhoršuje průběh experimentální autoimunitní encefalomyelitidy u myší.....	86
5.3.1	Infekce <i>T. canis</i> a klinické příznaky EAE	86
5.3.2	Výsledky měření sérových cytokinů	88
5.3.3	Výsledky měření CD4+ T-lymfocytů a Tregs.....	89
5.3.4	Závěry publikace č. 3	92
6	ZÁVĚR.....	93
7	SEZNAM ZKRATEK	95
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	99
9	PŘÍLOHY	119
9.1	Publikace č. 1	119
9.2	Publikace č. 2	128
9.3	Publikace č. 3	137

1. ÚVOD

Toxocara canis (škrkavka psí) je primárně střevní parazit psů. Psi, jakožto definitivní hostitelé, jsou hlavním zdrojem infekce pro paratenické a náhodné hostitele, kdy vylučují do prostředí společně se stolicí vajíčka škrkavek. Člověk se nejčastěji nakazí pozřením vajíček s infekční larvou konzumací neomyté zeleniny, ovoce nebo vody obsahující kontaminované zbytky zeminy. Larvy se následně uvolňují z vajíčka ve střevech hostitele a migrují skrze krevní řečiště do různých tkání a orgánů, kde způsobují vážná a nenávratná poškození vnitřních orgánů. Toto onemocnění se u člověka nazývá larvální toxokaróza a celosvětově jí trpí cca 19 % populace (Rostami et al. 2019b).

Pro účely rutinní diagnostiky larvální toxokarózy jsou nejčastěji využívanými metodami ELISA a Western blot pro průkaz reakce specifických protilátek třídy IgG s *T. canis* exkrečně-sekrečním antigenem, který je získáván kultivací larev v živném médiu a jeho sběrem. Příprava takové antigenní směsi je velmi pracná a je omezena především z hlediska standardizace; mnohé komerční laboratoře jsou závislé na neustálém přísunu samic dospělých škrkavek, následné kultivaci larev a produkci vlastních antigenů. Jako problematická se jeví také neznalost přesného proteinového složení směsi získaných antigenů, které se s ohledem na podmínky zpracování může značně lišit. Další velkou nevýhodou je nízká specifita v oblastech, kde jsou zaznamenávány infekce jinými parazity, a dochází zde ke zkříženým reakcím a tím i zaznamenání falešných výsledků.

Současný výzkum související se zkvalitněním sérodiagnostických postupů by měl být orientován především na identifikaci jednotlivých specifických antigenů. Přestože mezi významnými antigeny byly charakterizovány i různé molekuly proteinů, tak komplexní zhodnocení proteinového složení exkrečně-sekrečních produktů s využitím hmotnostně-spektrometrických metod je prozatím na počátku výzkumu.

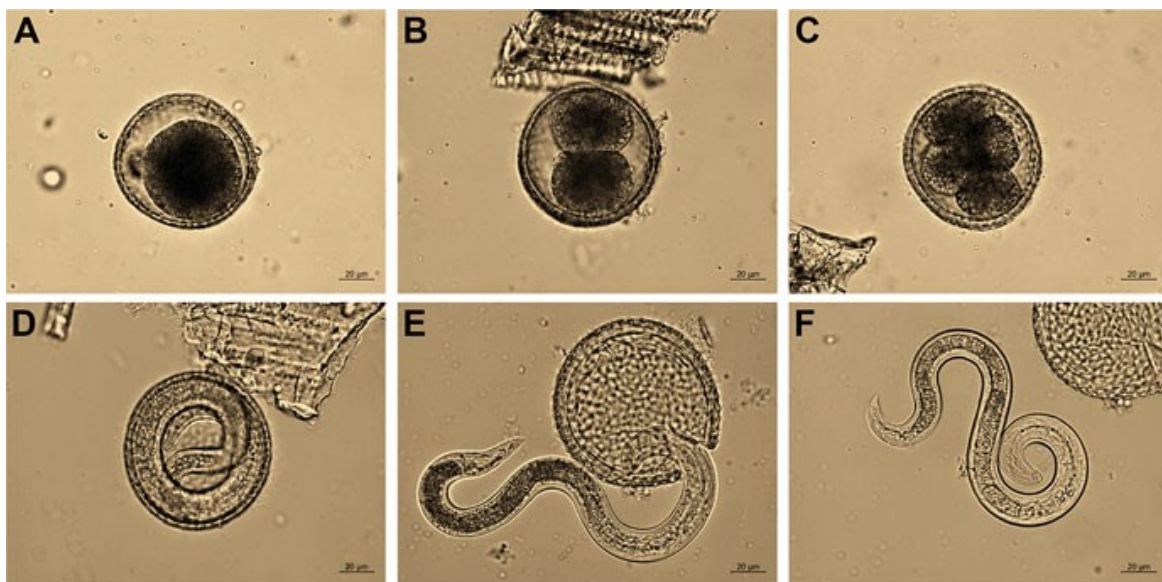
Hlavní náplní této disertační práce je proto rozšířit dosavadní poznatky a přinést nové informace ohledně proteinového složení exkrementně-sekrecních produktů infekčních larev *T. canis* a jejich možné aplikace v sérodiagnostice larvální toxokarózy. Tato práce se dále zabývá aktuální séroprevalencí larvální toxokarózy v České republice, předkládá dlouho potřebná aktuální data, která mohou přispět ke zlepšování mechanismů prevence nákazy. Práce se také věnuje zhodnocení infekce larvami *T. canis* u myší s indukovanou experimentální autoimunitní encefalomyelitidou a možného vlivu infekce na neurodegenerativní onemocnění u člověka. Předkládaná disertační práce je výsledkem geneze výzkumu v rámci studia larvální toxokarózy a zároveň snahou o propojení různorodých témat; právě tímto přispívá ke komplexnímu pohledu na problematiku onemocnění larvální toxokarózy.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Škrkavka *Toxocara canis*

Parazitické škrkavky rodu *Toxocara* Stiles, 1905 jsou tradičně taxonomicky řazeny do čeledi *Ascarididae* Blanchard, 1849, třídy *Secernentea* a kmene *Nematoda* Rudolphi, 1808. Rod v současnosti zahrnuje celkem 19 druhů (Bowman, 2020).

Toxocara canis Werner, 1782 (škrkavka psi) je gastrointestinální parazit psů a psovitých šelem. Dospělé hlístice jsou odděleného pohlaví, samice měří 6–18 cm a jsou delší než samci (4–10 cm). Tělo dospělců má kruhový průřez a je kryto několikavrstevnou kutikulou s cervikálními eliptickými křídélky (*alae*). Samci mají na kaudálním konci kutikulární prstovitý přívěsek (*digitiform appendage*) a ocasní křídélka (Schacher 1957; Glickman & Schantz 1981; Okulewicz et al. 2012).

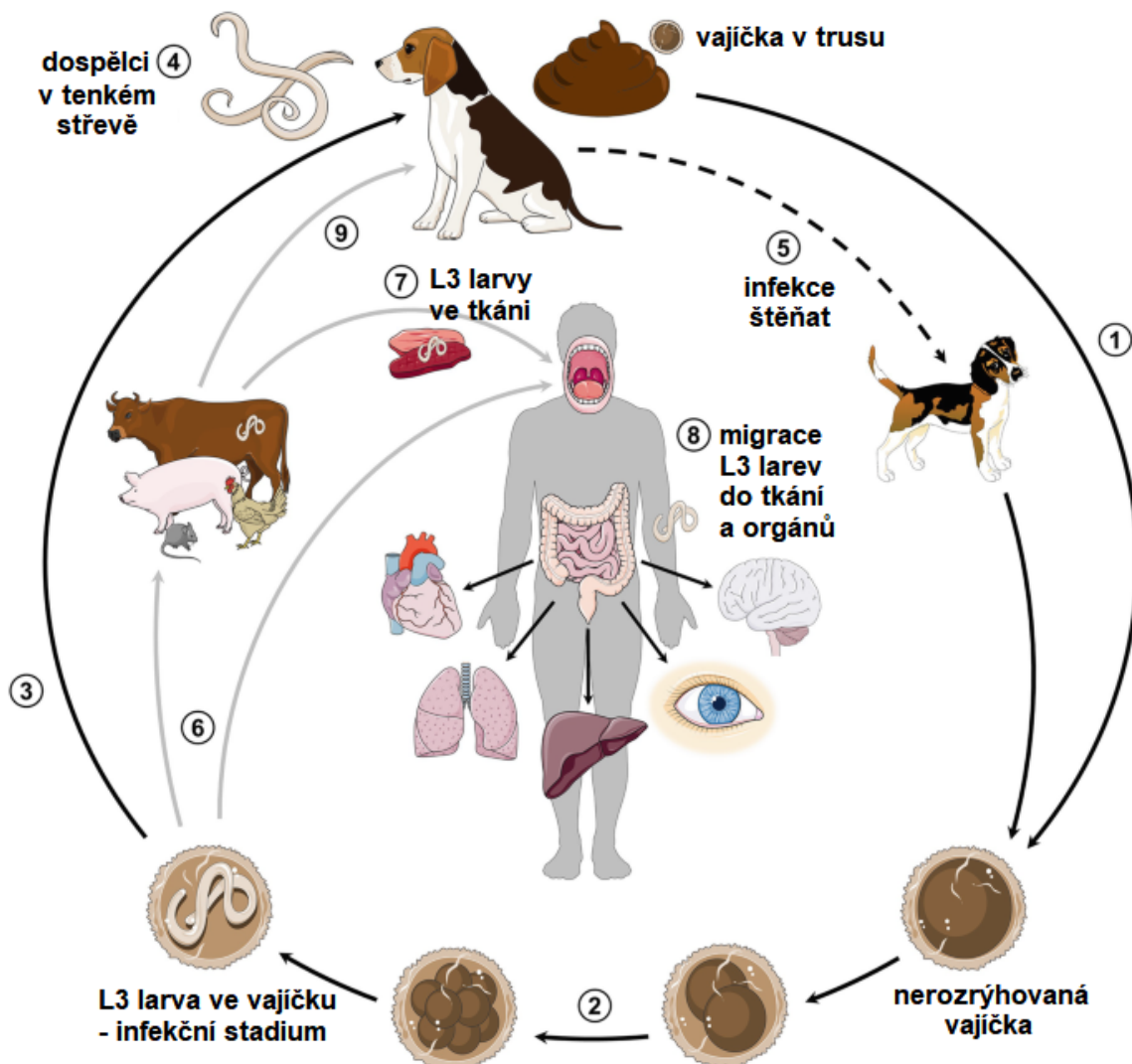


Obr. 1. Vývoj vajíčka *T. canis* do stadia infekční L3 larvy. A) jednobuněčné stadium, B) dvoubuněčné stadium, C) raná morula, D) vajíčko obsahující L3 larvu, E) vylíhnutí L3 larvy, F) infekční L3 larva. Měřítka 20 µm. Převzato z Waindok et al. (2021).

Vývoj dospělců probíhá z nerozrýhovaného vajíčka přes 4 larvální stadia (L1–L4), která jsou oddělena svlékáním staré a tvorbou nové kutikuly. Stadium L3 je infekční.

2.1.1 Životní cyklus

Životní cyklus *Toxocara canis* je komplikovaný, může být monoxenní, přímý (nezahrnuje mezihostitele) nebo heteroxenní, nepřímý (zahrnuje paratenického hostitele) (Obr. 2).



Obr. 2. Schéma životního cyklu *T. canis*. Nerozrýhovaná vajíčka se vylučují trusem definitivního hostitele (1). Vajíčka se během 1–4 týdnů rýhují v prostředí a stávají se

infekčními – obsahují larvu třetího stadia (L3) (2). Po požití vajíček definitivním hostitelem, se vylíhnou larvy, které proniknou stěnou střeva (3). U mladších psů larvy migrují plícemi, bronchiálním stromem a jícnem, kde jsou vykašlány a spolknuty – přenos do gastrointestinálního traktu; dospělí červi se vyvíjejí a produkují vajíčka v tenkém střevě (4). U starších psů se také může objevit infekce jako u mladších psů, ale larvy častěji migrují přes střevo do tkání, kde zůstanou v dormantním stadiu. U březích fen jsou tyto larvy reaktivovány a mohou infikovat mláďata transplacentární a transmammární cestou. U štěňat se následně vyvíjí dospělci s následnou produkcí vajíček (5). Larvy *T. canis* mohou být pozřeny náhodnými/paratenickými hostiteli (6). Larvy pronikají stěnou střeva a migrují do různých tkání, kde zůstanou v dormantním stadiu (7). Životní cyklus je dokončen, když definitivní hostitel zkonzumuje larvy v hostitelské tkáni a z larev se v tenkém střevě vyvinou dospělí červi (9). Lidé se mohou nakazit požitím infekčních vajíček (6) nebo nedostatečně tepelně upraveným masem/vnitřnostmi infikovaných paratenických hostitelů (7). Po požití se larvy vylíhnou a larvy pronikají střevní stěnou. Oběhem jsou přenášeny do různých tkání (8). Larvy v těchto místech neprocházejí žádným dalším vývojem, mohou však způsobit lokální reakce a mechanické poškození, které způsobí larvální toxokarózu. Upraveno dle Waindok et al. (2021).

Nerozřádaná vajíčka o velikosti 80–85 μm jsou vylučována do prostředí se stolicí definitivními hostiteli, především mladými psy. Ve vnějším prostředí probíhá rýhování vajíček, tvoří se larva, která se dvakrát svléká a vyvíjí se do stadia L3 – infekční larvy (Schnieder et al. 2011). Doba rýhování je závislá na teplotě a vlhkosti prostředí, v ideálním případě trvá 3–6 týdnů, může však trvat i několik měsíců až rok (Overgaauw & Nederland 1997).

Po pozření vajíček hostitelem se larvy líhnou do 2–4 hodin v duodenu. Uvolněné L3 larvy pronikají sliznicí střeva a po proniknutí do střevní stěny vstupují, tzv. hepato-pulmonární migrací, do lymfatického systému a migrují do mezenterických lymfatických uzlin, kde vstupují do žilních kapilár. Přes portální oběh jsou zaneseny do jater, kde část larev zůstává v jaterních kapilárách. Zbylé larvy játra opouštějí a přesouvají se do plic. Z plic se larvy mohou vydat dvěma různými cestami v závislosti na infekční dávce, věku a imunitním stavu infikovaných psů (Schnieder et al. 2011) .

U štěňat/mladých psů larvy vstupují do alveol, přes bronchioly jsou zaneseny do hltanu, kde jsou spolknuty a v malém střevě dokončují vývoj, resp. vyvíjí se dospělí jedinci. Pohlavní zralosti dosahují za 4–5 týdnů, kdy začínají produkovat vajíčka. Dospělé škrkavky žijí ve střevě cca 4 měsíce (Glickman & Schantz 1981; Bowman 2020).

U starších nebo již dříve infikovaných psů, probíhá tzv. somatická migrace. V takovém případě se larvy vrací do oběhu a jsou roznášeny krví do tkání (svaly) a orgánů (ledviny, játra, plíce, srdce a tkáň CNS), kde zůstávají opouzdřeny v dormantním stadiu (Glickman & Schantz 1981; Schnieder et al. 2011).

U březích fen může dojít k reaktivaci somatických larev a štěňata se mohou nakazit larvami *in utero*, resp. dochází k transplacentárnímu přenosu (intrauterinní infekce). Mechanismus reaktive larev není plně pochopen, nicméně pravděpodobně se jedná o změnu hormonálního profilu feny. Dospělé hlístice poté nalzáme u 14denních štěňat. Štěňata mohou být nakažena i z mateřského mléka a kolostra (transmammární přenos, laktogenní infekce). Larvy škrkavek mohou být přítomny v mléku až 38 dní po vrhu (Overgaauw & Nederland 1997; Schnieder et al. 2011).

Definitivní hostitelé se mohou nakazit i nepřímou cestou, a to přes paratenické hostitele, ve kterých se škrkavky nevyvíjí, ale slouží jako rezervoáry infekce. Paratenickými hostiteli

mohou být savci, ptáci, a dokonce i bezobratlí (Wu & Bowman 2020), kteří se nakazí náhodně z prostředí. U paratenických hostitelů probíhá somatická migrace, larvy L3 jsou životaschopné v dormantním stadiu přítomny ve tkáních a orgánech i několik let, pes/psovitá šelma se nakazí pozřením masa nakaženého zvířete (Strube et al. 2013).

2.1.2 Larvální toxokaróza

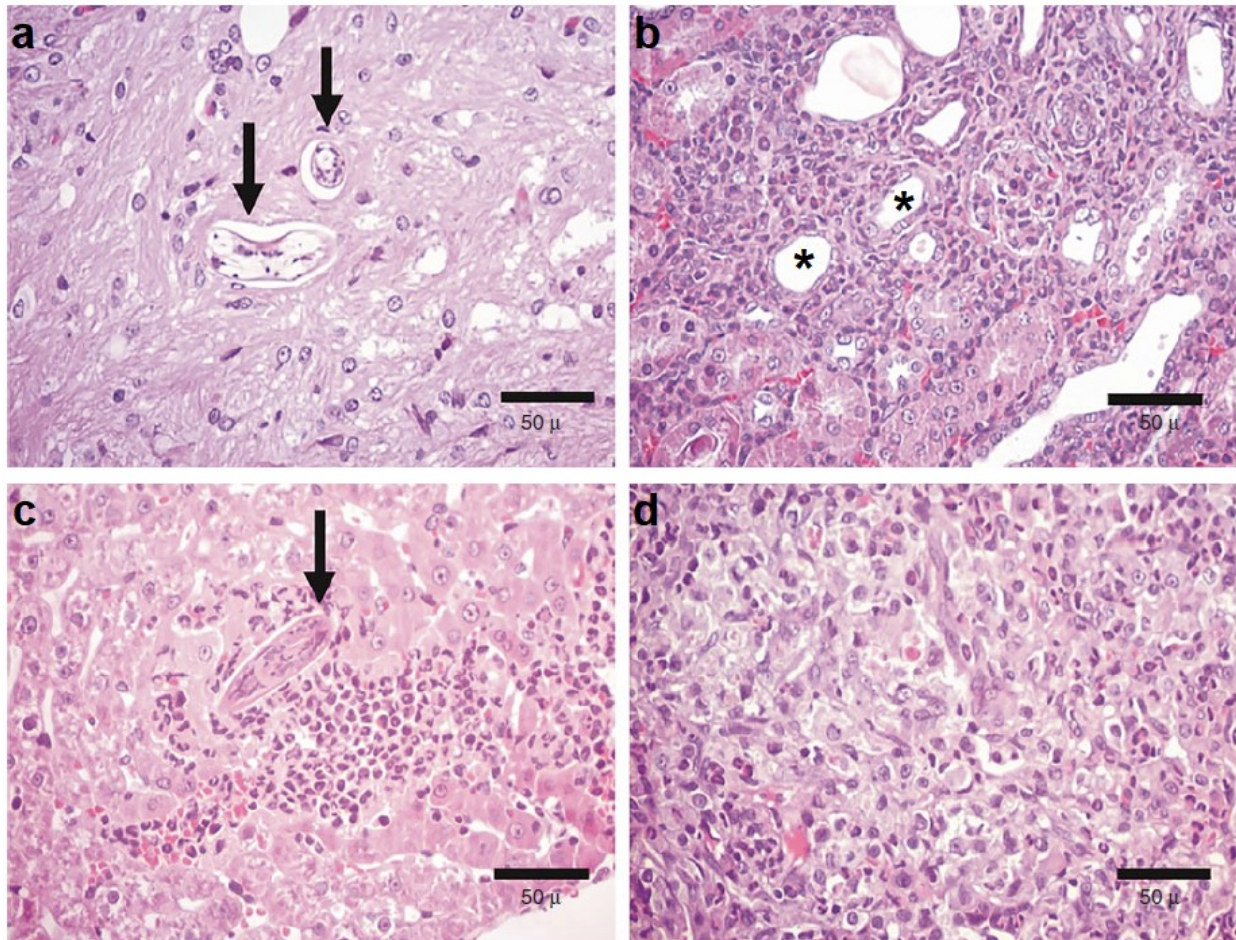
Lidská larvální toxokaróza je celosvětově rozšířená zoonotická tkáňová helmintóza vyskytující se v rozvojových i rozvinutých zemích světa. Podle CDC je v současné době infikováno téměř 2 miliardy lidí nematody rodu *Ascaris* sp., *Trichuris* sp. nebo *Ancylostoma/Necator* sp., tzv. STH – soil-transmitted helminths (Centers for Disease Control and Prevention, 2020). Z dalších zdrojů vyplývá, že do této skupiny nematodů STH jsou řazeni i zástupci rodu *Toxocara* sp. (Lynn et al. 2021). Ve světovém měřítku je však larvální toxokaróza většinou opomíjena i z důvodu často asymptomatického průběhu onemocnění či nedostatku statistických dat (Hotez 2020).

Původcem onemocnění jsou škrkavky *Toxocara* spp. primárně gastrointestinální paraziti psů, koček a dalších savců. Člověk se nakazí alimentární cestou, tj. náhodnou konzumací vajíček obsahujících larvu L3. Zdrojem nákazy pro člověka je nejčastěji kontaminovaná půda a voda nebo neomytá syrová zelenina (Overgaauw & van Knapen 2013). Vzácně pak k nákaze dochází i pozřením nedostatečně tepelně upraveného masa nebo vnitřností paratenických hostitelů, např. krav nebo drůbeže (Choi et al. 2008; Su Park et al. 2010). Vzácně může dojít k infekci i ze srsti domácích mazlíčků (Maurelli et al. 2019).

Člověk je náhodným hostitelem, nákaza u něj probíhá jako u paratenického hostitele, tzn. somatickou migrací larev. Larva L3 se v tenkém střevě uvolňuje z vajíčka a přes střevní stěnu

se dostává do krevního oběhu, migruje přes játra a plíce, odkud je dále zanášena do tkání a orgánů (Obr. 3).

Larva poté může aktivně migrovat po těle a zapouzdřit se ve tkáních a orgánech, v dalším vývoji již dále nepokračuje.



Obr. 3. Histopatologické změny ve vnitřních tkáních u paratenického hostitele (pískomil). Stav 15. den po infekci *T. canis*: a) mozek s intaktními larvami (šipky) bez zánětlivé reakce; b) ledvina s eozinofilními infiltráty mezi tubuly (*); c) játra s granulomy, eozinofily a makrofágy sousedícími s larvou (šipka) a d) 60. den po infekci, plicní tkáň s granulomy a velkým počtem eozinofilů. Barveno HE. Převzato z Flecher et al. (2016).

2.1.2.1 Klinické formy

Široké spektrum klinických a patologických změn u larvální toxokarózy, stejně jako četnost asymptomatických infekcí způsobují potíže při identifikaci i klasifikaci klinických případů onemocnění. Závažnost a rozsah nákazy je multifaktoriální, závisí na typu napadené tkáně, počtu migrujících larev a v neposlední řadě na imunitě a celkovém stavu hostitele.

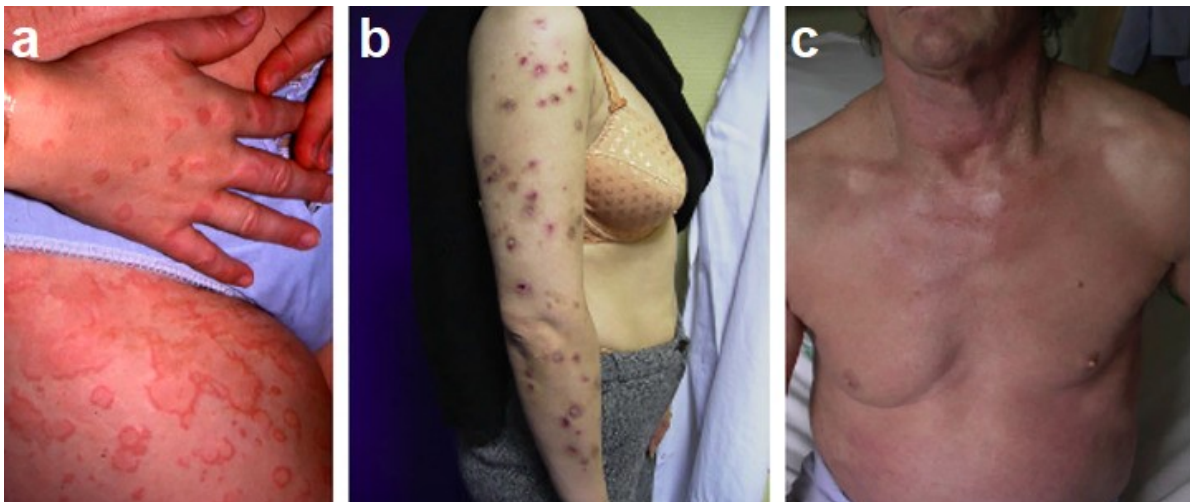
Existují 4 syndromy larvální toxokarózy: *visceral larva migrans* (VLM), *ocular larva migrans* (OLM), neurotoxokaróza (NT) a skrytá („covert“) toxokaróza (CT) (Magnaval et al. 2001; Fan et al. 2015) . Symptomy u každého z nich se liší (Obr. 4).

VLM	horečka, bolest břicha, kašel, sípání, pruritus, vyrážka, lymfadenopatie, hepatosplenomegalie, myokarditida, nefritida	↑↑↑ leukocytóza ↑↑↑ eozinofilie ↑↑↑ IgE + anti-<i>Toxocara</i> IgG
OLM	retinitida, uniokulární zrakové postižení, posterio/periferní granulom, uveitida, endoftalmitida, slepota	- leukocytóza - eozinofilie - IgE + anti-<i>Toxocara</i> IgG
NEURO-TOXOKARÓZA	horečka, bolest hlavy, meningitida, encefalitida, cerebrální vaskulitida, myelitida, epilepsie, neurodegenerativní onemocnění, kognitivní a vývojové opoždění	↑↑ leukocytóza ↑↑↑ eozinofilie ↑↑↑ IgE + anti-<i>Toxocara</i> IgG
SKRYTÁ TOXOKARÓZA	nepřespecifické příznaky, kožní příznaky (vyrážky, svědění), respirační příznaky (astma)	+/- leukocytóza +/- eozinofilie +/- IgE + anti-<i>Toxocara</i> IgG

Obr. 4. Klinické formy larvální toxokarózy. Přehled nejčastějších příznaků a laboratorních nálezů v séru. (↑) zvýšení parametru, (+) přítomnost parametru, (-) nepřítomnost parametru, (+/-) parametr může a nemusí být přítomen. Reference k tabulce v textu. Upraveno dle Rostami et al. (2019a).

VLM

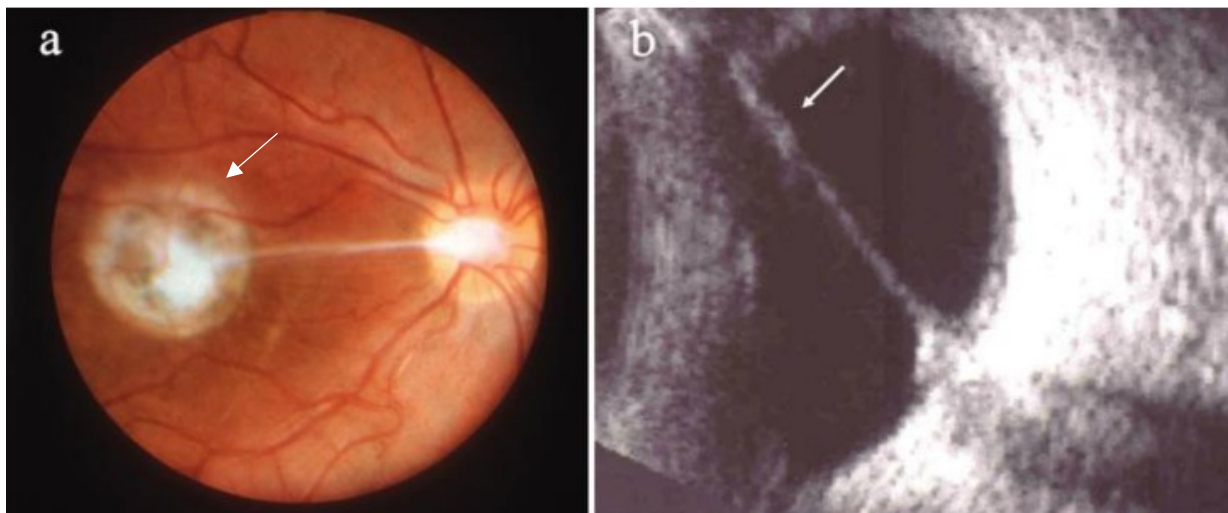
První případ VLM byl popsán u dvouletého chlapce s eozinofilií v roce 1947 (Perlingiero & Gyorgy 1947). Syndromem VLM častěji trpí děti ve věku 2–7 let s potvrzenou geofagií a kontaktem s rizikovými domácími mazlíčky (Glickman & Schantz 1981). Játra jsou nejčastěji postiženým orgánem a jsou spojována s tvorbou granulomatózních lézí obsahujících larvu v dormantním stavu. Dalšími napadenými orgány bývají ledviny, svaly, plíce a srdce (Obr. 3). Akutní příznaky VLM jsou obvykle spojené s hepato-pulmonární migrací larev. Symptomy často zahrnují bolest břicha, sníženou chuť k jídlu, neklid, horečku, respirační příznaky (kašel, sípání, dušnost, bronchospasmus, astma aj.), kožní příznaky (prurigo, urtikárie, ekzém aj.), hepatomegálii a únavu (Obr. 5). V laboratorní nálezů bývá přítomna leukocytóza, eozinofilie a hypergammaglobulinémie (Gavignet et al. 2008; Chen et al. 2018; Auer & Walochnik 2020).



Obr. 5. Kožní příznaky spojené se syndromem VLM larvální toxokarózy. a) kopřivka, b) chronické prurigo, c) diseminovaný ekzém. Upraveno z Gavignet et al. (2008).

OLM

Syndrom OLM se vyskytuje v 80 % u starších dětí mladších 16 let, ale je popisován také u dospělých. Bývá postiženo pouze jedno oko (Taylor 2001; Rubinsky-Elefant et al. 2010). Infekce OLM je spojována s nízkou infekční dávkou larev, tzv. larvální náloží (Glickman & Schantz 1981). Larva *T. canis* v oku nebo očním nervu zpočátku vyvolává eozinofilní odpověď – je obklopena eozinofily produkujícími eozinofilní absces/lézi (Obr. 6). Velikost zánětlivé reakce značně převyšuje velikost larvy, která ji obaluje. V dlouhodobých lézích nemusí být přítomny žádné zbytky larev, buď dojde ke zničení larvy, nebo larva migruje na jiné místo a v důsledku zbylých reziduí TES antigenu na původním místě dochází k dalšímu rozvoji zánětu (Taylor 2006). Nejčastějším příznakem je postupné zhoršování zraku s nástupem v dnů až týdnů, dalšími znaky může být strabismus, uveitida, leukokorie nebo zvláště u dětí retinoblastom (Taylor 2006; Rubinsky-Elefant et al. 2010). Oční infekce může být také subklinická a detekovaná pouze při rutinním očním vyšetření (Auer & Walochnik 2020). U infekce může být zvýšené celkové IgE, nicméně specifické anti-*Toxocara* protilátky a eozinofily nebývají v séru zvýšeny, pravděpodobně z důvodu nízké larvální nálože při infekci, která nedokáže vyvolat dostatečnou imunitní reakci (Glickman & Schantz 1981; Fillaux & Magnaval 2013; Ahn et al. 2014).



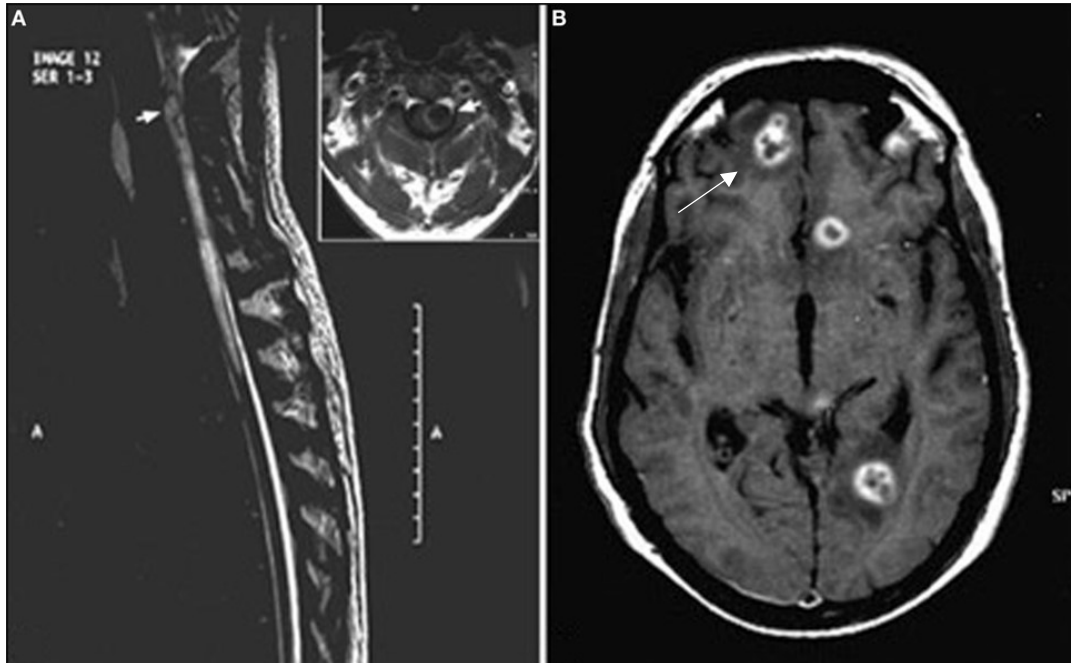
Obr. 6. Fundoskopické a ultrasonografické nálezy spojené se syndromem OLM.

a) periferní léze sítnice a sklivce s lokalizovanou masou bělavé tkáně zahrnující sítnici a periferní sklivec a fibrocelulární pás probíhající z periferie směrem k optickému nervu nebo zadní sítnici, b) sklivcový pás nebo membrána (šipka) táhnoucí se mezi zadním pólem a vysoce reflexní periferní hmotou. Převzato z Rubinsky-Elefant et al. (2010).

NT

Invaze larev L3 do CNS, případně do míchy a periferních nervů, se nazývá neurotoxokaróza. Onemocnění je u lidí poměrně vzácné, od roku 1950 až dodnes byly zaznamenány nižší stovky potvrzených případů, nicméně toto číslo může být značně podhodnocené, protože u experimentálních zvířat (např. u myší kmenů BALB/c and C57BL/6J) je afinita larev k CNS dobře zmapována (Fan et al. 2015; Auer & Walochnik 2020; Strube et al. 2020). Klinické příznaky NT u lidí jsou spojeny s encefalitidou, myelitidou, cerebrální vaskulitidou, eozinofilní meningoencefalitidou a dalšími neurologickými zánětlivými onemocněními (Obr. 7). Postižení pacienti mohou trpět bolestmi hlavy, přecitlivělostí na světlo, slabostí, ale také epilepsií nebo poruchami chování (Quattrocchi et al. 2012; Fan et al. 2015; Strube et

al. 2020). Diagnostika NT je založena na přítomnosti vysokého titru anti-*Toxocara* protilátek v séru nebo CSF, eozinofilie v séru nebo CSF a zobrazovacích technikách (Fan et al. 2015).



Obr. 7. Encefalomyelitida spojená s NT zobrazena pomocí magnetické rezonance. a) T2-vážený sagitální obraz páteře ukazující hyperintenzní lézi (šipka) s rozsáhlým perilezionálním edémem v horní části krční páteře, **b)** T1-vážený axiální postkontrastní snímek mozku ukazuje mnohočetné prstencové léze (šipka) v bilaterální frontoparietální bílé hmotě s nodulárním zesílením stěny pozorovaným v levé frontální lézi. Převzato z Sánchez et al. (2018).

CT

Skrytá toxokaróza je často doprovázena nespecifickými příznaky, např. bolest břicha a hlavy, nevolnost, zvýšená teplota, příznaky nachlazení, kožní obtíže apod. (Taylor et al. 1987; Fan et al. 2015). Tyto příznaky se liší u dětí i dospělých, proto tyto symptomy často nejsou přisuzovány parazitárnímu onemocnění. U pacientů jsou po několika týdnech přítomny titry

anti-*Toxocara* protilátek, může být přítomna eozinofilie a zvýšené hladiny celkového IgE (Chen et al. 2018; Ma et al. 2018).

Klinické formy larvální toxokarózy slouží především k orientaci v rozdílných symptomech pacientů, nicméně je vhodné podotknout, že v mnoha případech nákaza probíhá inaparentně, asymptomaticky (Pawlowski 2001; Lee et al. 2015; Bass et al. 2016).

2.1.2.2 Terapie

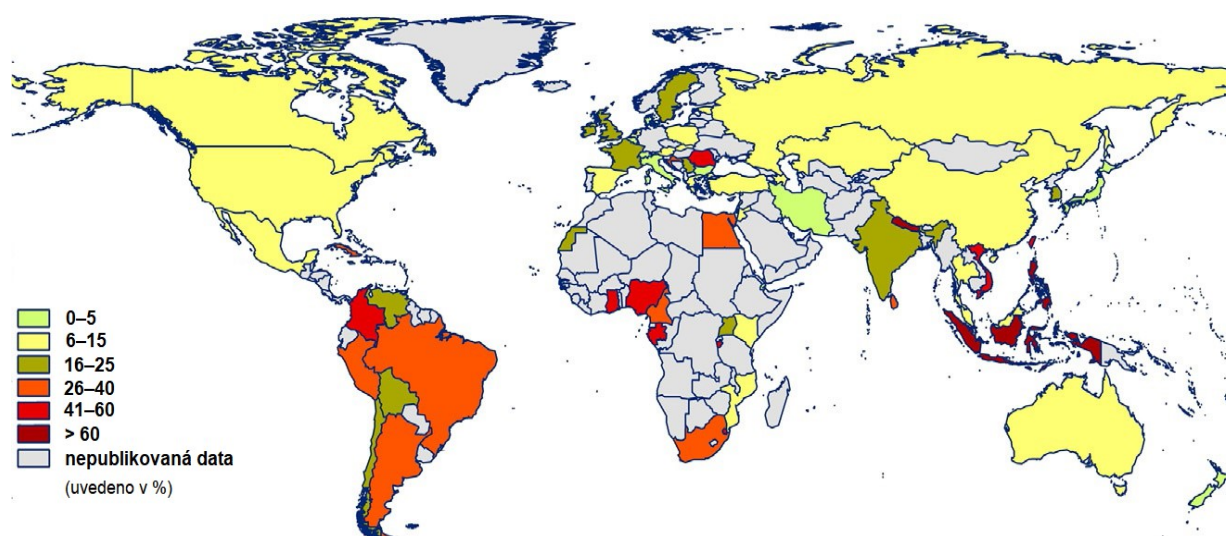
Léky první volby pro léčbu larvální toxokarózy jsou benzimidazoly (albendazol, mebendazol, thiabendazol). Diethylkarbamazin lze také použít, ale tato léčba je vhodná pouze pro akutní fázi infekce nebo k zabránění vstupu larev do nervového systému nebo očí. Léčba by měla být doplněna kortikosteroidy (obvykle v případech oční toxokarózy), protože rozkládající se granulomy obsahující larvy mohou způsobit zánětlivou reakci imunitního systému. Asymptomatická toxokaróza se obvykle neléčí a nespecifické symptomy, pokud jsou přítomny, odezní bez nutnosti medikamentózní léčby (Stejskal 2005; Kolářová 2006).

2.1.2.3 Séroprevalence larvální toxokarózy

Riziko infekce *Toxocara* spp. je multifaktoriální. Mimo globální klimatické a ekologické faktory, souvisí riziko nákazy také se socioekonomickou strukturou populace, bydlištěm v rurálních oblastech, kontakt se zvířaty, hygienickou politikou států, zdravotním stavem jednotlivců apod. (Rubinsky-Elefant et al. 2010).

V celosvětovém měřítku se séroprevalence larvální toxokarózy odhaduje na 19 % (Rostami et al. 2019b), nicméně séroprevalence larvální toxokarózy se mezi jednotlivými zeměmi značně

liší (Obr. 8). Nejvyšší průměrná séroprevalence byla pozorována v Africe (37,7 %) a Jižní Americe (34,1 %), na kontinentech s teplým a vlhkým klimatem a vysokou hustotou zalidnění, např. v Brazílii dosahuje séroprevalence 46,3 % (Dattoli et al. 2011; Rostami et al. 2019b). Nicméně v zemích Jihovýchodní Asie dosahuje séroprevalence jedny z nejvyšších počtů nakažených, např. v Indonésii dosahuje séroprevalence až 84,6 % (Hayashi et al. 2005). Extrémním příkladem je ostrov Réunion se séroprevalencí 92,8 % (Magnaival et al. 1994).



Obr. 8. Celosvětová séroprevalence larvální toxokarózy. Míra séroprevalence lidské toxokarózy byla odhadnuta pro všechny kontinenty – Afrika (38 %), jihovýchodní Asie (34 %), Jižní Amerika (28 %), Severní Amerika (13 %) a Evropa (11 %). Upraveno z Ma et al. (2020).

Naopak nejnižší průměrná séroprevalence 10,5 % byla pozorována v Evropě (Rostami et al. 2019b). V chladných oblastech Evropy, např. Dánsko 2,4 %, je séroprevalence nízká (Stensvold et al. 2009). Nízká séroprevalence byla pozorována i v Rakousku (1,4–3,7 %) nebo Švýcarsku (2,7-6,5 %) (Deutz et al. 2005; Sager et al. 2006). Naopak v Rumunsku nebo

Španělsku dosahuje průměrná séroprevalence až 30 % (Gonzalez-Quintela et al. 2006; Neghina et al. 2011). Obecně lze shrnout, že nízká séroprevalence v evropských zemích souvisí spíše se socioekonomickými faktory, hygienickou a epidemiologickou osvětou a právně danými předpisy.

V České republice larvální toxokaróza patří mezi autochtonní, ale i nezdřídka importované nákazy a dle současných záznamů je nejčastěji diagnostikovanou tkáňovou helmintózou (Kolářová 2006). Séroprevalence larvální toxokarózy v české populaci byla relevantně zmonitorována v roce 1998 a to s výskytem anti-*Toxocara* IgG protilátek ve výši 18–20 % (Uhlíková & Hübner 1998). Poslední aktuální data však uvádějí séroprevalenci 3,6 % (Skulinová et al. 2020).

V rámci sociologických faktorů je nejvyšší riziko nákazy u dětí (Ma et al. 2020). To potvrzuje i metaanalýza kolektivu Rostami et al. (2019b), kde nízký věk získal nejvyšší skóre rizika v rámci sociodemografických faktorů. To lze interpretovat tak, že děti mají častější kontakt s půdou a domácími zvířaty, a zároveň mají nižší míru osobní hygieny (Rostami et al. 2019b).

Faktory, jako práce se zvířaty nebo častý kontakt s kontaminovanou půdou, byly několikrát potvrzeny jako významné faktory rizika infekce (Deutz et al. 2005; Won et al. 2008; Jarosz et al. 2010; Lassen et al. 2016). Ve studii Deutz et al. (2005) z Rakouska zaznamenali autoři nejvyšší séroprevalenci u farmářů (44 %), následně u veterinářů (27 %), pracovníků jatek (25 %) a lovců/myslivců (17 %). V kontrolní skupině byla séroprevalence pouhá 2 %. To může souviset i se zjištěním, že mužské pohlaví je asociováno s vyšším rizikem infekce (Rostami et al. 2019b).

I přesto, že výzkumu séroprevalence larvální toxokarózy (*T. canis*) je věnována značná pozornost, tak stále existují mezi jednotlivými studiemi určité rozdíly, které je důležité brát na vědomí při srovnávání dostupných dat a informací. Získaná data pro odhady jednotlivých

séroprevalencí nikdy nejsou porovnatelná – mohou obsahovat různé věkové kohorty, konkrétní oblast/region s určitými specifiky ve srovnání se zbytkem země, zaměření na určitou sociodemografickou skupinu, počet vzorků ve studii, použité metody pro stanovení hladiny protilátek apod. (Ma et al. 2020). S posledním jmenovaným souvisí, že i přes veškerou snahu a současný stav poznání, nelze spolehlivě rozlišit akutní a chronickou infekci. Existuje mnoho studií, kde se autoři pokouší tuto situaci rozlišit na základě stanovení různých tříd imunoglobulinů, avidity, monitoringem biochemických a hematologických parametrů, použitím kombinace různých metod (Hübner et al. 2001; Fillaux & Magnaval 2013; Noordin et al. 2020). V návaznosti na tuto problematiku se stále nedaří spolehlivě rozlišit na základě detekce protilátek infekci larvami *T. canis* od ostatních druhů rodu *Toxocara* (*T. cati*, *T. malayensis* atd.) (Poulsen et al. 2015; Holland 2017). Výsledky jednotlivých séroepidemiologických studií mohou být zkreslené nejen nákazou různými druhy rodu *Toxocara*, ale také jinými druhy parazitů, které pozitivně/nеспецифicky reagují v užitých diagnostických metodách (Romasanta et al. 2003; Jin et al. 2015). Tyto zkřížené reaktivity nemusí být nutně způsobeny nákazou jinými organismy, ale také autoimunitními chorobami, jako je např. astma (Muñoz-Guzmán et al. 2010).

2.1.2.4 Regulace imunitní odpovědi u člověka

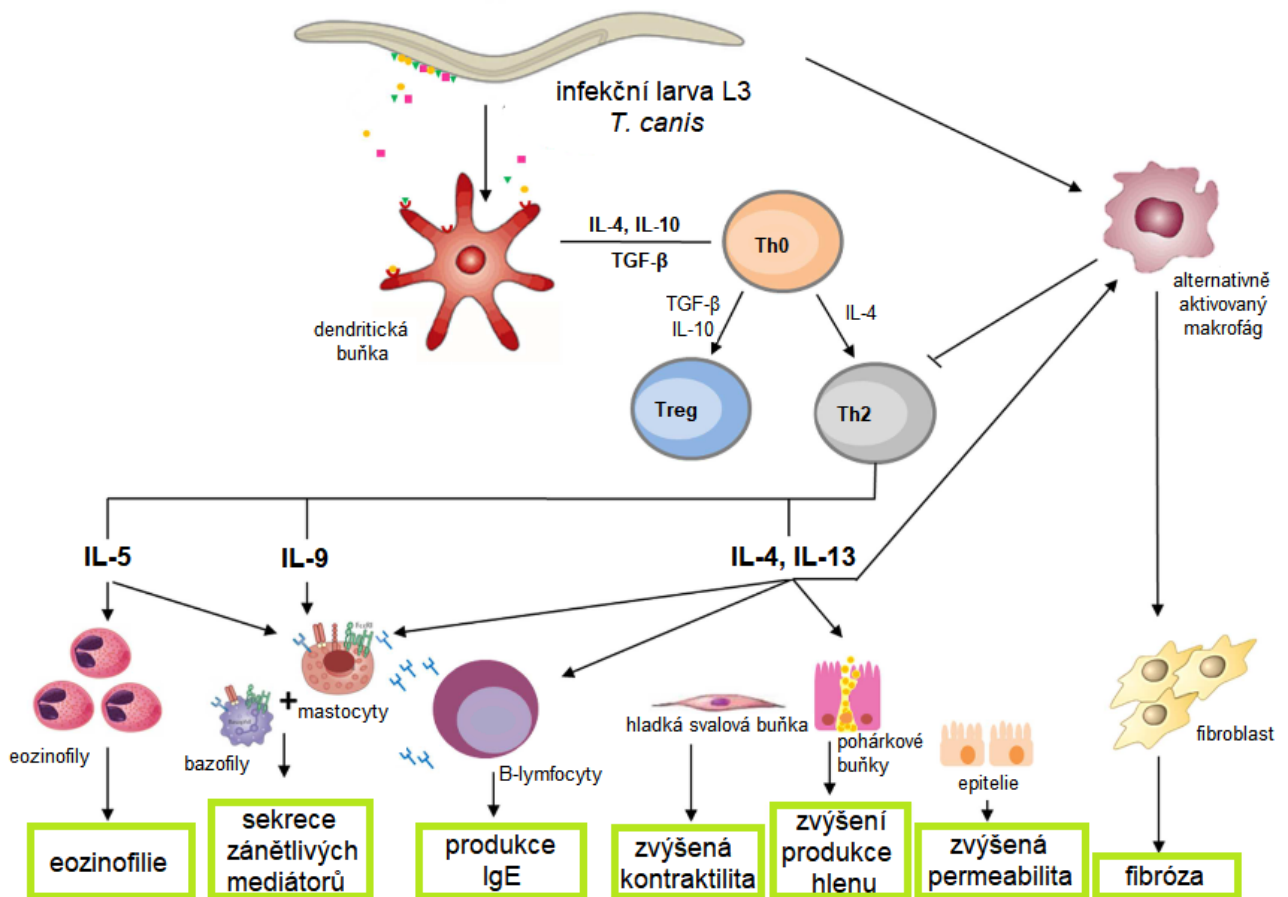
Interakce mezi larvami *T. canis* a imunitním systémem hostitele byly zkoumány v četných studiích především za použití hlodavců jako modelových organismů pro paratenické hostitele (Kusama et al. 1995; Pinelli et al. 2008; Resende et al. 2015). Larvy *T. canis* využívají četné strategie k regulaci imunitního systému hostitele a zajištění přežití larev v paratenickém hostiteli i po dobu několika let.

Ve chvíli, kdy se larvy vylíhnou z vaječných obalů, aktivují vrozenou imunologickou odpověď charakterizovanou leukocytózou, zejména neutrofilů, lymfocytů, bazofilů a

monocytů v krvi (Glickman & Summers 1983; Alba-Hurtado et al. 2014). V současnosti není znám přesný mechanismus rozpoznání larev *T. canis* systémem vrozené imunity, pro hlístice bylo definováno jen málo patogenem asociovaných molekulárních struktur (PAMP), ale jejich existenci v lze předpokládat na základě silné adaptivní imunitní reakce, která se u infekce larvami *T. canis* vyskytuje (Maizels 2013). Vazba PAMP a exkrečně-sekrečních produktů larev *T. canis* (TES) na receptory rozpoznávající patogeny dendritických buněk a dalších buněk prezentujících antigen generují signály nezbytné pro iniciaci adaptivní imunitní odpovědi (Abou-El-Naga & Mogahed 2023).

Hlavním rysem adaptivní imunitní odpovědi je imunitní reakce 2. typu, tzv. Th2 odpověď (Obr. 10) (Del Prete et al. 1991). Th2 odpověď je charakterizována tvorbou cytokinů IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13 produkovanými Th2 lymfocyty (CD4+ T-lymfocyty) a řadou imunitních buněk včetně eozinofilů, bazofilů, mastocytů a přirozených lymfoidních buněk aj. (Allen & Maizels 2011; Maizels 2013). Následně dochází k aktivaci humorální imunity založené na protilátkách, IL-4 podporuje diferenciaci B-lymfocytů, dochází k jejich proliferaci a indukuje izotypový přesmyk třídy protilátek a jejich produkci (celkových IgE i specifických anti-*Toxocara*). Zatímco IL-5 je hlavním diferenciačním faktorem pro eozinofily, které indukují přesun z kostní dřeně do infikovaných tkání, což je typická vlastnost humánní infekce larvami *T. canis* (Beaver et al. 1952; Takamoto et al. 1997; Maizels 2013). I když je eozinofilie pro larvální toxokarózu typická, jsou larvy vůči napadení eozinofily odolné, jak ukázaly pokusy na myších nadměrně exprimujících IL-5 s následnou hypereozinofilií (Dent et al. 1999). To pravděpodobně souvisí s tím, že larvy jsou schopny odvrhnout svůj antigenní povrch – eozinofily rychle přilnou k povrchu parazita a zatímco je larva během 24 h schopna uniknout z postiženého místa, eozinofily zůstávají připojeny k materiálu, který se jasně oddělil od povrchu (Fattah et al. 1986; Badley et al. 1987). Tento jev byl pozorován taktéž u neutrofilů a makrofágů (Lombardi et al. 1990).

Důležitou roli hrají kromě eozinofilů také makrofágy. V závislosti na svém okolním prostředí se makrofágy aktivují klasickou nebo alternativní cestou. Alternativně aktivované makrofágy, které jsou charakteristickým rysem polarizované Th2 odpovědi, mají protizánětlivé funkce při helmintární infekci, a jsou zprostředkovány sekrecí IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β (Jenkins & Allen 2010).



Obr. 10. Schéma imunitní Th2 reakce paratenického hostitele proti larvám *T. canis*.

Antigeny parazitů jsou rozpoznávány dendritickými buňkami, které působí jako buňky prezentující antigen pro T-lymfocyty. Uvolnění cytokinů IL-5, který spouští eozinofilii, a IL-4, IL-9, IL-13, vede k aktivaci bazofilů a mastocytů, které způsobují sekreci zánětlivých mediátorů. IL-4 a IL-13 zvyšují motilitu buněk hladkého svalstva, stimulují střevní propustnost a zvyšují sekreci hlenu pohárkovými buňkami. Tyto cytokiny dále podporují

diferenciaci alternativně aktivovaných makrofágů, které mohou inaktivovat produkci buněk Th1, Th2 nebo Th17 a v některých případech indukovat fibrózu ve tkáních. Upraveno z Montaner-Tarbes et al. (2014).

Ve chvíli, kdy se infekce dostává do chronické fáze, dochází ke zmírnění výše uvedených procesů, tzn. dochází ke zmírnění poškození hostitele. Na tomto procesu se podílí i samotné larvy *T. canis*, které uvolňují TES. Ten zahrnuje bohatou směs různých molekul, které se podílí nejen na invazi a úniku imunitnímu systému hostitele, ale také na jeho modulaci ve všech fázích infekce. TES je zodpovědný za imunitní regulaci hostitele tím, že indukuje regulační T-lymfocyty (Treg) produkující regulační cytokiny, např. IL-10 (Maizels 2013; Nutman 2015).

Pochopení molekulární podstaty interakce *T. canis*, či partikulárně TES, s imunitním systémem hostitele a hostitelskými proteiny, může významně rozšířit naše porozumění celému komplexnímu procesu infekce ve všech jejích fázích a tímto přispět i ke zpřesnění diagnostických metod.

2.1.2.5 Laboratorní diagnostika

Diagnóza larvální toxokarózy je založena na klinickém obrazu, anamnéze, laboratorních testech a diagnostických technikách.

Biochemické, hematologické a imunologické parametry infekce

Nejvýraznější odezvu imunitního systému pozorujeme u VLM a NT syndromů při akutní fázi infekce, kdy larva aktivně migruje tkáněmi. V krevním obraze je přítomna leukocytóza ($30\text{--}60 \times 10^9/l$), v diferenciálním rozpočtu je pozorován výrazný nárůst eozinofilů. U VLM

byl zaznamenán počet eozinofilů až $10 \times 10^9/l$, u CT elevace dosahuje nižších hodnot ($1,5 \times 10^9/l$), u OLM je eozinofilie raritní (Fillaux & Magnaval 2013; Mazur-Melewska et al. 2020). Typickým znakem helmintární infekce je zvýšení hladiny celkového IgE (Johansson et al. 1968; Hogarth-Scott et al. 1969). Nicméně mechanismus regulace není zcela objasněn, spekuluje se, že celkové IgE má protektivní charakter proti infekci nematody (Mazur-Melewska et al. 2020). Hladinu celkového IgE lze využít k hodnocení účinnosti léčby, protože koreluje s aktivitou infekce (Obwaller et al. 1998).

Larvální toxokaróza indukuje Th2 imunitní odpověď, která spouští sekreci cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13 (Mazur-Melewska et al. 2020). Ty se podílejí na aktivaci mastocytů, eozinofilů a makrofágů a na sekreci vysokých hladin IgE. U VLM syndromu byly reportovány zvýšené markery zánětu, zejména CRP a sedimentace erytrocytů. Je popisována i mírná anémie. U OLM a CT jsou extrémní hodnoty vzácné (Magnaval et al. 2001). Základní přehled nejčastějších parametrů je uveden u Obr. 4.

Přímá diagnostika

Potvrzení kterékoliv z klinických forem umožňuje jedině přímý průkaz larvy v místě postižení. V tělních tekutinách jako je likvor nebo nitrooční tekutina lze pozorovat motilní larvu (Watthanakulpanich 2010; Fillaux & Magnaval 2013). Ve tkáních lze identifikovat larvu mikroskopicky na histopatologickém řezu zkušeným patologem (Kirchner & Altmann 1987). Kromě toho mohou být k vizualizaci granulomů v různých tkáních užitečné zobrazovací techniky, jako je ultrasonografie, počítačová tomografie a magnetická rezonance (Waindok et al. 2021). V současnosti je možné identifikovat larvu ze vzorku biopsie pomocí metody PCR (Smith & Noordin 2006). Všechny typy přímé diagnostiky souvisí s mírou náhody při odběru vzorku, zda je larva přítomna či nikoliv, proto se přímá diagnostika pro svou invazivní povahu, náročnost a nespolehlivost u lidí nepoužívá (Mazur-Melewska et

al. 2020). Nicméně v potravinářství se PCR uplatňuje jako screeningová metoda tkáňových helmintóz u vzorků tkání zvířat určených ke konzumaci, a to zejména v asijských zemích, kde se maso a vnitřnosti tradičně konzumují syrové (Wang et al. 2018).

Sérologická diagnostika

Pro účely rutinní diagnostiky larvální toxokarózy se nejčastěji využívá nepřímých sérologických vyšetření, a to zejména metod ELISA a Western blot (WB).

Zlatým standardem je nepřímá ELISA, kde se jako antigen používají exkrece-sekreční produkty L3 larev *T. canis* (TES) a detekují se protilátky typu IgG. Tato ELISA se vyznačuje vysokou mírou senzitivity, proto se pro potvrzení používá WB k vyloučení falešně pozitivních výsledků a případných zkřížených reakcí.

V zahraničí existuje několik výrobců komerčních diagnostických souprav (např. Cypress Diagnostics, Belgie; Abcam, Velká Británie), v tuzemsku existuje pouze jediná firma (TestLine Clinical Diagnostics, Česká republika), která vyrábí imunoenzymatické soupravy určené k diagnostice larvální toxokarózy v lidském séru a plazmě. Všechny jsou postaveny na principu detekce specifických protilátek zejména třídy IgG, kde jako antigen slouží nativní TES.

Nativní exkrece-sekreční produkty larev L3 *T. canis* určené pro sérodiagnostické aplikace jsou nejčastěji získávány kombinací *in vivo/in vitro* kultivace larev L3 v živném médiu (de Savigny et al. 1979). Příprava takové antigenní směsi je poměrně pracná a je omezena především z hlediska standardizace; mnohé komerční laboratoře jsou závislé na kultivaci vlastních škrkavek *T. canis*, produkci vlastních TES antigenů a vlastních kulturách larev škrkavek. Jako problematická se jeví také neznalost přesného proteinového složení směsi získaných TES, které se s ohledem na podmínky chovu a zpracování může značně lišit. Další

velkou nevýhodou využívání TES jako sérodiagnostického antigenu je nízká specifita v oblastech, kde jsou zaznamenávány časté infekce jinými nematody a kde může docházet ke zkříženým reakcím a tím i zaznamenání falešně pozitivních výsledků (Ishida et al. 2003; Romasanta et al. 2003).

Budoucnost laboratorní diagnostiky

V současnosti je výzkum zaměřen na optimalizaci těchto dvou metod – ELISA a WB, respektive na zvýšení senzitivity a specifity. Kromě nativního TES lze jako antigen použít homogenát L3 larev i dospělců, rekombinantní proteiny vyrobené *in vitro* v bakteriích či kvasinkách nebo dokonce samostatné sacharidové zbytky, glykany, synteticky oddělených od proteinů, na kterých byly navěšeny (Mohamad et al. 2009; Peixoto et al. 2011; Jin et al. 2013, 2015; Elefant et al. 2016; Dos Santos et al. 2018, Dos Santos et al. 2019; Raulf et al. 2020). Kromě celkového specifického IgG, lze použít i jednotlivé podtřídy (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (Noordin et al. 2005; Boldiš et al. 2015; Novák et al. 2017), případně protilátky třídy IgM (Peixoto et al. 2011), IgA (Elefant-Rubinsky et al. 2006) a IgE (MagnaVal et al. 1992). Všechny zmíněné možnosti je možné kombinovat, nicméně dalším stupněm je multiplexová analýza, kdy se na umělé mikropartikule navážou jednotlivé solubilní faktory, které jsou následně analyzovány (Anderson et al. 2015). Nejnovějším přístupem je užití nanoprotilátek, malých molekul složených pouze z variabilních domén těžkých řetězců protilátek se schopností vázání antigenů, objevených v krvi velbloudovitých. Mají vysokou afinitu i specifitu k antigenu, jsou stabilní a je možné je relativně jednoduše synteticky zkonstruovat a vzájemně propojovat (Muyldermans 2013). Nedávno proběhla studie o použití nanoprotilátek k detekci TES antigenu. Studie autorů Morales-Yanez (2019) prokázala použití tří nanoprotilátek, které byly specifické vůči TES složkám *T. canis* pomocí imunoblotů v sendvičové ELISE.

Zdokonalování diagnostiky larvální toxokarózy souvisí také se znalostí přesného složení TES, poznání antigenních, často proteinových, molekul a jejich standardizovanou produkcí, např. ve formě rekombinantních proteinů. Poznatky v oblasti proteinového složení TES jsou prozatím stále spíše limitované (Mohamad et al. 2009; Zahabiun et al. 2015; Yunus et al. 2017).

Využití rekombinantních antigenů by umožnilo standardizovanou neomezenou produkci diagnostického markeru, který by měl teoreticky zvýšit i senzitivitu a specificitu reakce. Rekombinantní antigeny nabízí také významný robustní diagnostický nástroj pro detekci protilátek proti larvální toxokaróze.

2.2 Funkční molekuly exkrečně-sekrecních produktů larev *T. canis*

Při migraci tělem hostitele infekční larva *T. canis* produkuje kutikulou a slinnými žlázami různé typy molekul do okolního prostředí. Soubor těchto různorodých molekul je nazýván *Toxocara* exkrečně-sekrecní produkt (TES). Tyto biomolekuly jsou odpovědné za specifické biologické funkce a mohou mít odlišné role v signalizaci, zánětu, invazi do tkáně a potlačení imunity. Mimo degradační aktivitu při průniku tkání produkuje larva molekuly, které se účastní interakcí mezi parazitem a hostitelem, mohou modulovat nebo zcela vyřadit části imunitního systému hostitele (Maizels et al. 2006). Těchto vlastností využili de Savigny et al. (1979), který jako první použil nativní TES jako antigen v imunoenzymatické analýze, čímž položil základní kámen ve výzkumu diagnostiky larvální toxokarózy.

Zatímco proteinové složky TES z infekčních larválních stadií, ale i dospělců *T. canis*, jsou primárním předmětem výzkumů, existuje zde zásadní nedostatek ve znalostech TES biomolekul neproteinové povahy. V tomto směru byla v TES larev potvrzena pouze přítomnost možných antigenních glykanů (Schabussova et al. 2007) a jediná další práce

zmiňuje kromě proteinů také další látky přítomné v ES, ale pouze u dospělců *T. canis*, např. kyseliny mléčná a jablečná nebo ribitol (Wangchuk et al. 2020). V současné době více prací na téma neproteinových biomolekul larválního TES neexistuje.

2.2.1 Proteinové molekuly exkrece-sekrečních produktů larev *T. canis*

Současný výzkum je zaměřen především na proteom TES infekčních larev *T. canis*, ale znalosti o jeho komplexním složení jsou stále omezené. Analýza TES pomocí SDS-PAGE ukázala, že nejabudantnější proteiny migrují při 26, 32, 45, 55, 70, 120 a 400 kDa (Maizels et al. 1984; Gems & Maizels 1996). Dosud bylo pozorováno, že proteom larev obsahuje funkčně odlišné třídy molekul, které pocházejí buď z jícnové žlázy, z níž je uvolňován sekret ústním otvorem, žláznaté exkreční buňky, která ústí do kutikuly exkrečním pórem anebo z povrchového pláště, který je volně připojen ke kutikule larev (Page et al. 1992b; Abou-El-Naga & Mogahed 2023). Vzhledem k migraci larev tkáněmi hostitelského organismu a jejich schopnosti tvořit dormantní stadia, která mohou přežívat ve tkáních po dlouhou dobu, je spíše pravděpodobné, že se některé z těchto molekul podílejí i na úniku před imunitním systémem hostitele (Zhu et al. 2015). Pomocí hmotnostně-spektrometrických metod Sperotto et al. (2017) a da Silva et al. (2018) poprvé nastínili komplexní proteinové složení TES včetně možných funkcí jednotlivých proteinů, které mohou být užitečné pro zlepšení diagnostiky či vývoj vakcín (Tab. 1 a Tab. 2).

Sample	Locus Tag	Uniprot	Protein
1	Tcan_00022	A0A0B2VX95	Collectin-12 ^{a,b}
1	Tcan_02769	A0A0B2VPW4	26 kDa secreted antigen ^a
1	Tcan_02129	A0A0B2UQZ7	26 kDa secreted antigen ^a
1	Tcan_12345	A0A0B2UWT5	26 kDa secreted antigen ^a
2	Tcan_16685	A0A0B2VM41	Heat shock protein 70 B2
2	Tcan_18436	A0A0B2VPD7	Actin-like protein 6A
3	Tcan_11699	A0A0B2V263	Exonuclease
3	Tcan_02977	A0A0B2VVS7	Cathepsin D
3	Tcan_13099	A0A0B2UU74	Uncharacterized protein
3	Tcan_12159	A0A0B2USX2	Troponin T
3	Tcan_03471	A0A0B2VJP6	XRP2
3	Tcan_00870	A0A0B2UR57	Uncharacterized protein
3	Tcan_08941	A0A0B2W0J9	Vesicle transport protein SFT2B
3	Tcan_12472	A0A0B2V7U2	Rab GTPase-binding effector protein 1
4	Tcan_17880	A0A0B2V229	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein
6	Tcan_00005	A0A0B2VZ20	26 kDa secreted antigen ^a
6	Tcan_06008	A0A0B2VLE8	Son of sevenless-like protein 1
6	Tcan_00004	A0A0B2VY50	26 kDa secreted antigen ^a
6	Tcan_15190	A0A0B2UVS3	26 kDa secreted antigen ^{a,c}

^a Secreted proteins.

^b TES32.

^c TES120.

Tab. 1. Proteiny *T. canis* identifikované ve vzorcích TES pomocí LC-MS/MS. Upraveno z Sperotto et al. (2017).

Description	Accession	MW (kDa)	SP	Molecular function	Biological Process
Heat shock 70 kDa	A0A0B2V5Y2	101	No	ATP binding	Unknown function
Myosin	A0A0B2W3E0	23	No	ATP binding and motor activity	Unknown function
Filamin-A	A0A0B2VIW2	238	No	Carbohydrate binding and transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity	Unknown function
Myosin, essential light chain	A0A0B2USP9	21	No	Calcium ion binding	Unknown function
Galectin	A0A0B2V054	30	No	Carbohydrate binding	Galactose metabolic process
Excretory/secretory C-type lectin TES-32	O44927	23	Yes	Carbohydrate binding	Unknown function
Histone H4	A0A0B2V2I6	11	No	Dna binding	Nucleosome assembly
Histone H2B	A0A0B2UPH8	13	No	Dna binding	Unknown function
Histone H2A	A0A0B2UQD6	13	No	Dna binding	Unknown function
Histone H3	A0A0B2V2I9	15	No	Dna binding	Unknown function
Glucose-6-phosphate isomerase	A0A0B2W5Z0	67	No	Glucose-6-phosphate isomerase activity	Gluconeogenesis and glycolytic process
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	A0A0B2V286	72	No	Gtp binding, kinase activity and phosphoenolpyruvate carboxykinase (gtp) activity	Gluconeogenesis
Elongation factor 1-alpha	A0A0B2W5Q7	50	No	Gtpase activity, gtp binding and translation elongation factor activity	Unknown function
Apolipoprotein	A0A0B2VHM0	349	No	Lipid transporter activity	Unknown function
26 kDa secreted antigen	A0A0B2UWT5	28	Yes	Lipid binding	Transport
Collectin-12	A0A0B2VX95	27	Yes	Lipid binding	Transport
Enolase	A0A0B2VEA6	47	No	Magnesium ion binding and phosphopyruvate hydratase activity	Glycolytic process
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	A0A0B2VI69	21	Yes	Metal ion binding and superoxide dismutase activity	Unknown function
Phosphoethanolamine N-methyltransferase 1	A0A0B2VTW9	30	No	Methyltransferase activity	Unknown function
Paramyosin	A0A0B2V6Q8	101	No	Motor activity	Unknown function
Tropomyosin	A0A0B2VDB8	31	No	Motor activity	Unknown function
Aspartyl protease inhibitor	A0A0B2V7F9	16	No	Peptidase activity	Unknown function
Phosphoglycerate kinase	A0A0B2V4Q8	66	No	Phosphoglycerate kinase activity	Glycolytic process
Protein disulfide-isomerase	A0A0B2UJM4	55	Yes	Protein disulfide isomerase activity	Cell redox homeostasis
Transthyretin-like protein 46	A0A0B2W0 × 7	19	Yes	Transthyretin-like family protein	Transport
Ancylostoma secreted protein	A0A0B2UP29	46	No	Unknown function	Unknown function
Ancylostoma secreted protein	A0A0B2VNW7	27	No	Unknown function	Unknown function
Major antigen	A0A0B2V6V1	24	No	Unknown function	Unknown function
Macrophage migration inhibitory factor-like protein	A0A0B2V8I5	20	No	Unknown function	Unknown function
Proteoglycan core protein	O76131	24	Yes	Unknown function	Unknown function

Tab. 2. Seznam nejabudantnějších proteinů identifikovaných v TES z *T. canis* pomocí LC-MS/MS. Identifikované proteiny byly kategorizovány podle jejich molekulární funkce a

biologického procesu z informací získaných z databáze Gene Ontology (UniProt). Upraveno z da Silva et al. (2018).

Kromě proteinů, které hrají důležitou roli v přežití parazitů v hostiteli, např. proteázy, nebo již známé a užívané antigeny, např. TES-26 – homolog podobný savčímu fosfatidyletanolamin vázajícímu proteinu, byly objeveny i proteiny bez doposud známé funkce, které by mohly sloužit jako potenciální antigeny (Sperotto et al. 2017; da Silva et al. 2018). Současný výzkum tedy souvisí s identifikací jednotlivých molekul TES a zkvalitněním sérodiagnostických postupů.

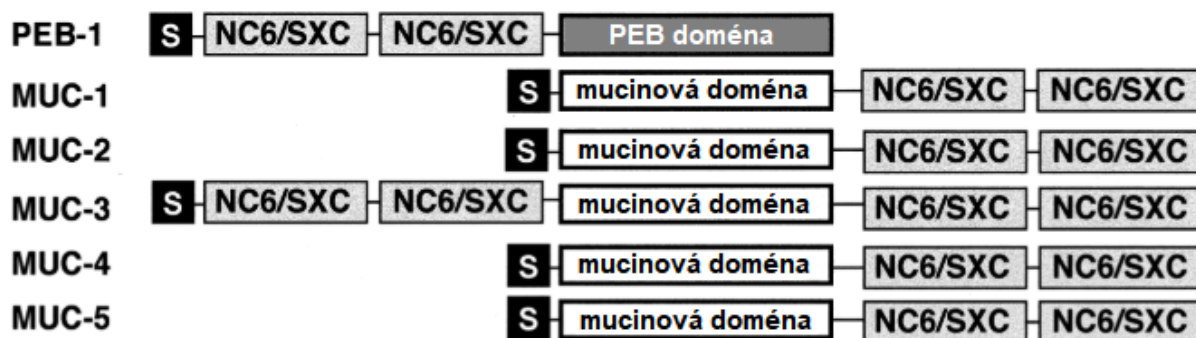
2.2.1.1 Proteinové antigeny

Tradiční názvosloví jednotlivých antigenních proteinů souvisí s jejich velikostí při elektroforetické separaci v polyakrylamidovém gelu – SDS-PAGE (velikost je udávána v kDa). U některých bylo následnými analýzami prokázáno, že mohou obsahovat i směs proteinů migrujících do stejné oblasti. Nejprobádanějšími jsou TES-120, TES-32 a TES-26.

TES-120

TES-120 je produkován kutikulou a patří mezi bohatě sekretované povrchové proteiny L3 larev (Page et al. 1992b). Je syntetizován v jícnu a sekrečních žlázách (Page et al. 1992a). Skládá se ze skupiny silně glykosylovaných proteinů nazývaných muciny. Hlavní úlohou mucinů je tvorba povrchového pláště larvy. Tato vrstva je neustále obnovována, svlékána a navázáním protilátek a eozinofilů se larva chrání před imunitním systémem (Page et al. 1992b). Muciny jsou glykoproteiny tvořené mnoha tandemovými repeticemi bohatými na serinové a threoninové zbytky, na kterých jsou O-vázané oligosacharidy. Neglykosylovanou část tvoří domény bohaté na cystein. Pro muciny i jiné proteiny toxokar je typická tzv. six-

cysteine doména (SXC nebo NC6), která obsahuje 36 aminokyselin, z toho 6 cysteinových zbytků a opakuje se ve 2–4 repetících v závislosti na typu mucinu. (Loukas et al. 2000b).



Obr. 11. Schematické znázornění SXC domén vybraných proteinů *T. canis*. PEB-1 – protein vázající fosfatidyletanolamin (TES-26) a MUC-1–5 – muciny ze skupiny proteinů TES-120. Všechny proteiny obsahují signální sekvenci (černý box s velkým S), domény SXC jsou ve stínovaných boxech, mucinové domény jsou v bílých boxech. Upraveno z Maizels et al. (2000).

Povrchové muciny L3 larev toxokar jsou při expozici imunitnímu systému pravidelně svlékány/odvrhovány, čímž larvy zabraňují adhezenci protilátek a dalších součástí hostitelova imunitního systému. Tento mechanismus funguje jako účinný nástroj obrany (Badley et al. 1987; Doedens et al. 2001). Zároveň existuje předpoklad, že muciny toxokar, resp. přítomné glykany, kompetují s hostitelskými sacharidy, aby zablokovaly infiltraci leukocytů do tkáně hostitele (Khoo et al. 1991; Doedens et al. 2001).

TES-120 se skládá minimálně ze 4 těsně migrujících mucinů, který je každý kódován svou mRNA (Tc-muc-1–4). První objevenou složkou byl Tc-MUC-1 bohatý na serinové zbytky a obsahující 2 SXC repetice na C-terminálním konci glykoproteinu (Gems & Maizels 1996). Tc-MUC-1 obsahuje signální peptid, ale neobsahuje transmembránovou doménu, což

naznačuje, že je sekretován do prostředí. Povrchové značení monoklonálními protilátkami L3 larev odhalilo, že Tc-MUC-1 je přítomen i na jejich povrchu (Page et al. 1992a; Page et al. 1992b; Loukas et al. 2000b). Ovlivňuje přenos signálu v makrofázích a podílí se na úniku imunitní odpovědi prostřednictvím účinku na makrofágy (Zhou et al. 2022).

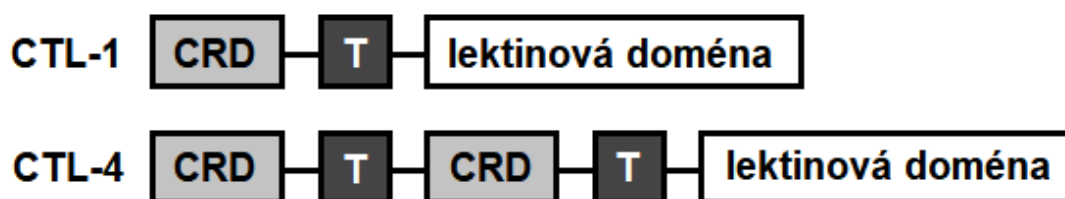
Dalšími popsány muciny v rámci TES-120 byly Tc-MUC-2–4 (Loukas et al. 2000b). U Tc-MUC-3 se předpokládá participace na spuštění/aktivaci vrozené imunitní reakce a podílí se na úniku imunitní odpovědi hostitele prostřednictvím interference tvorby granulí v neutrofilech (Długosz et al. 2021). U Tc-MUC-4 se mimo nízké míry exprese v laboratorních podmínkách předpokládá proteolytická aktivita (Loukas et al. 2000b; González-Páez et al. 2014).

Posledním identifikovaným mucinem je Tc-MUC-5, který je větší a má divergentnější sekvenci než ostatní muciny *T. canis* (Doedens et al. 2001). Aminokyselinové složení Tc-MUC-5 se liší od Tc-MUC-1–4 v množství lysinů, resp. Tc-MUC-1–4 neobsahují žádný lysinový zbytek. Na základě této skutečnosti Doedens et al. (2001) naznačují, že tento protein nemusí být součástí povrchových mucinů, tj. TES-120. Autoři dále zmiňují, že mucin Tc-MUC-5 nebyl dříve identifikován, protože může být pouze marginální součástí TES-120 nebo je sekretován pouze ve chvíli, kdy larva uniká imunitnímu systému.

TES-32

Poprvé popsán v roce 1984 metodou radiojodizace na povrchu larev a v TES (Maizels et al. 1984). Je exprimován v kutikule parazita a je jedním z hlavních povrchových proteinů L3 larev (Page et al. 1992a). Protein zahrnuje 219 aminokyselinových zbytků; jeho struktura je více podobná lektinům C-typu imunitního systému savců než homologu *Caenorhabditis elegans* (Loukas et al. 1999). Lektiny typu C (CTL) jsou skupinou proteinů, které se vážou na sacharidové epitopy v přítomnosti Ca^{2+} .

Prvním popsaným lektinem ze skupiny TES-32 je Tc-CTL-1 který je zároveň prvním popsaným lektinem C-typu u parazitického organismu (Loukas et al. 1999; Tetteh et al. 1999). Rozpoznávací doména sacharidu (CRD) Tc-CTL-1 obsahuje množství cysteinových aminokyselinových zbytků, která v prediktivních analýzách umožňuje širší rozsah ligandů než smyčky typické pro savčí lektiny, např. manózu-vázající receptor makrofágů nebo níže afinitní receptor CD23 na povrchu eozinofilů, lymfocytů a monocytů (Loukas et al. 1999; Tetteh et al. 1999). CRD doména proteinu Tc-CTL-1 vykazuje afinitu ke dvěma monosacharidům (N-acetylgalaktosamin a D-manóza) a je pravděpodobně bispecifickým lektinem (Loukas et al. 1999). Analýzou cDNA byly popsány částečné sekvence Tc-CTL-2 a Tc-CTL-3, které jsou variantami Tc-CTL-1 (Tetteh et al. 1999; Zhan et al. 2015). Čtvrtým popsaným lektinem je Tc-CTL-4, který se vyznačuje strukturální podobností s Tc-CTL-1. Vyznačuje se dvěma doménami obsahujícími primárně cysteinové aminokyselinové zbytky na N-terminálním konci a migruje ve velikosti kolem 70 kDa, proto je také nazýván TES-70 (Loukas et al. 2000a).



Obr. 12. Schematické znázornění srovnávací lektiny Tc-CTL-1 a Tc-CTL-4.

CRD – doména rozpoznávající sacharid bohatá na cystein, T – doména bohatá na threonin, lektinová doména C-typu v bílém boxu. Upraveno z (Maizels et al. 2001).

Funkce TES-32 a TES-70 jsou díky své podobnosti s receptory imunitních buněk hostitele pravděpodobně spojeny s únikem rozpoznávacího mechanismu imunitního systému hostitele,

tzn. plní významnou roli pro dlouhodobé přežití parazitů v hostitelské tkáni (Loukas et al. 1999; Maizels et al. 2000). Specificky Tc-CTL-1 interaguje s regulačními mechanismy imunitní reakce, konkrétně pomocí stimulace produkce cytokinu Il-10. Také se účastní inhibice prozánětlivých cytokinů (Długosz et al. 2021; Shahbakhsh et al. 2022).

TES-26

Poprvé popsán v roce 1995 a je homologem savčího fosfatidyletanolamin vázajícího proteinu (PEBP – phosphatidylethanolamin binding-like protein) s N-terminální párovou doménou SXC (Gems et al. 1995; Maizels et al. 2000).

Jedná se protein, který se vyskytuje pouze u L3 larev *T. canis*, u dospělých červů nebyla mRNA pro tento protein nalezena (Gems et al. 1995). Navzdory podobnostem v rámci PEBP skupiny proteinů s jinými organismy má TES-26 četné odlišnosti. TES-26 má párovou doménu SXC, což naznačuje, že jde o hybridní gen složený z domén různého původu (Gems et al. 1995). Protein má dále hydrofobní doménu s 20 aminokyselinovými zbytky, která odděluje párové SXC domény od oblasti homologie PEBP. To by mohlo naznačit, že se jedná o membránový protein, nicméně přítomnost signálního peptidu dále naznačuje, že může sloužit k nasměrování PEBP na povrch larev, a tak možnosti jeho sekrece do vnějšího prostředí parazita, kde může mít imunomodulační funkci (Gems et al. 1995).

Funkce TES-26 jsou stále předmětem výzkumu. Jednou z funkcí by mohla být participace na příjmu lipidů, protože parazitické helminti obecně mají omezenou schopnost syntetizovat mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a cholesterol *de novo* (Gems et al. 1995). Dále by mohl být protein asociován s transportem/vazbou lipidů do různých kompartmentů; tuto teorii podporuje fakt, že povrch larev *T. canis* je tvořen nedifuzními, nespojitými lipidovými doménami (Gems et al. 1995). Mohl by pomoci při imunitním úniku svým účinkem na adaptivní imunitní odpověď snížením přenosu lytických granulí v cytotoxických T-

lymfocytech (Długosz et al. 2021). TES-26 má podobnou konformaci jako serinová proteáza a byla u něj popsána proteolytická aktivita proti lamininu (González-Páez et al. 2014).

2.2.1.2 Další potenciální proteinové antigeny

Jak již bylo řečeno, antigenní komponenty TES jsou zkoumány omezeným způsobem a znalosti složení TES *T. canis* jsou stále limitované. Mezi molekuly, které mají zásadní význam v biologických procesech parazita, z nichž mnohé se mohou vyznačovat svou antigenicitou, jsou řazeny také proteázy, o jejichž významu pro *T. canis* toho není doposud mnoho známo. Kromě aktivní role proteolytických enzymů při líhnutí larev z vajíček jsou proteázy považovány za rozhodující faktor pro tkáňovou invazi, extracelulární trávení hostitelských proteinů při migraci larev orgány a pravděpodobně i modulaci imunitního systému hostitele. Z dosavadních zjištění vyplývá, že i některé antigenní proteiny mohou mít proteolytickou aktivitu (González-Páez et al. 2014).

Serinové proteázy

Bylo zjištěno, že v TES larev *T. canis* jsou zastoupeny především serinové proteázy (Abou-El-Naga et al. 2022). Kolektiv Robertson et al. (1989) na základě *in vitro* inkubace L3 larev s extracelulární matrix buněčné linie hladkého svalstva potkana objevili dvě serinové proteázy, které proteolyticky štěpí elastiny, kolageny a fibronektin. Na tento výzkum navázali González-Páez et al. (2014), kteří po gelové elektroforéze TES popsali proteolytickou aktivitu ve velikostech 400, 120 a 32 kDa vůči albuminu a IgG, které reprezentovaly složky krve, a fibronektinu a lamininu, reprezentujících extracelulární matrix, čímž rozšířili předchozí pozorování. Ze zjištění obou studií vyplývá, že maximální aktivita proteáz v TES je při

alkalickém pH a je v souladu se schopností larev migrovat krví a různými tkáněmi jejich hostitelů (Abou-El-Naga et al. 2022).

Cysteinové proteázy

Ze skupiny cysteinových proteáz byla poprvé identifikována Tc-CPL-1, proteáza se sekvenční podobností ke katepsinu L filárie *Brugia pahangi*. Homolog katepsinu L *T. canis* je neobvyklý v tom, že má substrátovou specifitu více připomínající aktivitu katepsinu B, ačkoli jeho sekvence mimo aktivní místo je mnohem příbuznější podskupině katepsinů L (Loukas et al. 1998). Druhá popsaná cysteinová proteáza – Tc-CPZ-1 – má vysokou úroveň podobnosti s lidským katepsinem Z. Podskupina katepsinů Z představuje relativně novou skupinu v rámci C1 cysteinových proteáz (Falcone et al. 2000). Funkce nejsou zatím zcela známé a tyto katepsiny byly prokázány u jiných hlístic, kde byla popsána jejich klíčová role v modulaci imunitní odpovědi hostitele, včetně proteolytické degradace invariantního řetězce MHC-II a regulace intracelulárního přenosu této molekuly (Williamson et al. 2003).

Analýzou genomu larev *T. canis* byl objeven také gen pro asparaginovou endopeptidázu (Tc-aep-1), nicméně samotný protein identifikován v TES prozatím nebyl (Maizels 2013).

3 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené disertační práce je rozšířit dosavadní poznatky a přinést nové informace ohledně proteinového složení exkrementálně-sekretčních produktů infekčních larev *T. canis* a jejich možné aplikace v sérodiagnostice larvální toxokarózy.

Hlavní cíle:

- Bude vypracována rešerše související s problematikou sérodiagnostiky *T. canis*.
- S využitím extraktů *T. canis* bude prověřena protilátková odpověď infikovaných hostitelů (ELISA a Western blot).
- Budou identifikovány dominantní proteinové antigeny v extraktech *T. canis* (hmotnostní spektrometrie).
- Některé z proteinových antigenů budou připraveny v rekombinantní formě a testovány jako potenciální sérodiagnostické markery.

4 MATERIÁL A METODIKA

Tato kapitola podává obecný přehled o základní aplikované experimentální metodice, vybavení a použitém materiálu.

Škrkavky *T. canis* z infikovaných psů byly získány ve spolupráci s útulky z okolí Prahy a Ostravy.

Všechny postupy provedené v předkládaných studiích byly v souladu s Helsinskou deklarací WMA – Etické zásady pro lékařský výzkum zahrnující lidské subjekty (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2013). Experimenty byly provedeny v přísném souladu s institucionálními směrnicemi a národními/EU zákony a směrnicemi o kvalitních životních podmínkách zvířat.

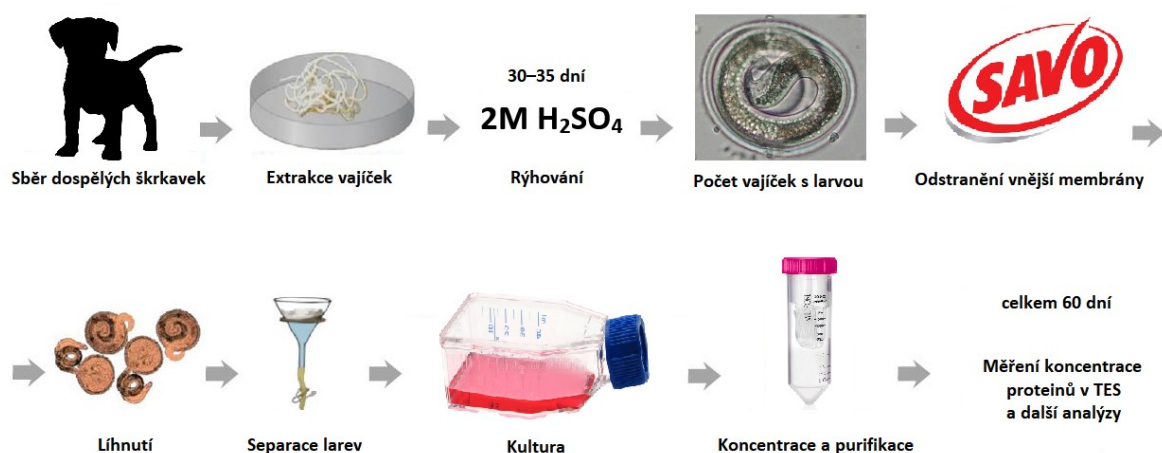
Všechny analýzy v předkládané práci byly zpracovány v laboratořích Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK (Praha), Národní referenční laboratoře pro tkáňové helmintózy VFN a 1. LF UK (Praha), Katedry parazitologie PřF UK (Praha) a Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR (Praha). Hmotnostně-spektrometrické analýzy byly zpracovány laboratoří CEITEC Proteomics Core Facility (Brno).

4.1 Publikace č. 1 – Séroprevalence larvální toxokarózy v České republice

4.1.1 Kultivace larev *T. canis* a příprava TES

Dospělé škrkavky byly izolovány z výkalů přirozeně infikovaných psů pomocí antiparazitika Drontal. Z omytých samic škrkavek byla vyextrahována vajíčka, která byla následně přefiltrována přes sítko a monofil do roztoku 2M H₂SO₄. Vajíčka takto zrála při laboratorní teplotě cca 4–6 týdnů v erlenách s vatovým uzávěrem. Rozrýhovaná vajíčka s larvou byla

zcentrifugována (500 g, 8 min) a supernatant odstraněn. Do sedimentu s vajíčky byl přidán 5% roztok $\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (inkubace 5 min) z důvodu odstranění vnější membrány a nečistot. Směs byla promyta 2x PBS (pH 7,3). Po posledním promytí byla vajíčka přenesena do kultivačního media RPMI 1640 s 100 IU/ml penicilinu a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycinu. Do směsi byly přidány sterilní skleněné kuličky, erleny byly umístěny na třepačku 2–5 minut, aby došlo k rozrušení obalů vajíček a vylíhnutí larev. Larvální suspenze byla přes noc umístěna do Baermannova aparátu se sítkem pro tkáňové kultury (Corning, VWR). Larvy aktivně migrovaly přes sítko do sběrné hadice, zatímco mrtvé larvy a vajíčka zůstaly na sítku. Druhý den byly larvy vypuštěny z hadice a nechaly se cca 60 min přirozeně sedimentovat. Supernatant byl odsán a nahrazen RPMI 1640 s antibiotiky. Larvy byly takto inkubovány v 37 °C v 5% CO_2 po dobu týdnů až měsíců. Počínaje dnem, kdy byly larvy extrahovány do média, byl TES sbírán denně po dobu následujících 14 dnů a poté jednou týdně po dobu několika měsíců. Po každém odběru byly produkty okamžitě koncentrovány (3 kDa Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Merck) a purifikovány do PBS (pH 7,3). V každém vzorku byla měřena koncentrace proteinu (Quant-iT Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Poté byly vzorky TES skladovány při -80 °C. Schéma pracovního postupu viz Obr. 13.



Obr. 13. Schéma přípravy TES. Upraveno dle Moreira et al. 2014.

4.1.2 Lidská séra

Celkem bylo analyzováno 4 428 vzorků sér pacientů získaných v průběhu let 2012–2016. Vzorky sér byly přijaty k rutinnímu vyšetření do NRL pro tkáňové helmintózy s podezřením na přítomnost tkáňových helmintóz od lékařů různých specializací z celé ČR.

4.1.3 Imunologické metody

Sérologické vyšetření bylo provedeno in-house metodou IgG ELISA s použitím TES antigenu larev *T. canis* dle protokolu NRL pro tkáňové helmintózy. Nunc Maxisorp 96jamkové mikrodestičky (Thermo Fisher Scientific) byly potaženy 100 μ l antigenu zředěného v bikarbonátovém pufru (pH 9,6) a inkubovány přes noc při 4 °C. Destičky byly 3x promyty PBS (pH 7,2) s 0,05 % Tween 20 (PBST) a bylo přidáno 100 μ l vzorků séra zředěných 1:200 (v PBST). Po 1 hodině inkubace při 37 °C byly destičky 3x promyty PBST, přidány sekundární kozí protilátky anti-lidského IgG značeného křenuvou peroxidázou (Calbiochem) zředěného v poměru 1:60 000 (100 μ l/jamka). Po 1 hodině inkubace při 37 °C byly destičky 3x promyty PBST. Reakce byla vizualizována přidáním 100 μ l substrátu (O-fenylendiamin) s 0,05 % H₂O₂ v citrátovém pufru (pH 5,0). Reakce byla zastavena po 15 minutách inkubace ve tmě při laboratorní teplotě přidáním 50 μ l 2M H₂SO₄ a optická denzita byla měřena spektrofotometricky při 490 nm (MR5000, Dynatech).

Vzorky identifikované jako *Toxocara* sp. pozitivní byly znovu testovány pomocí komerční soupravy ELISA a WB (TestLine Clinical Diagnostics) podle pokynů výrobce.

4.1.4 Statistická analýza

Do následných statistických analýz byly jako séropozitivní osoby zařazeny pouze vzorky pacientů pozitivních ve všech testech.

Pro získání anamnestických údajů pacientů, tj. jejich pohlaví, věku, bydliště, výsledků laboratorních nálezů a klinického stavu v době podezření na diagnózu larvální toxokarózy, byl do této studie zařazen dotazník, zaprotokolován a analyzován (Excel, MS Office 2010, Microsoft).

Pro analýzu rozdílů mezi muži a ženami na základě věku analyzován pomocí oboustranného Mann-Whitneyho neparametrického testu. Chí-kvadrát/Fisherův test byl použit k posouzení statistických rozdílů mezi muži a ženami v jednotlivých věkových skupinách. Hladina statistické významnosti pro testy byla stanovena na $P < 0,05$.

Všechny testy byly provedeny pomocí GraphPad Prism verze 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA).

4.2 Publikace č. 2 – Antigenní proteiny exkrementálně-sekrecčních produktů larev *Toxocara canis* a hodnocení jejich potenciálu pro imunodiagnostiku larvální toxokarózy

Kultivace larev *T. canis*, příprava TES a měření koncentrace proteinů ve směsi byla provedena totožným způsobem jako v kapitole 3.1.1. Pro experimenty k předkládané publikaci byly použity TES, které byly sbírány denně od vylíhnutí po dobu následujících 14 dnů.

4.2.1 Myši a lidská séra

Myší séra

Celkem 10 myši (BALB/cAnNCrw) bylo experimentálně infikováno různými infekčními dávkami larev L3 *T. canis*. Od myši bylo získáno 10 individuálních sér a 3 vzorky poolovaných sér.

Vzorky zahrnovaly 3 negativní/kontrolní séra myši, které nebyly infikovány (skupina L0), 3 pozitivní séra od jedinců infikovaných denně (po dobu 22 týdnů kromě víkendů) deseti larvami (skupina L10), 3 pozitivní séra od jedinců infikovaných týdně (po dobu 22 týdnů kromě víkendů) 100 larvami (skupina L100) a 1 pozitivní sérum od myši infikované dvakrát (primoinfekce v den 1 a reinfekce v den 14) 1000 larvami (skupina L1000). Poolovaná séra reprezentovala skupinu negativních myši, skupinu L10 a L100. Séra byla odebrána 86. den po první infekci.

Poolovaná séra byla použita pro primární screeningové analýzy k testování reaktivity antigenů.

Všechna myší séra byla získána z Ústavu imunologie a mikrobiologie (1. LF UK). S pokusnými zvířaty bylo nakládáno v souladu s příslušnou evropskou a českou legislativou.

Lidská séra

Pro analýzy bylo vybráno 10 vzorků vyšetřených na přítomnost protilátek IgG proti TES antigenu NRL pro tkáňové helmintózy. Tyto vzorky byly testovány pomocí in-house ELISA s následnou konfirmací ELISA a WB pomocí komerčních IVD validovaných souprav. Celkem byla použita tři negativní a sedm pozitivních sér.

Všechna lidská séra byla získána z NRL pro tkáňové helmintózy 1 LF UK a VFN.

4.2.2 Separace proteinů

Elektroforetická separace

TES produkty byly separovány pomocí SDS-PAGE (10% gel) a přeneseny metodou WB na PVDF membránu (Bio-Rad). Gely byly obarveny Commassie Brilliant Blue a Silver Stain Plus (Bio-Rad). Jako marker byl použit Precision Plus All Blue Protein Standard (Bio-Rad).

Gel SDS-PAGE se separovanými vzorky TES (odebranými v den 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 a 14 od vylíhnutí larev) a proužky WB inkubované s poolovanými myšimi negativními a pozitivními séry byly dokumentovány s využitím skeneru s vysokým rozlišením GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). Gely byly porovnány s výsledným WB za účelem identifikace imunogenní reakce proteinů distribuovaných v každém vzorku/dni. Na základě imunitní odpovědi na WB byly pro další analýzy vybrány proteinové pruhy s reakcí.

Kapalinová chromatografie kombinovaná s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Cílové proteiny s definovanou velikostí na gelu byly ručně vyříznuty, odbarveny, promyty a každý byl inkubován se 125 ng trypsinu (Promega) po dobu 2 hodin při 40 °C. Tryptické peptidové štěpy byly extrahovány z gelů 2,5% kyselinou mravenčí (FA) v 50% acetonitrilu (ACN) a následně zakoncentrovány ve vakuovém koncentrátoru SpeedVac (Thermo Fisher).

Kapalinová chromatografie kombinovaná s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) byla použita k analýze směsi peptidů pomocí systému RSLCnano (Thermo Fisher Scientific) online připojeného k hmotnostnímu spektrometru Impact II Ultra-High Resolution Qq-Time-Of-Flight s CaptiveSpray nanoBooster iontový zdroj (Bruker). Prohledávání iontů MS/MS bylo provedeno proti interním databázím: *T. canis* (Uniprot, 18 499 sekvencí, verze z 27. 11. 2017) a kontaminanty cRAP (na základě <http://www.thegpm.org/crap>).

Vytípané proteiny vybrané pro následné analýzy

Navazující analýzy probíhaly se 4 vybranými proteiny – Tc-*TES-26* (UniProt, acc. No. A0A0B2UIK8), Tc-*ASA* (UniProt, acc. No. A0A0B2VYF0), Tc-*PDP* (UniProt, acc. No. A0A0B2UUN4) a Tc-*ASP* (UniProt, acc. No. A0A0B2VNW7). Tyto proteiny byly vybrány na základě silné reaktivity s pozitivními myšími séry, nízké molekulové hmotnosti (24–32 kDa), zvýšení abundance během období sběru a dostatečného množství v nativním TES produktu. Varianta Tc-*TES-26* (A0A0B2UIK8) byla testována ve studii Mohamad et al. (2009).

4.2.3 Bioinformatické analýzy

Pomocí bioinformatických postupů byla získaná data 4 proteinů porovnána s genomem *T. canis* ve světových databázích UniProt a National Library of Medicine (BLAST). Získané nukleotidové a aminokyselinové sekvence funkčních molekul byly analyzovány pomocí datových nástrojů, mj. Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (Chojnacki, Cowley, Lee, Foix, & Lopez, 2017). Přítomnost signálního peptidu v aminokyselinových sekvencích byla předpovězena pomocí programu Signal IP 4.1 (Petersen, Brunak, Von Heijne, & Nielsen, 2011). Molekulová hmotnost a teoretický pI (izoelektrický bod) odvozených proteinů byly stanoveny softwarem Compute pI/Mw dostupným na webovém portálu ExPASy (Artimo et al., 2012). Následně byly navrženy primery pro nukleotidové sekvence vybraných proteinů bez části kódující signální peptid pomocí webového nástroje OligoAnalyzer™ Tool.

Funkce a význam jednotlivých proteinů byl predikován pomocí databáze UniProt a GO (gene ontology).

4.2.4 Molekulárně-biochemické analýzy

*Izolace RNA z larev *T. canis**

Larvy byly zcentrifugovány (50 g, 3 min, 25 °C) a 2x promyty PBS (pH 7,3). Následně byl přidán stabilizační roztok RNA – TRIzol (Thermo Scientific) a provedena mechanická homogenizace pomocí pístu, inkubace (5 min) při laboratorní teplotě, aby došlo k rozpuštění nukleoproteinových komplexů. Homogenát byl zcentrifugován (12,000 g, 10 min, 4 °C) a k supernatantu obsahujícímu larvální RNA byl přidán chloroform (20 µl chloroformu na 100 µl trizolu), směs byla intenzivně protřepána (20 s) a inkubována (3 min). Po zcentrifugování byla směs rozdělena na spodní červenou fenol-chloroformovou fázi, mezifázi a bezbarvou horní vodnou fázi, ve které se nacházela RNA. RNA byla precipitována pomocí izopropanolu (50 µl na 100 µl trizolu), inkubována a zcentrifugována (12,000 g, 10 min, 4 °C). Aby došlo k promytí RNA, byl přidán k peletu 75% etanol (100 µl na 100 µl trizolu), pelet byl zvortexován (10 s) a zcentrifugován (7,500 g 5 min, 4 °C). Supernatant byl odsán a zbytek etanolu byl samovolně odpařen z peletu ve sterilním prostředí. Následně byla RNA rozpuštěna v RNase-Free vodě (Qiagen). Čistota RNA byla zkontrolována na přístroji NanoDrop (Thermo Scientific). Vzorky byly následně přečištěny pomocí Turbo DNA-free kit (Thermo Scientific) a uchovány k dalšímu použití v –80 °C.

4.2.4.1 Schéma experimentu č. 1

Syntéza cDNA, PCR a navržení primerů

Komplementární DNA (cDNA) byla z celkové RNA získána reverzní transkripcí (použití RNA-dependentní DNA polymerázy) pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kitu (Roche) dle pokynů výrobce. cDNA byla v dalších analýzách využívána jako templát.

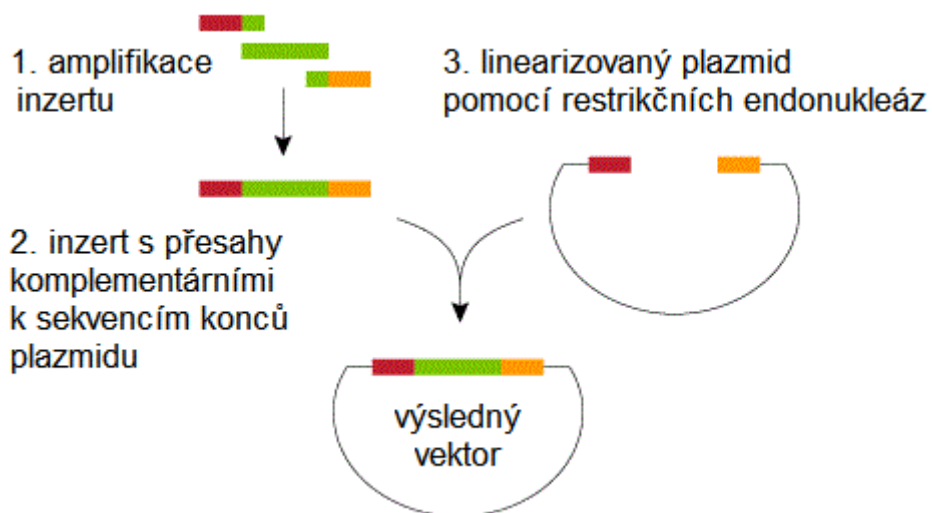
Pomocí navržených primárních primerů (Tab. 3) pro jednotlivé protein-kódující geny vyrobených firmou GeneScript a templátové cDNA byla provedena klasická PCR (primární denaturace 95 °C 5 min, 35 cyklů – 94 °C denaturace 60 s, 55 °C anealing 60 s, 72 °C extenze 60 s, finální extenze 72 °C 10 min) k potvrzení přítomnosti sekvencí vybraných molekul.

Název proteinu	Název primeru	Sekvence	BP (párů bazí)	Teplota anealingu (°C)
Tc-TES-26	TES26F	5' - ATGTCAGTTGTACACAAAGCTTGC	24	56,2
	TES26R	3' - TTAGGCCTGCGATCGATAGAAATT	24	56,2
Tc-ASA	UP3VYF0F	5' - ATGAGCCAAATCGCCATC	18	53,1
	UP3VYF0R	3' - TTATATCTGAGGAACCATACAGCCT	25	55,1
Tc-PDP	UP4UUN4F	5' - ATGGATCAAAGACGGTGACG	22	55,2
	UP4UUN4R	3' - CTAATTACACAGTTTCGGGCCTT	23	55,2
Tc-ASP	ASPVNW7F	5' - ATGAAGAGAATTGTATCGGTTGTAC	25	52,9
	ASPVNW7R	3' - TTACGGTGTCTCAGGCAAAG	18	52,5

Tab. 3. Sekvence primerů pro 4 vybrané proteiny ke confirmaci přítomnosti sekvencí v cDNA izolované z larev *T. canis*.

Klonování inzertu a transformace plazmidu

Následně byly k již navrženým primerům (Tab. 3) navrženy sekundární „klonovací“ primery, které obsahovaly sekvence restrikčních endonukleáz NcoI a XhoI komplementární ke koncům bakteriálního plazmidu pET28b (Obr. 14). Tyto extenze byly použity pro klonování inzertu do expresního vektorového plazmidu pomocí soupravy In-Fusion Cloning Kit (Clontech).



Obr. 14. Technologie In-Fusion. Schéma vložení inzeru do plazmidu pomocí technologie In-Fusion. Upraveno dle výrobce.

Sekvence konstruktů byla ověřena pomocí DNA Sangerova sekvenování. Výsledné plazmidy byly poté transformovány do expresních kompetentních bakteriálních buněk *E. coli* BL21 (Thermo Fisher) a očkované na plotny s LB agarem (1 % trypton, 0,5 % kvasnicový extrakt, 1 % NaCl, 1,5 % agar, dH₂O) obsahujícím selektivní antibiotikum kanamycin zamezující růstu buněk neobsahující vektor s inzertem (koncentrace 50 µg/ml).

Kultivace bakterií *E. coli* a indukce exprese

Odběry z kolonií bakterií *E. coli* BL21 obsahující expresní vektor s vybranými protein-kódujícími inserty byly očkované do tekutého LB média opět s 50 µg/ml kanamycinem. Buňky byly třepány při 37 °C, 180 rpm do získání požadované optické denzity (OD₆₀₀), měřeno pomocí přístroje Biochrom WPA S800+ Visible Spectrophotometer (Biochrom). Do LB bylo přidáno 0,5 mM IPTG (izopropyl β-D-1-tiogalaktopyranosid) k indukci exprese. Bakteriální kultura byla třepána přes noc (22 °C, 180 rpm) do druhého dne. Bakterie byly

zcentrifugovány (3000 rpm, 22 °C, 15 min) a výsledný pelet byl smíchán s lyzačním pufrem (10 mM Trise-Base, 200 mM NaCl, pH 8), pelet byl 20 minut v –80 °C, sonikován za nepřetržitého chlazení ledem po dobu 1 min (Vibra-Cell™ 72405) pro rozrušení bakteriálních buněk a centrifugován 1 h při 11 000 g. Pro ověření přítomnosti proteinu v supernatantu nebo peletu bylo provedeno SDS-PAGE.

Purifikace rekombinantních proteinů

Rekombinantní proteiny obsahující His-Tag byly následně přečištěny na purifikační koloně obsahující Ni²⁺ ionty (GE Healthcare Life Sciences). Rekombinanty byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie na koloně, která byla ekvilibrována v 50 mM 8 M urea, fosfátový pufr, 300 mM NaCl, pH 8,0. Eluce byla provedena pufrem 8 M urea, 50 mM fosfát, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8,0. Eluované rekombinantní proteiny byly zakoncentrovány, převedeny do fosfátového pufru, pH 7,6 na koncentrátoru Amicon Ultracel-10K (Millipore) a skladovány při –80 °C. Pro ověření přítomnosti rekombinantních proteinů ve vzorcích bylo provedeno SDS-PAGE a výsledné proteinové pruhy byly analyzovány pomocí LC-MS/MS.

Vzhledem k nízké koncentraci získaných proteinů byl navržen také alternativní postup celého experimentu, viz následující kapitola.

4.2.4.2 Schéma experimentu č. 2

Za účelem získání optimálního množství rekombinantních proteinů jsme přikročili ke spolupráci s komerční laboratoří EZBiolab a antigenní rTc-TES-26, rTc-ASA, rTc-PDP, rTc-ASP byly připraveny níže uvedeným způsobem.

Klonování inzertu, transformace plazmidu a exprese proteinů

Nukleotidové sekvence byly inzertovány do vektoru pET22b+ za použití restrikčních endonukleáz NdeI-XhoI, 6x His-tag byl inkorporován na C-konec každého proteinu. Konstrukty byly transformovány do *E. coli* BL21 (DE3) (General Biol). Přítomnost inzertů byla ověřena pomocí DNA Sangerova sekvenování. Exprese proteinu byla poté indukována přidáním 0,5 mM IPTG (VWR) a následnou inkubací při 37 °C po dobu 4 hodin.

Purifikace rekombinantních proteinů

Bakterie byly resuspendovány v pufru Tris-NaCl-8M Urea (pH 8,0). Roztok byl sonikován na ledu (Φ3, 3 s zapnuto/6 s vypnuto, 5 min), centrifugován při 10 000 g po dobu 10 min při 4 °C a přefiltrován přes 0,22 um filtr. Rekombinantní proteiny byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA matici (Bio-Rad), promyty pufrům PBS-8M Urea (pH 7,4) se zvyšujícími se koncentracemi imidazolu (20 mM–60 mM) a eluovány z kolony pomocí PBS – 8M močoviny pufr, 500mM imidazol (pH 7,4). Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí Enhanced BCA Protein Assay Kit (Beyotime). Odhadovaná čistota byla >80 %.

Všechny proteinové antigeny (rTc-TES-26, rTc-ASA, rTc-PDP, rTc-ASP). Byly připraveny v dostatečném množství a čistotě.

4.2.5 Imunologické metody

Nepřímá ELISA

Byl proveden šachovnicový test za účelem stanovení optimálních koncentrací pro potažení jamek rekombinantními proteinovými antigeny a TES, ředění myšního/lidského séra a sekundárních protilátek pomocí metody ELISA. Každý vzorek byl analyzován v duplikátech.

TES (byl použit jako kontrola) a rekombinantní proteiny (rTc-TES-26, rTc-ASA, rTc-PDP a rTc-ASP) byly použity v koncentraci 0,5 µg/jamku. Jako primární protilátky byla použita myší a lidská pozitivní/negativní séra.

Dna 96jamkové mikrotitrační destičky MaxiSorp Nunc (Thermo Fisher Scientific) byly potaženy vybranými rekombinantními proteiny a TES rozpuštěným v 0,2M hydrogenuhličitanovém pufru (pH 9,6) a inkubovány přes noc při 4 °C. Jamky byly v každém kroku 3x promyty PBST. Následovala blokace 1% BSA (1 h při 37 °C). Byla přidána myší (ředění 1:800 v PBST) nebo lidská (ředění 1:100 v PBST) séra (100 µl/jamku) a destičky byly inkubovány po dobu 1 hodiny při 37 °C. Po 3x promytí byly do jamek přidány sekundární protilátky – monoklonální anti-myší IgG značené křenovou peroxidázou zředěné 1:10 000 (Thermo Fisher Scientific) nebo anti-lidská IgG značené křenovou peroxidázou zředěné 1:5 000 (Thermo Fisher Scientific). Následovala inkubace po dobu 1 hodiny při 37° C. Substrát byl použit TMB Slow Kinetic Form (Sigma-Aldrich). Reakce byla zastavena přidáním 50 µl 1M HCl. Optická denzita byla odečtena při 450 nm proti 630 nm jako referenční. Následně byla vypočítána průměrná absorbance každého páru duplicitních sér.

Mezní hodnoty (cut-off) pro každý antigen byly vypočteny z kontrolního/negativního myšního a lidského séra (Frey et al. 1998).

SDS-PAGE a Western blot

Pomocí metody SDS-PAGE následované WB byly analyzovány dva typy primárních protilátek:

1) TES odebraný denně po dobu 14 dnů – identifikace imunitní reakce separovaných proteinů přítomných v TES s poolovaným myším sérem. Koncentrace každého sběru TES byla 3 µg/proužek.

2) rekombinantní antigeny – analýza antigenicity vybraných proteinů s individuálními myšími a lidskými séry. Koncentrace každého rekombinantního antigenu byla 200 ng/proužek.

TES a rekombinantní proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE (10% gel) a přeneseny na PVDF membránu (Bio-Rad). Gely byly obarveny sadou Commassie Brilliant Blue a Silver Stain Plus (Bio-Rad). Jako velikostní standard byl použit Precision Plus All Blue Protein Standard (Bio-Rad).

Membrána byla nařezána na proužky a blokována 5% BSA (Sigma-Aldrich) přes noc na třepače v laboratorní teplotě. Proužky byly inkubovány s myším sérem zředěným 1:500 nebo lidským sérem zředěným 1:100 v PBST po dobu 90 minut. V každém kroku byly membrány 3x promyty PBST po dobu 15 minut. Sekundární protilátky (byly použity stejné jako u metody ELISA uvedeny v této kapitole) zředěné 1:5 000 a inkubovány 1 hodinu v laboratorní teplotě. Vyvolání membrán bylo provedeno pomocí Opti-4CN (Bio-Rad), reakce byla zastavena ddH₂O.

4.3 Publikace č. 3 – Infekce *Toxocara canis* zhoršuje průběh experimentální autoimunitní encefalomyelitidy u myši

4.3.1 Experimentální infekce myších hostitelů

Samice myši C57BL/6J (Charles River) staré 5 týdnů byly umístěny ve 12hodinovém cyklu světlo/tma ve zvířetníku ÚIM 1. LF UK. Před experimentem byly myši aklimatizovány 2 týdny. Myši byly rozděleny do 4 skupin, každá po 12 zvířatech (4 myši/klec).

První skupinu tvořily kontrolní neinfikované myši (kontrolní), druhou skupinu (Tc) tvořila zvířata, která byla orálně infikována 2×100 larvami *T. canis* L3 ve dnech 0 a 7 po první infekci, ve třetí skupině (EAE) byla indukována pouze EAE a ve čtvrté skupině (Tc+EAE) byly myši infikovány stejně jako ve skupině Tc a EAE byla indukována jako ve skupině EAE. Myši byly pozorovány 50 dní po indukci EAE.

4.3.2 Kultivace a infekce larvami *T. canis*

Sběr dospělých škrkavek a kultivace L3 larev proběhla totožným způsobem jako v kapitole "3.1.1 Kultivace larev *T. canis* a příprava TES" viz výše.

Před infekcí byly larvy L3 centrifugovány při 600 g při 20 °C po dobu 5 minut, promyty 3x sterilním PBS (pH 7,6) a počítány v 10 alikvotech po 50 µl. Suspenze larev byla poté zředěna PBS na koncentraci 200 larev/ml a myši byly infikovány orálně - 100 larev resuspendovaných v 0,5 ml PBS; reinfekce byla provedena po 7 dnech. Životaschopnost larev byla kontrolována vizuálně pod mikroskopem.

Úspěšnost infekce byla potvrzena stanovením specifických sérových IgG protilátek proti *T. canis* (TES) metodou ELISA. Popsáno v kapitole "4.2.5 Imunologické metody" viz výše.

4.3.3 Indukce experimentální autoimunitní encefalomyelitidy

EAE byla indukována podle Bittner et al. (2014) 35. den po první infekci *T. canis* za použití myelinového oligodendrocytového glykoproteinu (MOG), Freundovo adjuvans s *Mycobacterium tuberculosis* a pertusovým toxinem.

Měření skóre klinických symptomů a ztráty hmotnosti začalo dnem indukce EAE (d.e.i.). Myši byly denně váženy a byly hodnoceny klinické příznaky EAE podle Radovic et al. (2015): 0 = žádné klinické příznaky; 1 = ochablý ocas; 2 = paréza zadních končetin; 3 = úplná bilaterální paralýza zadních končetin často spojená s inkontinencí; 4 = umírající stav nebo smrt. Klinická skóre a normalizované procentuální změny hmotnosti byly porovnány pro všechny skupiny. Tato data byla shromážděna ze 2 nezávislých experimentů.

4.3.4 Odběr séra a izolace leukocytů z vybraných orgánů

Sérum a leukocyty ze sleziny, mezenterických lymfatických uzlin (MLN), mozku a míchy (CNS) byly odebírány od 14. do 50. d.e.i. v týdenních intervalech od 2 zvířat z každé skupiny. Myši byly narkotizovány, vzorky krve byly odebrány punkcí obličejové žíly, sérum bylo odebráno a zmraženo při -80 °C. Myši byly perfundovány přes levou srdeční komoru sterilním ledově vychlazeným PBS a byla extrahována slezina, MLN, mozek a mícha. Slezina byla homogenizována a scezena přes buněčné síto (Sigma), erytrocyty byly lyžovány lyzačním pufrem (BD Pharm Lyse) a vzorky byly dvakrát promyty PBS s následnou centrifugací při 200 g při 4 °C po dobu 10 minut, a nakonec promyty pomocí barvicího pufru (eBioscience Flow Cytometry Sifying Buffer). MLN lymfocyty byly ošetřeny stejným způsobem s výjimkou lýzy erytrocytů.

Mozek a mícha byly promyty sterilním PBS a dále zpracovány podle (Pino & Cardona 2011). Populace buněk Treg byla označena specifickými protilátkami proti markerům Treg buněk

(CD4+, CD25+, FoxP3+, Helios+) a stanovena pomocí systému průtokové cytometrie BD FACS Canto II (BD).

4.3.5 Stanovení cytokinů

Sérové koncentrace cytokinů IL-4, IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-2 a IL-17 byly měřeny pomocí multiplexové analýzy Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD). IL-1 α byl měřen pomocí CBA Mouse IL-1 α Flex Set (BD) s drobnou úpravou.

Před měřením byly kuličky pro detekci IL-1 α testovány spolu s kuličkami pro jiné cytokiny v soupravě Th1/Th2/Th17 a bylo stanoveno optimální ředění séra na základě protokolu výrobce, předchozích experimentů a konzultace s aplikačním specialistou BD. Kalibrační křivka byla vytvořena pro každý cytokin pomocí standardů soupravy.

Fluorescence byla měřena pomocí systému BD FACS Canto II (BD) a koncentrace cytokinů byly stanoveny srovnáním s kalibrační křivkou pro každý cytokin pomocí softwarového balíku BD CBA (BD).

4.3.6 Statistická analýza

Klinická skóre a normalizované tělesné hmotnosti byly zkoumány dvoufaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA) pro opakovaná měření a následně Šidákův test. Hladiny protilátek a cytokinů byly hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem následovaným Dunnovým testem. Data z průtokové cytometrie byla vyhodnocena jednofaktorovým ANOVA testem a následně Šidákovým testem. Normalita reziduí byla kontrolována pomocí Q-Q grafů. Srovnávací testy (Šidákův nebo Dunnův test) byly použity k analýze následujících skupin: kontrolní x Tc, kontrolní x EAE, Tc x EAE, Tc x Tc+EAE a EAE x Tc+EAE.

Všechny testy byly provedeny pomocí GraphPad Prism verze 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro lepší přehlednost a orientaci v disertační práci byly propojeny kapitoly Výsledky a Diskuze.

5.1 Publikace č. 1 – Séroprevalence larvální toxokarózy v České republice

Skulinová, K., Novák, J., Kašný, M., & Kolářová, L. (2020). Seroprevalence of larval toxocarosis in the Czech Republic. *Acta Parasitologica*, 65(1), 68-76. IF₂₀₂₀ = 1,44.

5.1.1 Vyšetření pacienti

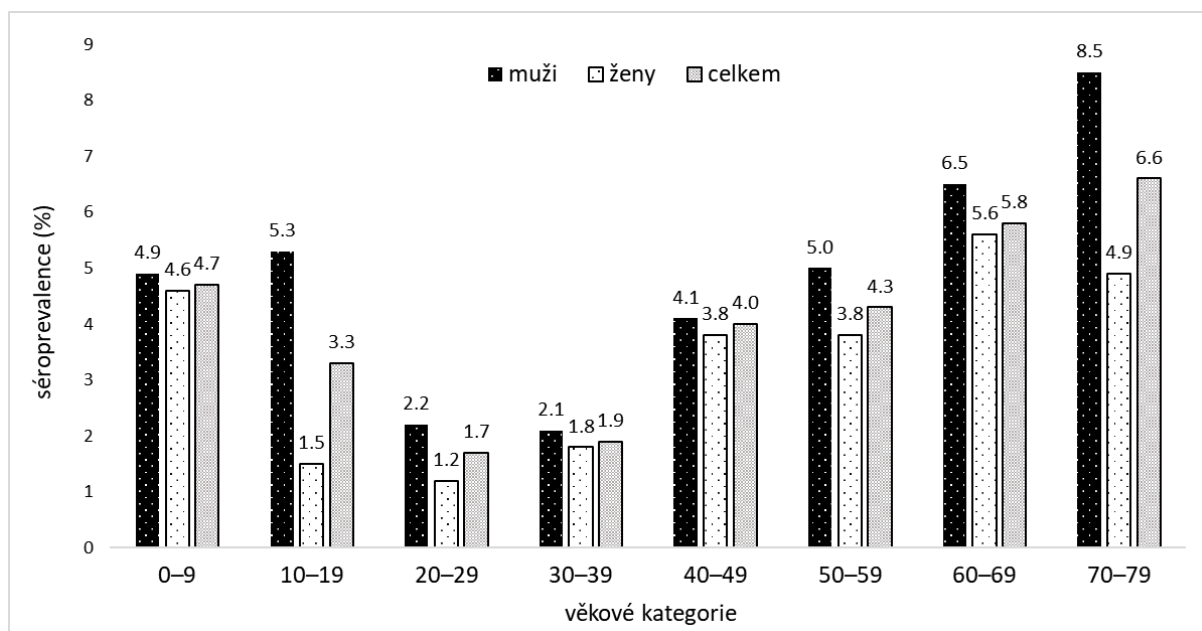
V rámci zjišťování aktuální séroprevalence larvální toxokarózy v České republice bylo NRL pro tkáňové helmintózy shromážděno a vyšetřeno celkem 4 428 vzorků v období let 2012–2016. Podobně jako v jiných studiích (Hogarth-Scott et al. 1969; Dattoli et al. 2011; Boldiš et al. 2015) byla většina pacientů vyšetřena kvůli podezření na tkáňovou helmintózu, ale často i z důvodu přítomnosti eozinofilie, zvýšené hladiny celkového IgE, horečky nebo jaterních obtíží. Co se týče pohlaví vyšetřených, mírně převažovaly ženy nad muži s 52,4 % vyšetřených žen. Vyšetření pacienti z řad dětí a teenagerů (0–19 let) zaujímali ve vzorku 9,3 %.

5.1.2 Celková séroprevalence a srovnání ženy vs. muži

Specifické protilátky IgG byly detekovány u 3,6 % vyšetřovaných vzorků, tzn. 160 pacientů. Ve srovnání s údaji z let 2006 (Kolářová 2006) a 1998 (Uhlíková & Hübner 1998), kdy se celková séroprevalence larvální toxokarózy v ČR pohybovala mezi 18–20 %, zjištěné údaje

ukazují razantní pokles na 3,6 %. Ve srovnání se zmíněnými studii, předkládaná práce je založena na vyšetření lidí, převážně odeslanými specializovanými lékařskými pracovišti, tedy pacientů se symptomy či elevovanými laboratorními nálezy. Je třeba poznamenat, že séropozitivita celé české populace by se pravděpodobně lišila.

Mezi pozitivními případy bylo 74 žen (3,4 %) a 86 mužů (3,8 %). Podobně jako v jiných studiích (Jimenez et al. 1997; Stensvold et al. 2009) jsme nenašli žádné statisticky významné rozdíly v séropozitivitě mezi dětmi/teenagery a dospělými ($P = 0,781$), nebo mezi muži a ženami ($P = 0,126$), ačkoli muži ve všech věkových skupinách byli vždy séropozitivnější než ženy, což je v souladu s metaanalýzou kolektivu Rostami et al. (2019b). Viditelné rozdíly v procentech mezi pohlavími byly nalezeny ve věkových kategoriích 10–19 let (5,3 % mužů a 1,5 % žen) a 70–79 let (8,5 % mužů a 4,9 % žen). Nicméně ani u jedné kategorie rozdíly mezi muži a ženami nebyly statisticky významné ($P = 0,15$ a $P = 0,29$).



Obr. 15. Graf s přehledem séroprevalencí pro různé věkové kategorie s rozdělením na muže, ženy a bez zohlednění pohlaví.

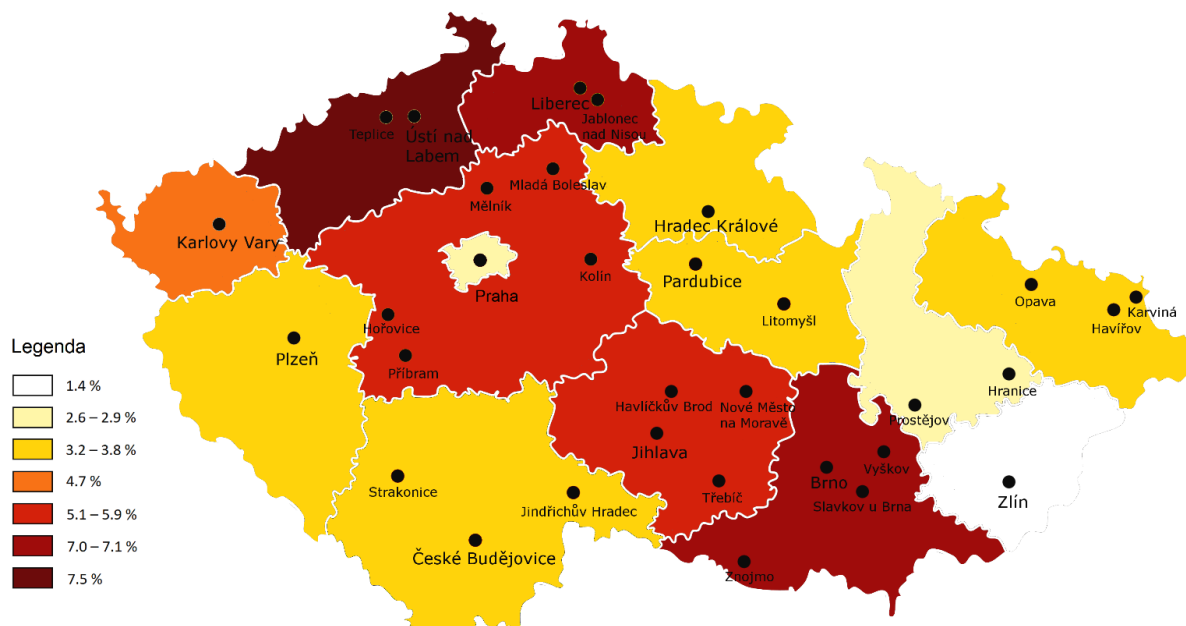
5.1.3 Séroprevalence podle věkových kategorií

Ve věkové kategorii 0–19 let byly protilátky zjištěny u 16 dětí a teenagerů (3,9 %), u dospělých u 144 osob (3,6 %). Bez ohledu na pohlaví byla nejnižší séropozitivita zaznamenána ve věkové kategorii 20–29 let, tj. 1,7 %, která v porovnání s ostatními kategoriemi s výjimkou (10–19 let a 30–39 let) vyšel rozdíl vždy statisticky významný (20–29 a 0–9 let, $P = 0,037$; 20–29 a 40–49 let, $P = 0,016$; 20–29 a 50–59 let, $P = 0,005$; 20–29 a 60–69 let, $P < 0,0001$; 20–29 a 70–79 let, $P = 0,0008$). Nejvyšší zastoupení séropozitivních pacientů bylo zjištěno ve věkové kategorii 70–79 let, tj. 6,6 %, kde statisticky významný rozdíl byl zaznamenán u kategorií 20–29 let ($P = 0,0008$) a 30–39 let ($P = 0,0004$). Nejmladšímu pacientovi byly 4 roky, nejstaršímu 75 let. Medián na základě věku bez ohledu na pohlaví byl 51 (muži medián 49, ženy medián 51). To může naznačovat, že riziko infekce je vyšší u starších lidí, kteří jsou delší dobu exponováni zdroji infekce více než mladší ročníky (Mughini-Gras et al. 2016). Výsledky mohou odrážet skutečnost, že současná generace seniorů vyrůstala častěji na venkově, kde bylo riziko kontaktu se zdroji infekce vyšší nebo naopak tím, že mezi koníčky seniorů může patřit i např. zahradničení, při kterém přijdou do úzkého kontaktu s kontaminovanou půdou, což je hlavní zdroj infekce u lidí (Holland 2017).

Ve srovnání se séropozitivitou u dětí ve věku 1–14 let, která v ČR v roce 1998 dosahovala 13,8 %, je nově zjištěná séropozitivita nižší – v kategorii 0–9 let 4,7 % a v kategorii 10–19 let 3,3 % bez zohlednění pohlaví (Uhlíková & Hübner 1998). Nižší hodnoty mohou odrážet plošné rušení dětských pískovišť nespĺňujících požadavky EU v souvislosti se vstupem ČR do EU a následná přísnější pravidla pro provoz dětských hřišť (zakrývání pískovišť, oplocení dětských hřišť, zákaz vstupu psů apod.), což bylo vyhodnoceno jako efektivní nástroj prevence před nákazou (Avcioglu & Balkaya 2011).

5.1.4 Séroprevalence v krajích ČR

Na základě zjištění předkládané práce, dosáhla séroprevalence larvální toxokarózy v letech 2012–2016 v ČR 3,6 %, ale mezi jednotlivými regiony se séroprevalence lišila, pohybovala se v rozmezí 1,4–7,5 % (Obr. 16). Co se týče nejbližších sousedících zemí s ČR, takto nízké hodnoty séroprevalence byly pozorovány v Rakousku, kde se hodnoty pohybovaly od 1,4–3,7 % v běžné populaci (Deutz et al. 2005). Na Slovensku se séroprevalence odhaduje na 5,5–15,3 % (Pavlinová et al. 2011; Boldiš et al. 2015). V Polsku se séroprevalence odhaduje na 6,1–29,6 % (Rudzińska et al. 2017), ale tento odhad je založen na analýzách údajů ze čtyř geograficky vzdálených částí země a různých věkových skupin, proto je data obtížné srovnávat. Podobně jako v jiných evropských zemích i česká data potvrzují, že zvýšené riziko infekce *Toxocara* spp. je spojena s řadou faktorů spojených s vlivem podnebí, strukturou populace, bydlištěm ve venkovských oblastech apod. (Rubinsky-Elefant et al. 2010). V předkládané práci byla nejvyšší séroprevalence zaznamenána v Ústeckém (7,5 %) a Libereckém kraji (7,1 %), tedy v oblastech s vyšším výskytem sociálně vyloučeného obyvatelstva a vyšší mírou nezaměstnanosti. Relativně vysoká míra séroprevalence na jižní Moravě (7,0 %) může být způsobena klimatickými a sociodemografickými faktory tohoto regionu; má nejvyšší průměrnou roční teplotu v ČR a zároveň se zde rozkládá úrodná venkovská nížina, kde se relativně mnoho lidí zabývá zemědělstvím, což může souviset s vyšší pravděpodobností nákazy (Deutz et al. 2005).



Obr. 16. Mapa séroprevalencí pro jednotlivé kraje ČR. Tečkou (●) jsou označena zdravotní zařízení, která vyšetření do NRL indikovala.

Nejnižší séroprevalence (1,4 %) byla zaznamenána ve Zlínském kraji a třetí nejnižší séroprevalence v kraji Olomouckém. Pacienti z Moravy a Slezska jsou na přítomnost protilátek proti larvální toxokaróze tradičně vyšetřováni v nemocnicích krajských měst, tedy v Ostravě, Olomouci a Zlíně, což by mohlo mít za následek zkreslení celorepublikových dat. V návaznosti na tento fakt je nutno podotknout, že počet vyšetřených vzorků z ČR se v rámci krajů diametrálně lišily (např. 2059 vzorků z Prahy versus 42 vzorků z Karlovarského kraje), tzn. že získaná data je nutné brát s vědomím možného zkreslení.

5.1.5 Závěry publikace č. 1

- Séroprevalence larvální toxokarózy v České republice dosahovala v letech 2012–2016 3,6 %.

- Získaná data naznačují výrazný pokles séroprevalence larvální toxokarózy ve srovnání s předchozími lety (Uhlíková & Hübner 1998; Kolářová 2006).
- Nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi pohlavími či seniory a dětmi.
- V porovnání s údaji ze sousedních zemí séroprevalence relativně nízká a srovnatelná se situací v Rakousku.
- Zaznamenaný pokles rizika infekce larvální toxokarózy může souviset se zvyšující se morálkou majitelů psů a koček – odčervování a sběr exkrementů, ale také se zpřísněním městských vyhlášek stran hygieny veřejných dětských hřišť.

5.2 Publikace č. 2 – Antigenní proteiny exkrečně-sekrečních produktů larev *Toxocara canis* a hodnocení jejich potenciálu pro imunodiagnostiku larvální toxokarózy

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. IF₂₀₂₁ = 1,53.

5.2.1 Výsledky hmotnostně-spektrometrické analýzy

Z TES produktů, které byly sbírány po dobu 14 dnů, bylo pomocí hmotnostně-spektrometrických postupů analyzováno celkem 9 vzorků reprezentujících konkrétní dny sběru (1.–7., 9. a 14. den od vylíhnutí larev) (Obr. 17). V těchto vzorcích bylo nalezeno 718 proteinů a jejich fragmentů v 653 proteinových skupinách. Proteinové složení a relativní abundance se v jednotlivých dnech lišila (Tab. 4).

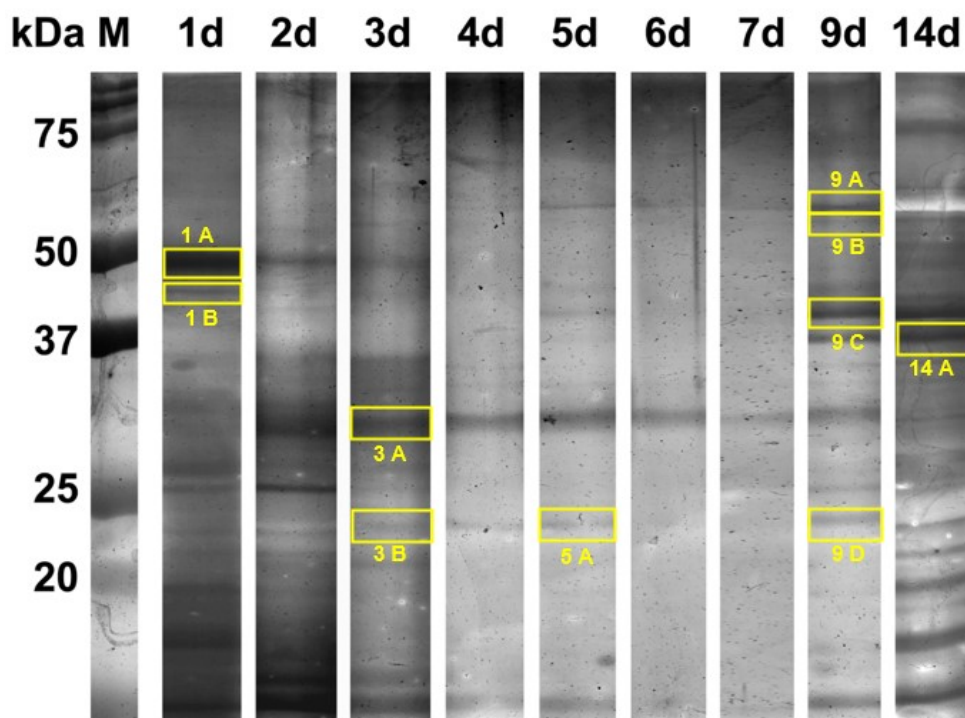
Dříve publikované proteomické studie identifikovaly celkem 19 a 64 proteinů v TES (Sperotto et al. 2017; da Silva et al. 2018). Výsledek předkládaný v naší studii – 718 identifikovaných proteinů – může být ovlivněn množstvím variant analyzovaných vzorků/dní (n = 9), kdy byl např. „uncharacterized protein“ (A0A0B2VYF0) přítomen ve všech dnech sběru kromě prvního dne (Tab. 4). Pokud by byly proteiny selektovány na základě parametru, že protein musí být přítomen zároveň ve všech devíti vzorcích, činila by celková suma 52 proteinů – počet srovnatelný se studií autorů da Silva et al. (2018), kteří našli v TES 64 proteinů. Spektrum identifikovaných proteinů je ve všech studiích odlišné, nicméně např. antigenní protein TES-26 (A0A0B2UWT5) byl přítomný v této i srovnávaných studiích.

Pořadí	Acc. No.	Název proteinu	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den	9. den	14 dnů
1	A0A0B2W6C1	Vitellogenin-6 (Fragment)	7,54	8,34	7,74	7,33	7,11	6,69	6,35	6,38	6,76
2	A0A0B2UUN4	Uncharacterized protein	5,88	6,46	6,96	7,51	7,70	7,56	7,65	8,01	8,09
3	A0A0B2UP29	Ancylostoma secreted protein	5,74	6,42	5,93	6,01	6,55	6,25	6,10	7,45	8,33
4	A0A0B2VZX5	Endochitinase 1	7,85	7,58	6,98	5,87	4,69	4,15	4,06	4,11	3,95
5	A0A0B2VNW7	Ancylostoma secreted protein	5,76	6,58	6,40	6,37	6,81	6,40	6,50	7,73	8,16
6	A0A0B2VLX9	Uncharacterized protein	6,46	7,16	7,60	7,79	7,74	7,61	7,47	7,64	7,55
7	A0A0B2UWH6	Metalloendopeptidase	7,51	7,80	7,32	6,32	4,55	4,11	4,19	4,20	3,48
8	A0A0B2VMP2	Collectin-12 (Fragment)	6,18	7,09	7,33	7,46	7,52	7,58	7,46	7,39	7,42
9	A0A0B2VEA6	Enolase	7,72	7,38	6,72	6,39	6,32	6,28	6,33	6,55	6,97
10	A0A0B2V7F9	Aspartyl protease inhibitor	6,34	6,94	7,65	7,74	7,62	7,50	7,44	7,52	7,33
11	A0A0B2VT33	Uncharacterized protein	5,84	7,12	7,52	7,65	7,57	7,51	7,49	7,61	7,49
12	A0A0B2V6I9	Fructose-bisphosphate aldolase	7,57	7,39	6,83	6,20	5,71	5,29	5,54	6,09	6,95
13	A0A0B2V5Y2	Heat shock 70 kDa protein A	7,75	6,81	5,89	4,70	4,58	3,70	4,20	4,76	5,08
14	A0A0B2UPS1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	5,84	7,52	7,27	7,23	6,95	6,83	6,57	7,26	7,60
15	A0A0B2V9D8	Uncharacterized protein	6,08	6,88	7,34	7,50	7,45	7,58	7,60	7,46	7,09
16	A0A0B2UIK8	26 kDa secreted antigen	5,60	7,22	7,07	7,12	6,95	6,79	6,59	7,30	7,59
17	A0A0B2UWT5	26 kDa secreted antigen	4,69	6,53	6,10	5,93	6,23	6,06	5,95	7,27	7,86
18	A0A0B2VZ15	26 kDa secreted antigen (Fragment)	5,64	5,95	6,86	6,85	7,24	7,15	7,18	7,80	7,22
19	A0A0B2UR82	Polyprotein ABA-1 (Fragment)	7,28	7,25	7,04	6,97	6,53	6,60	6,38	6,52	6,88
20	A0A0B2VYF0	Uncharacterized protein	-	5,47	4,29	4,06	5,88	5,46	5,35	6,52	7,93
21	A0A0B2VFZ0	Triosephosphate isomerase	7,54	6,85	6,42	5,21	5,42	4,88	4,82	5,56	6,28
22	A0A0B2UYV4	Glutathione S-transferase 1	7,50	6,97	5,03	-	4,23	3,73	4,10	4,75	3,54
23	A0A0B2VC49	Protein disulfide-isomerase	7,35	7,35	6,51	5,29	4,21	3,74	3,56	4,29	5,14
24	A0A0B2W097	Uncharacterized protein	5,98	6,80	7,18	7,24	7,23	7,22	7,19	7,29	7,13
25	A0A0B2UVS3	26 kDa secreted antigen	5,57	-	6,57	6,65	7,08	6,95	6,98	7,65	7,24
26	A0A0B2W2R7	14-3-3-like protein 2	7,36	7,05	5,94	4,96	5,32	4,59	4,63	6,21	6,89
27	A0A0B2V2R3	Uncharacterized protein F32A5.4	-	5,32	5,72	6,41	6,48	6,49	6,62	7,06	7,72
28	A0A0B2VGU3	Uncharacterized protein	5,39	-	6,27	6,90	7,11	7,17	6,79	7,17	7,37
29	A0A0B2UZW6	Fatty acid-binding-like protein	7,30	7,02	5,96	5,28	5,25	4,78	-	5,27	6,04
30	A0A0B2W3P6	Nucleoside diphosphate kinase	7,17	7,25	6,15	5,85	5,52	5,43	4,54	5,82	6,29

Tab. 4. Zastoupení nejvíce abundantních proteinů z devíti vzorků TES reprezentujících dny sběru. Pro přehlednost uvedeno pouze prvních nejpočetnějších 30 proteinů. Abundance proteinů je vyjádřena pomocí LFQ kvantifikace, data jsou zlogaritmována (log10). Zelená část spektra – abundance vysoká, červená část spektra – abundance nízká, (-) – nepřítomnost proteinu ve vzorku/dni.

5.2.2 Vybrané identifikované proteiny a proteinové skupiny

Vzorky TES z 9 sběrů byly následně separovány (SDS-PAGE) a pečlivě hodnoceny za účelem předvýběru unikátních kandidátních proteinů pro následné analýzy. Výsledkem byly různé proteinové profily v jednotlivých dnech (Obr. 17).



Obr. 17. Proteinové profily v jednotlivých dnech sběru. Vizualizováno pomocí SDS-PAGE ELFO s následným stříbřením. Žlutě zvýrazněné obdélníky ohraničují oblasti s proteiny, které byly podrobeny MS analýze. Informace ke konkrétním pruhům jsou uvedeny v textu.

Ve vzorku TES extrahovaném 1. den od vylíhnutí byl dominantním proteinem (**1A**) endochitináza-1 (A0A0B2VZX5), dále fragment vitellogeninu-6 (**1B**) (A0A0B2W6C1), metaloendopeptidáza (A0A0B2UWH6).

Endochitináza-1

Vaječné obaly vajíček *T. canis* se skládají z pěti vrstev, z nichž nejsilnější je prostřední vrstva složená převážně z chitinu (Bouchet et al. 1986). Degradční protein endochitináza je pravděpodobně přítomen z důvodu umělé indukce líhnutí larev *T. canis* ze svých vaječných obalů vlivem extrémní změny vnějšího prostředí (změna pH prostředí po přidání bělidla), na

kteřé larvy reagují zvýšenou expresí tohoto proteinu. Tuto teorii podporuje i klesající abundance proteinu v čase pravděpodobně jak vlivem aktivity produkce, tak postupným promýváním larvální kultury (Tab. 4).

Vitellogenin-6

Vitellogenin je zdroj aminokyselin a lipidů ve vajíčkách, má důležitou roli ve vývoji embryí celé řady organismů napříč různými živočišnými druhy. U hlístice *C. elegans* byly popsány geny *vit-1–6*, u parazitických hlístic (*H. contortus* nebo *O. dentatum*) byly popsány geny pouze pro *vit-5* a *6* (Nakamura et al. 1999; Zhu et al. 2017). V genomu *T. canis* byly popsány zatím dva geny pro expresi vitellogeninu (Zhu et al. 2015), exprese jednoho z nich byla potvrzena i v předkládané práci. V proteomu *T. canis* byl potvrzen vitellogenin-6 u samců, samic i larev. Exprese u samců i samic probíhá ve střevě, u samic navíc v reprodukční soustavě (Zhu et al. 2017; da Silva et al. 2018). Vzhledem k přítomnosti vitellogeninu-6 po monitorované době sběru (Tab. 4) je zřejmé, že vitellogenin hraje roli nejen v reprodukci červů, ale také participuje v dalších, dosud nepopsaných biologických procesech larev *T. canis*.

Metaloproteázy

Při interpretaci výsledků ze sběru z prvního, případně druhého dne, je důležité podotknout, že při manipulaci s TES může docházet také k destrukci určitého počtu larev, který (i při zachování co nejšetrnější extrakce TES) není možné ovlivnit. Tím mohou být zkresleny i výsledky, tj. přítomnost somatických proteinů. Jedním z těchto příkladů by hypoteticky mohla být např. přítomnost právě metaloendopeptidázy (A0A0B2UWH6). Přítomnost různých metaloproteáz byla již dříve potvrzena u extraktů larev *T. canis*, nicméně v TES žádná potvrzena nebyla. Funkcí metaloendopeptidázy (A0A0B2UWH6) by mohlo být pravidelné

odvrhování části nebo celé kutikuly na bázi kolagenu a kutikulinu larev, která je pak nahrazena novou kutikulou. Je tudíž sporné tento protein zařadit mezi proteiny přítomné v TES. Vzhledem ke klesající abundanci tohoto proteinu, jeho hypotetické funkci a faktu, že larvy již po extrakci z vaječných obalů neprodělávají *in vitro* žádný další vývoj (přechod z L3 stadia do L4) se přikláním k variantě, že tento protein není larvami do TES aktivně exprimován.

Enoláza

V prvním dni sběru TES byla potvrzena i přítomnost proteinů, které jsou klíčové pro základní biochemické pochody v živých organismech, např. proteiny participující v metabolismu sacharidů jako je enoláza (A0A0B2VEA6) nebo aldoláza (A0A0B2V6I9), které byly přítomny ve vysokých koncentracích po monitorovanou dobu sběru (Tab. 4). Enolázy jsou vysoce konzervované proteiny u různých skupin nematodů; mohou být přítomny v povrchovém plášti kutikuly, proto mohou být potenciálními cíli vývoje vakcín, jak bylo již experimentálně potvrzeno u *Ascaris suum* (Liu et al. 2012; Chen et al. 2012).

Heat-shock proteiny (HSP)

V předkládané studii byly identifikovány celkem tři HSP – heat shock protein 70 kDa, heat shock protein HSP 90-alpha a heat shock protein Hsp-12.2. V první proteomické studii byl z této skupiny identifikován pouze heat shock protein 70 kDa (Sperotto et al. 2017), zatímco da Silva et al. (2018) identifikovali pět HSP. HSP u parazitů mohou fungovat jako imunomodulační molekuly, ale také jako chaperony, usnadňující skládání a zabraňující agregaci proteinů (Pérez-Morales & Espinoza 2015). U schistosom HSP mohou indukovat regulační CD4⁺CD25⁺ Tregs a produkci cytokinů (IL-10 a TGF) (Wang et al. 2009).

Další proteiny TES

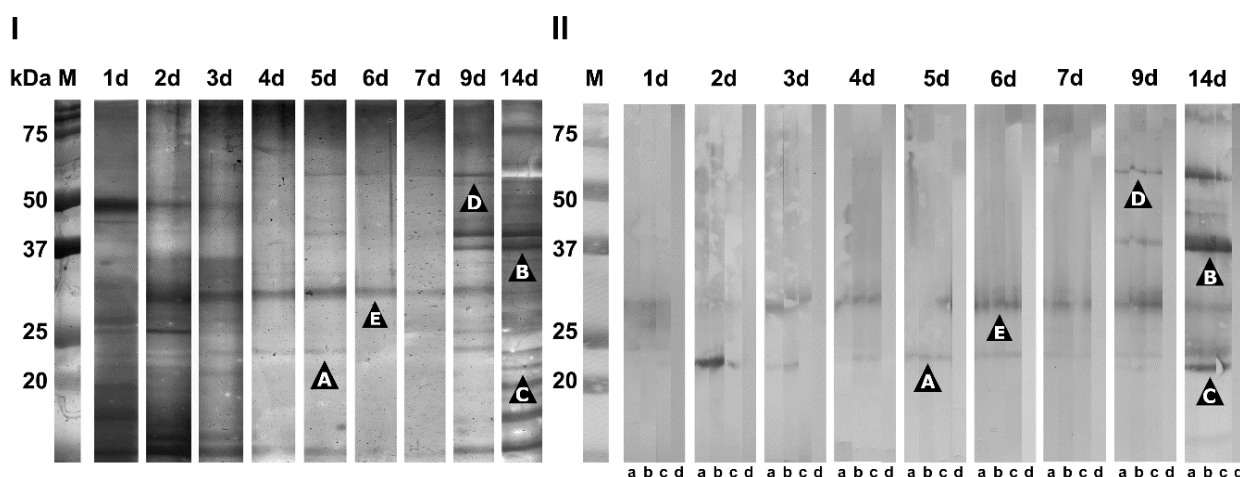
Od třetího dne se již proteinový profil začal měnit a poprvé se objevily proteiny (**3A**) collectin-12 (A0A0B2UYX7) a phosphatidylethanolamine-binding-like protein (**3B**, **5B**, **9D**) (A0A0B2UIK8), resp. TES-32 a TES-26, významné antigeny, které byly nadále v TES přítomny po zbytek doby sběru (Obr. 17).

Devátý den proteinový profil obsahoval největší spektrum proteinů; výrazným abundantním proteinem (**9A**) byl ancylostoma secreted protein (A0A0B2VNW7), jehož štěpy byly nalezeny i v oblastech s nižší molekulovou hmotností (**9B**, **9C**) – tento protein byl pravděpodobně fragmentován. Jedná se homolog, který byl poprvé popsán u L3 larev škrkavek rodu *Ancylostoma*. Jedná se o sekretované proteiny bohaté na cystein a patří do skupiny proteinů souvisejících s patogenezí či přežitím v hostitelském organismu, jejich konkrétní funkce jsou však neznámé (Zhan et al. 2003). V této práci uvedený protein je dle dostupných dat specifický pouze pro *T. canis*.

V posledním vzorku, 14. dnů od vylíhnutí, již bylo náročné jednotlivé proteinové pruhy rozeznat, protože se jednalo o naakumulované proteiny a jejich degradované části. Výskyt nových proteinů v tomto profilu nemusí nutně znamenat, že se některý protein začal exprimovat až 14. den, ale také mohlo dojít k jejich akumulaci ve vzorku, tzn. že byly již natolik koncentrované, aby byly viditelné při elektroforetické separaci s následnou vizualizací. Hmotnostně-spektrometrickou analýzou nejvýraznějších proteinů byla potvrzena přítomnost již výše popsaných proteinů, ale vyskytl se zde i výrazný pruh (**14A**), který byl MS analýzou označen jako necharakterizovaný protein (A0A0B2VYF0) obsahující SXC neboli NC6 doménu. Druhým nově vyskytujícím se proteinem byl další necharakterizovaný protein obsahující pepsin-I3 doménu (A0A0B2UUN4). Homolog tohoto proteinu byl popsán v sekretomu larev *Anisakis simplex*, jeho funkce nebyla popsána (Kochanowski et al. 2022).

5.2.3 Výběr potenciálních antigenních proteinů

Na základě předchozích výsledků byly separované TES přenesené na membránu z 9 sběrů inkubovány s pozitivními a negativními poolovanými myšimi séry, čímž byly vizualizovány protilátkové reakce s proteiny TES (Obr. 18). Antigenní proteiny byly pozorovány v rozmezí 20–100 kDa; intenzita reakce se lišila čase.



Obr. 18. Porovnání TES produktů odebraných během 14 dnů kultivace. (I) SDS-PAGE gel a (II) WB, kde je vizualizována reaktivita separovaných TES a poolovanými séry myši infikovanými různým množstvím larev *T. canis* a) L10, b) L100, c) L1000 d) negativní séra. M – marker; 1d–14d – den odběru; vybrané antigenní proteiny pro přípravu v rekombinantní formě (I) a jejich reaktivitu na WB (II) označeno černými šipkami s písmeny: A – Tc-TES-26; B – Tc-ASA; C – Tc- PDP; D – Tc-ASP. E – Tc-TES-32. (Tc-TES-32 nebyl pro další testování v rekombinantní podobě vybrán).

Celkem byly vybrány čtyři proteiny pro přípravu v rekombinantní formě – Tc-TES-26, Tc-ASA, Tc-PDP a Tc-ASP (Tab. 5). Ty byly vybrány na základě výsledků screeningového testování sběrů za 1–14 dnů s pozitivními myšimi séry (Obr. 18), abundance proteinů v čase (Tab. 4), sekvenční unikátnosti proteinů pro *T. canis* po srovnání se světovými databázemi,

ale také na základě jejich nízké molekulové hmotnosti, která zřejmě souvisí s vyšší specificitou (Smith et al., 2009). Protein Tc-TES-26 (A0A0B2UIK8) byl vybrán jako zástupce již dříve publikovaného a zároveň úspěšně testovaného rekombinantního proteinu sloužícího k rozpoznání infekce larvami toxokar (Mohamad et al. 2009). Zároveň Tc-TES-26 v předkládaném výzkumu slouží i jako pomocný/srovnávací parametr k nově testovaným antigenům. Další 3 proteiny – Tc-ASA (A0A0B2VYF0), Tc-PDP (A0A0B2UUN4) a Tc-ASP (A0A0B2VNW7) byly vybrány jako možné nové potenciální antigeny (Tab. 5).

Název	UniProt Acc. No.	Popis	Počet AMK	Vypočítaná Mw	Reálná Mw
Tc-TES-26	A0A0B2UIK8	protein podobný fosfatidyletanolamin vázajícímu proteinu	262	28.2 kDa	25–30 kDa
Tc-ASA	A0A0B2VYF0	<i>Anisakis simplex</i> alergen	414	45.4 kDa	45–50 kDa
Tc-PDP	A0A0B2UUN4	protein obsahující pepsin-I3 doménu	207	23.5 kDa	25–30 kDa
Tc-ASP	A0A0B2VNW7	protein vylučovaný hlísticí <i>Ancylostoma</i> sp.	247	27.8 kDa	25–30 kDa

Tab. 5. Vybrané proteiny pro přípravu v rekombinantní formě a jejich charakteristika.

UniProt Acc. No. – přístupové číslo v databázi UniProt, AMK – aminokyseliny, Mw – molekulární hmotnost, kDa – kilodalton.

5.2.4 Sérologické testování vybraných rekombinantních antigenů

Testování rekombinantních proteinů pomocí metody ELISA odhalilo specifickou reaktivitu s testovanými poolovanými myšimi a lidskými séry pouze u tří (rTc-TES-26, rTc-PDP a rTc-ASP) ze čtyř vybraných rekombinantních proteinů. U rTc-ASA byla pozorována nespecifická reakce s lidskými séry (Tab. 6). Zatímco u myších poolovaných sér byla reaktivita antigen-protilátka v korelaci s ostatními testovanými antigeny i TES, u lidských sér byla pozorována nespecifická reakce. Molekulová hmotnost rekombinantní formy tohoto proteinu je vyšší než u ostatních testovaných (45–50 kDa). Primární výběr imunoreaktivních proteinů (Tab. 6) proběhl pouze za použití myších sér, což by mohlo vysvětlovat nespecifickou reakci se séry lidskými, tzn. rTc-ASA je sice vhodným antigenem pro

rozpoznání infekce u myší, u lidských vzorků však tento antigen není specifickými protilátkami IgG rozpoznáván. Na základě těchto předběžných/prvotních výsledků byl pro další analýzy rTc-ASA vyrazen z dalších experimentů.

	počet vzorků	klasifikace	rTc-TES-26	rTc-ASA	rTc-PDP	rTc-ASP	TES
Myší séra	10	pozitivní	7	7	7	7	7
		negativní	3	3	3	3	3
Lidská séra	10	seropozitivní	7	5	7	7	7
		seronegativní	3	5	3	3	3

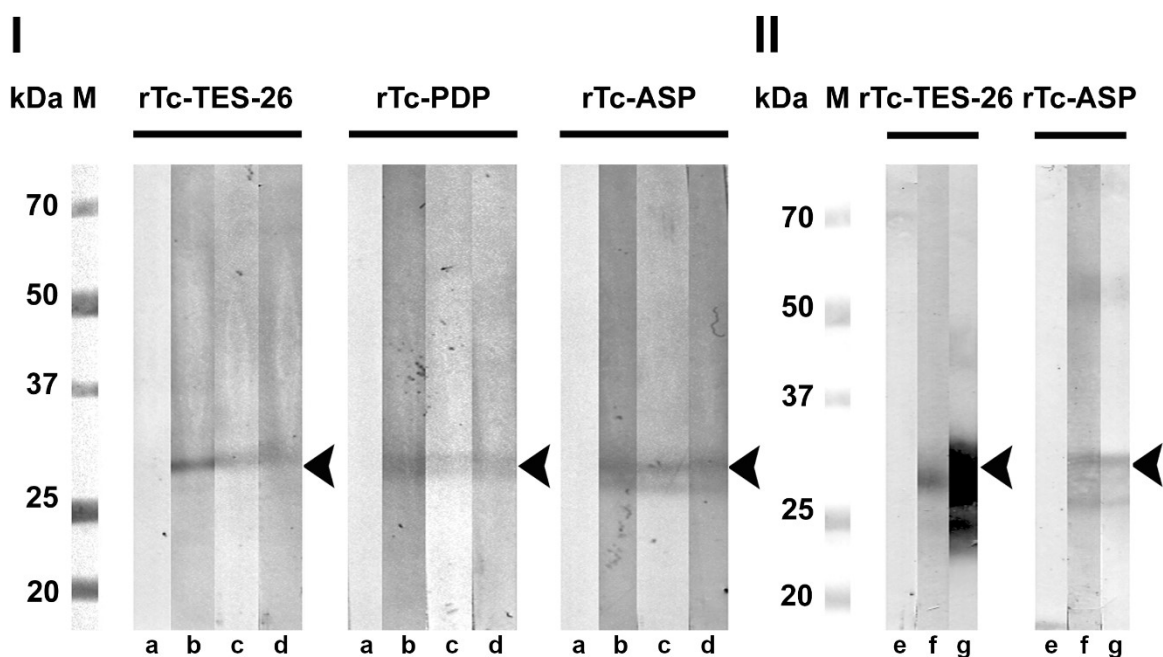
Tab. 6. Souhrnné výsledky ELISA pilotních experimentů s poolovanými myšími séry a lidskými séry. Testovaná myší séra vykazovala vzájemnou korelaci, zároveň výsledky korelovaly i s reálnou nákazou u myší. U lidských sér je pozorována diskrepance v rekombinantu rTc-ASA; při testech s tímto antigenem nebylo možné oddělit seronegativní pacienty od seropozitivních.

Následná ELISA analýza tří rekombinantních antigenů – rTc-TES-26, rTc-PDP a rTc-ASP – a TES s individuálními/nepoolovanými myšími séry a lidskými séry je zobrazena v Tab. 7. Do tabulky jsou zahrnuty i následná testování pomocí metody WB.

		sérum č.	rTc-TES-26 (ELISA/WB)	rTc-PDP (ELISA/WB)	rTc-ASP (ELISA/WB)	TES (ELISA)
Myší séra	negativní (skupina L0)	1	-/-	-/-	-/-	-
		2	-/-	-/-	-/-	-
		3	-/-	-/-	-/-	-
	pozitivní (skupina L10)	4	+/+	+/+	+/+	+
		5	+/+	+/+	+/+	+
		6	+/+	+/+	+/+	+
	pozitivní (skupina L100)	7	+/+	+/+	+/+	+
		8	+/+	+/+	+/+	+
		9	+/+	+/+	+/+	+
	pozitivní (skupina L1000)	10	+/+	+/+	+/+	+
Lidská séra	séronegativní	1	-/-	-/-	-/-	-
		2	-/-	-/-	-/-	-
		3	-/-	-/-	-/-	-
	séropozitivní	4	+/-	+/-	+/-	+
		5	+/-	+/-	+/-	+
		6	+/-	+/-	+/-	+
		7	+/-	+/-	+/-	+
		8	+/+	+/-	+/+	+
		9	+/+	+/-	+/+	+
		10	+/-	+/-	+/-	+

Tab. 7. Reaktivita rTc-TES-26, rTc-PDP a rTc-ASP s myšími a lidskými séry v ELISA a WB. Výsledky každého rekombinantního antigenu s konkrétním vzorkem séra jsou označeny „+“ (pozitivní reakce) nebo „-“ (negativní reakce).

Zatímco u experimentů s jednotlivými myšími séry lze pozorovat stoprocentní korelaci mezi testovanými rekombinantními antigeny s TES a reálnou pozitivitou/negativitou myši v obou metodách (ELISA i WB), u lidských sér je interpretace výsledků komplikovanější. U lidských sér je pomocí metody ELISA testovanými rekombinanty rozpoznána séropozitivita/séronegativita u všech subjektů, pomocí metody WB byla potvrzena reakce u vzorků č. 8 a 9, a to pouze u antigenů rTc-TES-26 a rTc-ASP (Tab. 7).



Obr. 19. Reaktivita myších (I) a lidských (II) sér s rekombinantními antigeny (rTc-TES-26, rTc-PDP a rTc-ASP) pomocí metody WB. Myší séra jsou označena písmeny a–d podle skupiny, resp. počtu larev, kterými myši byly infikovány: a) negativní, b) L10, c) L100 nebo d) L1000. Lidská séra jsou označena písmeny následovně: e) negativní sérum č. 1, f) pozitivní sérum č. 8 s potvrzenou reakcí v ELISA a g) pozitivní sérum č. 9. s potvrzenou reakcí v ELISA.

Srovnání výsledků WB u myši infikovaných v několikrát předem definovaných intervalech ukázalo, že reakce séra z myši infikované pouze dvakrát 1000 larvami (L1000) se 3 rekombinanty měla nižší intenzitu než séra ze skupin L10 a L100 (Obr. 19). Ačkoli bylo testováno pouze jedno myší sérum ze skupiny L1000, lze spekulovat, že u zvířat, která jsou infikována sice nižší infekční dávkou, avšak v pravidelných intervalech (skupiny L10 a L100), je imunitní systém subjektu postupně stimulován a následná imunitní odezva je v reakci na antigen intenzivnější; jde o vývoj podobný tomu, který popisují Novák et al. (2017). Výsledky testování myších sér přesně korelovaly s reálnou nákazou, u

kontrolní skupiny sér se nevyskytla žádná nespecifická reakce, všechna pozitivní séra reagovala se 3 testovanými rekombinantními antigeny (rTc-TES-26, rTc-PDP a rTc-ASP).

U analýzy WB s lidskými séry byly (i přes pozitivitu v ELISA u všech pozitivních sér s testovanými rekombinanty) specifické protilátky potvrzeny pouze u 2 sér ze 7 séropozitivních pacientů, a to u antigenů rTc-TES-26 a rTc-ASP. Antigen rTc-PDP nevázal žádné specifické protilátky u žádného z testovaných sér. Obě metody byly u lidských sér optimalizovány se vždy stejnými výsledky.

V rutinní diagnostice larvální toxokarózy slouží metoda ELISA k zachycení pozitivních pacientů s případnou confirmací pomocí WB. I s použitím různých variant těchto metod a s použitím různých typů antigenů tyto nepřímé testy však nezaručují stoprocentní senzitivitu a specifitu (Noordin et al. 2020). Nesoulad mezi výsledky ELISA a WB byl očekáván, protože ELISA je senzitivní test, který je cílen na záchyt pozitivního vzorku na základě arbitrárního čísla (cut-off), zatímco test WB spoléhá na specifickou reakci s konkrétním antigenem na membráně. ELISA je dle současného stavu poznání stále metodou první volby, protože je relativně levná, ale jako confirmační metoda by měl být použit test WB (Maraghi et al. 2012; Dos Santos et al. 2018). Confirmace pomocí metody WB je také spjata s vyloučením jiných infekčních i neinfekčních příčin falešné ELISA positivity, mj. i pacientů s oslabenou imunitou anebo oportunními infekcemi (Zibaei et al. 2013; Noormahomed et al. 2014; Dos Santos et al. 2018).

Na rozdíl od myší, které byly pravidelně infikovány vysokým počtem larev v jedné nebo několika dávkách, u dospělých lidí, kteří jsou náhodnými hostiteli, může být reálná infekční dávka a následná larvální nálož výrazně nižší, čímž může být ovlivněna výsledná sérologická analýza (Glickman & Schantz 1981; Smith & Noordin 2006; Smith et al. 2009). U uměle indukované infekce je zřejmé, že u hostitele aktivně probíhá infekce, tzn. larva aktivně migruje tkáněmi a imunitní systém na to reaguje. U lidí v době testování nelze jednoznačně

zjistit v jaké fázi se subjekt nachází a testovaná osoba je ve většině případů v tzv. chronické fázi infekce, kdy jsou v séru přítomny protilátky bez aktivní migrace larev. Interpretace výsledku sérologických metod musí být tedy vždy posuzována na základě anamnézy, klinického obrazu a dalších laboratorních nálezů, které v předkládané práci nejsou známy (Noordin et al. 2020).

5.2.5 Závěry publikace č. 2

- Jedná se o první studii, kdy byla sledována geneze změny proteinového složení TES po dobu dvou týdnů kultivace larev a zároveň změna spektra imunoreaktivních proteinů s využitím pozitivních/negativních sér
- Studie ukazuje, že aplikace separačních a imunochemických metod v kombinaci s hmotnostně-spektrometrickými analýzami, jsou účinným nástrojem při efektivní identifikaci nových proteinových antigenů *Toxocara* sp.
- Nově objevené rekombinantní antigeny rTc-TES-26 a rTc-ASP mohou být vhodnými kandidáty v rozvoji diagnostiky larvální toxokarózy.
- Použití rekombinantních antigenů, ideálně v multiplexové diagnostice larvální toxokarózy by mělo výrazně redukovat případnou zkříženou reaktivitu s ostatními parazitárními infekcemi.

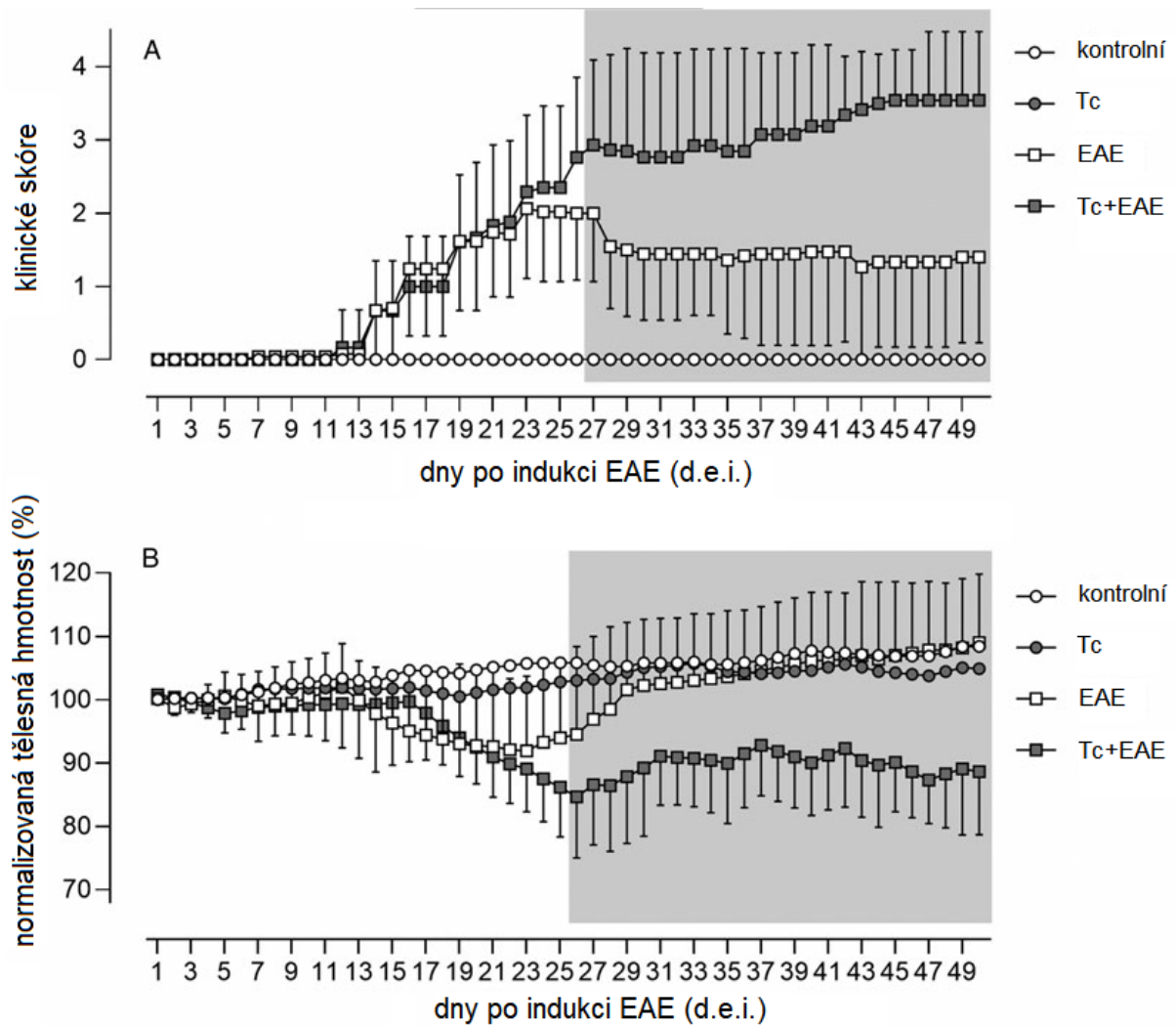
5.3 Publikace č. 3 – Infekce *Toxocara canis* zhoršuje průběh experimentální autoimunitní encefalomyelitidy u myši

Novák, J., Macháček, T., Majer, M., Kostelanská, M., Skulinová, K., Černý, V., Kolářová, L., Hrdý, J. & Horák, P. (2022). *Toxocara canis* infection worsens the course of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Parasitology*, 149(13), 1720-1728. IF₂₀₂₁ = 3,24.

V předkládané práci byl zkoumán vliv infekce *T. canis* na průběh experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) u myši, zvířecího modelu roztroušené sklerózy.

5.3.1 Infekce *T. canis* a klinické příznaky EAE

V obou infikovaných skupinách (Tc a Tc+EAE) vyvolala infekce larvami L3 *T. canis* významnou TES-specifickou IgG protilátkovou odpověď ve srovnání s oběma neinfikovanými skupinami (kontrolní a EAE). Ukázalo se, že infekce *T. canis* 5 týdnů před indukcí EAE vedla ke zhoršení skóre klinických příznaků a významnému úbytku váhy ve srovnání s EAE myšmi bez infekce (Obr. 20). Toto pozorování není v souladu s mnoha studiemi provedenými s různými druhy helmintů uvedených v review Charabati et al. (2020), kdy předchozí helmintární infekce měla pozitivní efekt (remisi) na indukovanou nákazu. Naopak podobné výsledky s předkládanými daty publikovali Bing et al. (2015) na experimentech *Toxascaris leonina* s rekombinantním galektinem (rTl-gal). Podávání galektinu vedlo ke zhoršení symptomů EAE, větší demyelinizaci a zvýšené zánětlivé infiltraci.

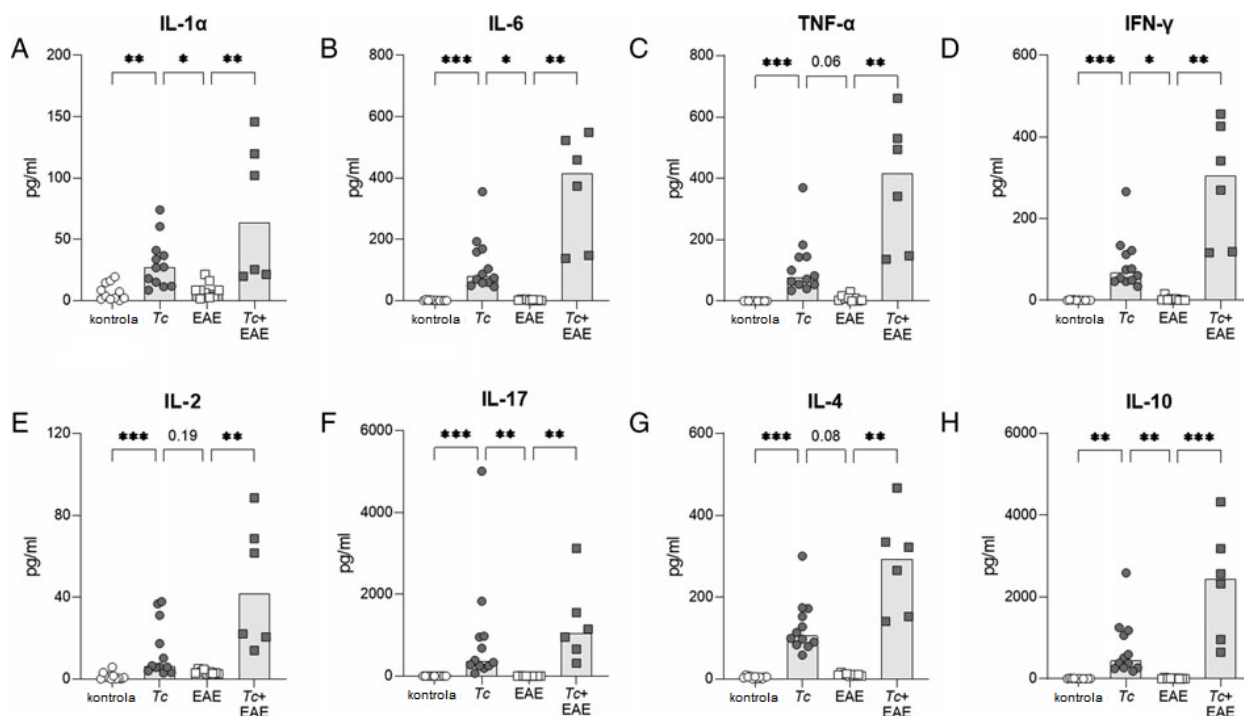


Obr. 20. Infekce larvami *T. canis*. Klinické skóre EAE (A) a následné snížení tělesné hmotnosti (B) infikovaných myší s EAE (Tc+EAE) ve srovnání se skupinou s pouze indukovanou EAE (EAE). Rozdíly mezi těmito skupinami (označeno šedou oblastí) byly významné od 27. dne (klinické skóre) a od 26. dne (normalizovaná procenta tělesné hmotnosti) po indukci EAE. Data jsou prezentována jako průměry \pm standardní odchylky (absence v kontrolní skupině a EAE) ze 2 nezávislých experimentů (12 myší na skupinu v každém experimentu, tj. zobrazena data pro 24 zvířat v experimentu na skupinu). Údaje pro klinické skóre EAE (A) pro skupinu Tc nejsou zobrazeny, tato skupina neměla žádné příznaky.

5.3.2 Výsledky měření sérových cytokinů

K pochopení mechanismů zhoršujících se symptomů EAE a ztráty hmotnosti byly změřeny koncentrace cytokinů v séru – koncentrace všech měřených cytokinů (IL-4, IL-10, IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-2 a IL-17) byly významně zvýšeny u Tc+EAE myši ve srovnání s EAE myšmi (Obr. 21). Pro cytokiny spojené s Th2 (IL-4) a s Treg (IL-10) byly naměřené hodnoty sérové koncentrace u myši Tc+EAE ve srovnání s myšmi EAE statisticky významné, což je v souladu s předchozími studiemi (Sewell et al. 2003; Peón et al. 2017). Pozitivní imunomodulační účinek IL-4 a IL-10 u infekcí *T. canis* je však pravděpodobně potlačen působením Th1 (TNF- α , IFN- γ) a Th17 (IL-17, IL-6) cytokiny, které byly produkovány také ve zvýšeném množství (Reyes et al. 2011). Zhoršení klinických příznaků a ztráta hmotnosti by mohly být důsledkem infekce *T. canis* a její neuroinvaze spolu s přítomností antimyelinových patogenních autoprotilátek a zvýšenými koncentracemi cytokinů spojených s Th1 a Th17.

Současně byly zjištěny vyšší hladiny všech cytokinů u myši s infekcí *T. canis* ve srovnání s kontrolní skupinou, ale ve srovnání Tc myši s EAE myšmi byl zjištěn významný nárůst pouze u IL-10, IL-1 α , IL-6, IFN- γ a IL-17 (Obr. 21). Detekované koncentrace cytokinů u myši s infekcí *T. canis* byly nižší než u Tc+EAE myši, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. To může naznačovat, že infekce *T. canis* s následnou EAE vede k dalšímu zvýšení hladin cytokinů, což odpovídá zhoršení symptomů a ztrátám hmotnosti u Tc+EAE myši.

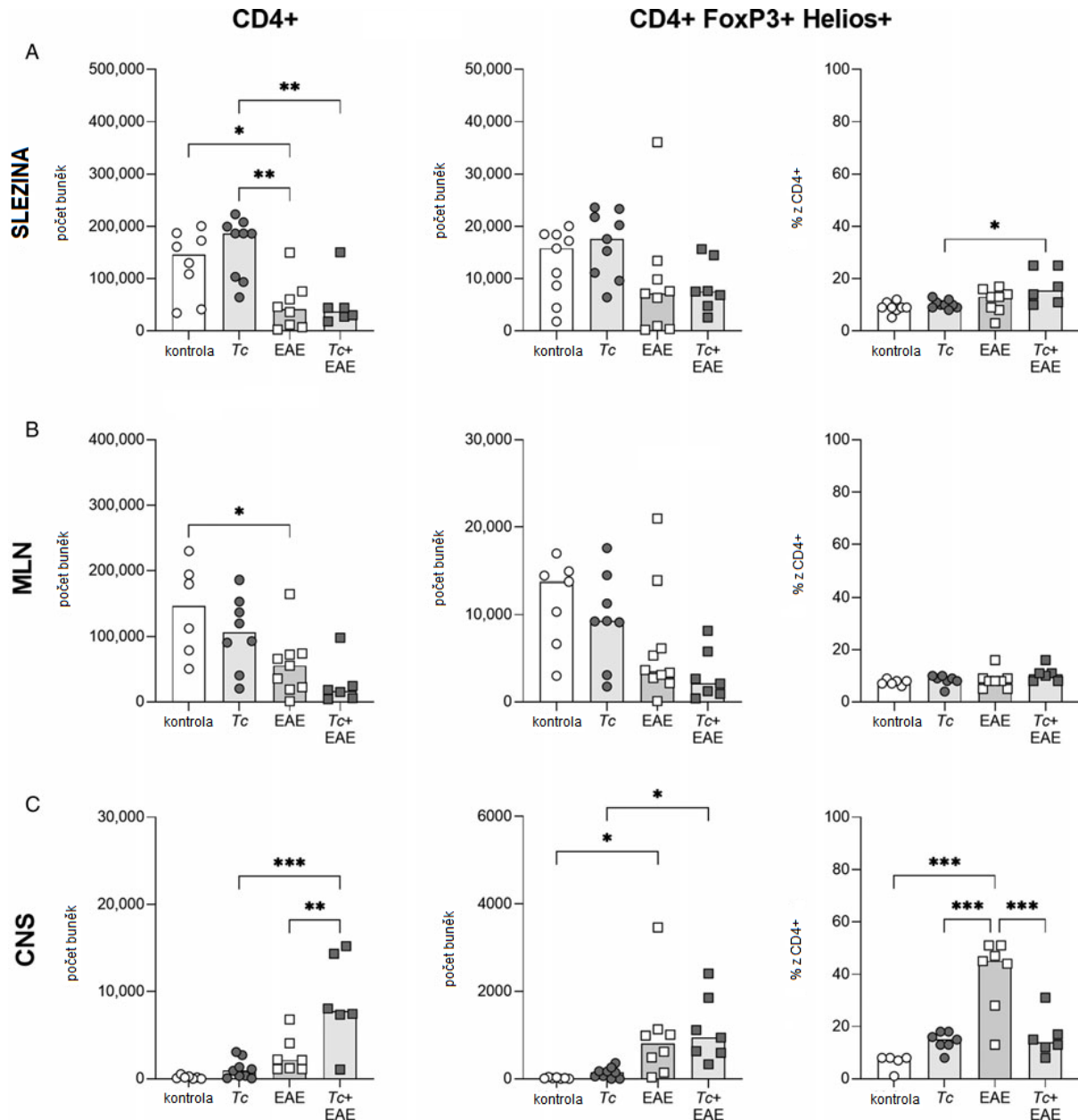


Obr. 21. Sérové koncentrace cytokinů. A) IL-1 α , B) IL-6, C) TNF- α , D) IFN- γ , E) IL-2, F) IL-17, G) IL-4 a H) IL-10. Jednotlivá data jsou zobrazena spolu s mediánem skupiny, Kruskalův–Wallisův test následovaný Dunnovým testem byly použity k vyhodnocení rozdílů mezi předem vybranými skupinami (kontrola vs. Tc, kontrola vs. EAE, Tc vs. EAE, Tc vs. Tc+EAE a EAE vs. Tc+ EAE). Skupina kontrolní a Tc: n = 12, skupina EAE: n = 9, skupina Tc+EAE: n = 6. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001) nebo jsou uvedeny hodnoty P.

5.3.3 Výsledky měření CD4+ T-lymfocytů a Tregs

Měření populací CD4+ T-lymfocytů a CD4+FoxP3+Helios+ Tregs ve slezině, MLN a CNS sloužilo ke zjištění dalších informací souvisejících se zhoršující se symptomatologií u Tc+EAE myši a jejich roli v rozvoji onemocnění. V CNS byl nalezen vyšší počet CD4+ buněk u Tc+EAE myši ve srovnání s EAE myšmi a také ve srovnání s Tc myšmi, což by naznačovalo, že neuroinvaze *T. canis* a následná EAE vedly k infiltraci CD4+ buněk do CNS.















Zatímco počet Tregs byl podobný jako u EAE myši, jejich frekvence byla významně nižší (Obr. 22).



Obr. 22. CD4+ T-lymfocyty a Treg (CD4+FoxP3+Helios+) byly analyzovány průtokovou cytometrií. A) slezina, B) mezenterická lymfatická uzlina (MLN) a C) centrální nervový systém (CNS). Jednotlivá data jsou zobrazena spolu s mediánem skupiny, Kruskalův–Wallisův test následovaný Dunnovým testem byly použity k vyhodnocení rozdílů mezi předem vybranými skupinami (kontrola vs. Tc, kontrola vs. EAE, Tc vs. EAE, Tc

vs. Tc+EAE a EAE vs. Tc+ EAE). Skupina kontrolní: n = 6, skupina Tc: n = 7, skupina EAE: n = 8, skupina Tc+EAE: n = 7. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001).

To naznačuje přítomnost non-Treg CD4+ buněčných populací u Tc+EAE myší, jako jsou Th1 a Th17, jejichž prozánětlivé účinky mohou přispívat k poškození CNS a následnému zhoršení průběhu EAE, což je v souladu se zhoršeným klinickým skóre (Obr. 23).

C57BL/6J	<i>T. canis</i>	EAE	VÝSLEDEK
	ne	ne	<ul style="list-style-type: none"> • myši obecně OK • velmi nízké hladiny sérových cytokinů •  několik CD4+ T-lymfocytů a Tregs 
	2 x 100 larev	ne	<ul style="list-style-type: none"> • myši obecně OK • zvýšené hladiny sérových cytokinů •  několik CD4+ T-lymfocytů a Tregs 
	ne		<ul style="list-style-type: none"> • ztráta hmotnosti, zhoršené klin. skóre • nízké hladiny sérových cytokinů •  zvýšený podíl Tregs 
	2 x 100 larev		<ul style="list-style-type: none"> • ztráta hmotnosti, zhoršené klin. skóre • vysoké hladiny sérových cytokinů •  snížený podíl Tregs 

Obr. 23. Schematický přehled výstupů experimentů.

Mírnější symptomatologie u EAE myší může být způsobena vyšším podílem Tregs v populaci CD4+ T-lymfocytů v CNS, což lze vysvětlit proliferací Tregs v reakci na přítomnost MOG, to může následně snížit probíhající autoimunitní procesy.

Vyšší množství CD4+ T-lymfocytů a Tregs nalezených ve vzorcích sleziny a MLN u kontrolních a Tc myší ve srovnání s EAE a Tc+EAE myšmi lze vysvětlit downregulací CD4+

T-lymfocytů a Tregs v důsledku podávání pertusového toxinu během indukce EAE. To by mohlo znamenat, že potenciální imunomodulační kapacita *T. canis* u myší Tc+EAE je pravděpodobně snížena a přemožena důsledky neuroinvaze larev L3 a během následné indukce EAE tato kombinace způsobuje zhoršení symptomatologie se zvýšenými hladinami cytokinů a infiltrací prozánětlivých CD4⁺ T-lymfocytů. Tuto hypotézu je však potřeba experimentálně ověřit.

5.3.4 Závěry publikace č. 3

- Předkládaná data prokazují negativní vliv infekce *T. canis* na průběh EAE.
- Bylo pozorováno zhoršení klinického skóre a ztráty hmotnosti testovaných myší.
- Byly pozorovány nápadně zvýšené sérové hladiny různých cytokinů, což naznačuje dysfunkci imunitní regulace u Tc+EAE myší.
- Výsledky studie mohou přispět k poznání hypotetického vlivu infekce larvami *T. canis* na neurodegenerativní onemocnění (např. roztroušenou sklerózu) u člověka.

6 ZÁVĚR

Dizertační práce byla zaměřena na rozšíření dosavadních znalostí týkajících se proteinového složení exkrece-sekrece produktů infekčních larev *T. canis* a jejich možné aplikace v sérodiagnostice larvální toxokarózy.

V rámci práce byla zmapována aktuální séroprevalence larvální toxokarózy v České republice – 3,6 %, přičemž situace se lišila mezi jednotlivými kraji, ale také v kontextu evropských zemí, kde Česká republika patří k těm s nízkou séroprevalencí onemocnění (Publikace č. 1).

Hlavním výstupem práce je identifikace proteinového spektra exkrece-sekrece produktů infekčních larev *T. canis* zasazeném do časového rámce 14 dnů. Odebrané vzorky TES byly analyzovány za účelem odhalení imunoreaktivního potenciálu jednotlivých proteinů. Vybrané kandidátní proteinové antigeny byly připraveny v rekombinantní formě a testovány s myšími a lidskými séry. Konkrétně rTc-TES-26 a rTc-ASP byly definovány jako možné vhodné markery larvální toxokarózy (Publikace č. 2).

V neposlední řadě bylo nad rámec cílů práce zahrnuto zhodnocení infekce larvami *T. canis* u myši s indukovanou experimentální autoimunitní encefalomyelitidou s předpokládaným příznivým vlivem infekce na toto neurodegenerativní onemocnění. U nakažených myši larvami *T. canis* došlo oproti předešlým výzkumům k celkovému zhoršení klinických příznaků onemocnění (Publikace č. 3).

Předkládaná disertační práce přispívá ke komplexnímu pohledu na problematiku onemocnění larvální toxokarózy a může být použita k dalšímu vývoji efektivnějších a přesnějších sérodiagnostických aplikací.

7 SEZNAM ZKRATEK

1. LF UK	1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
AMK	aminokyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CBA	cytometric bead array
	multiplexová detekce solubilních mediátorů vazbou na částice s následnou analýzou průtokovou cytometrií
CD4+	skupina povrchových proteinů na pomocných T-lymfocytech
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	komplementární DNA
CNS	centrální nervová soustava
CRD	carbohydrate recognition domain
	rozpoznávací doména sacharidu, sacharid-vázající doména
CRP	C-reaktivní protein, reaktant akutní fáze
CSF	cerebrospinální tekutina, likvor
CT	covert toxocarosis – skrytá toxokaróza
CTL	lektin typu C
d.e.i.	ode dne indukce
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ES	exkrečně-sekreční produkty
HE	hematoxylin-eosin
His-Tag	6 histidinových aminokyselinových zbytků, sloužících ke značení rekombinantního proteinu a vychytávání na purifikační koloně s Ni ²⁺ ionty

HSP	heat-shock protein
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin třídy G, další imunoglobuliny dle stejného klíče – A, M, E
IL	interleukin
kDa	kilodalton
L1–L4	larvy 1.–4. stadia vývoje oddělená svlékáním kutikuly
L3	larva třetího stadia, infekční larva
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie kombinovaná s tandemovou hmotnostní detekcí
LFQ	label-free quantification, kvantifikace proteinů pomocí MS analýz
MLN	mezenterické lymfatické uzliny
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
MS	hmotnostní spektrometrie
MUC	mucin
Mw	molekulární hmotnost
Ni-NTA	nitriloctová kyselina satureovaná Ni ²⁺ ionty součást kolony, která slouží k purifikaci rekombinantních proteinů
NC6	six-cysteine domain
NRL	národní referenční laboratoř
NT	neurotoxokaróza
OLM	<i>ocular larva migrans</i>
PAMP	patogen asociovaný molekulární vzor vysoce konzervativní struktury přítomné na povrchu patogenů rozpoznávané vrozenou imunitou
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok

PCR	polymerázová řetězová reakce
PEBP	fosfatidyletanolamin vázající protein
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
PVDF	polyvinylidenfluorid
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
STH	soil-transmitted helminth infections
SXC	six-cystein domain
Tc	<i>Toxocara canis</i>
TES	<i>Toxocara</i> excretory-secretory antigen, <i>Toxocara</i> exkrečně-sekreční produkty
TGF-β	transforming growth factor-beta
Th2	imunitní odpověď založená na Th2 pomocných lymfocytech
TNF	tumor necrosis factor
Tregs	regulační T-lymfocyty
ÚIM	Ústav imunologie a mikrobiologie
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
VLM	<i>visceral larva migrans</i>
WB	western blot
WMA	Světová zdravotnická asociace

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Abou-El-Naga, I. F., El-Nassery, S. M. . F., & Sharaf, I. A. (2022). Immunochemical studies of *Toxocara canis* proteases. *Tropical Biomedicine*, 39(3), 315–320. <https://doi.org/10.47665/tb.39.3.002>
- Abou-El-Naga, Iman F., & Mogahed, N. M. F. H. (2023). Potential roles of *Toxocara canis* larval excretory secretory molecules in immunomodulation and immune evasion. *Acta Tropica*, 238, 106784. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106784>
- Ahn, S. J., Woo, S. J., Jin, Y., Chang, Y. S., Kim, T. W., Ahn, J., Heo, J. W., Yu, H. G., Chung, H., Park, K. H., & Hong, S. T. (2014). Clinical Features and Course of Ocular Toxocariasis in Adults. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), e2938. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002938>
- Alba-Hurtado, F., Chávez-Guitrón, L., del Río-Araiza, V. H., Nava-Castro, K., & Morales-Montor, J. (2014). The Immune Response During Toxocariasis by *Toxocara canis*. In *Immune Response to Parasitic Infections* (pp. 27–50). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/9781608059850114020005>
- Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/nri2992>
- Anderson, J. P., Rascoe, L. N., Levert, K., Chastain, H. M., Reed, M. S., Rivera, H. N., McAuliffe, I., Zhan, B., Wiegand, R. E., Hotez, P. J., Wilkins, P. P., Pohl, J., & Handali, S. (2015). Development of a Luminex Bead Based Assay for Diagnosis of Toxocariasis Using Recombinant Antigens Tc-CTL-1 and Tc-TES-26. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), e0004168. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004168>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., ..., Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40, W597–W603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>
- Auer, H., & Walochnik, J. (2020). Toxocariasis and the clinical spectrum. *Advances in Parasitology*, 109, 111–130. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.005>
- Avcioglu, H., & Balkaya, I. (2011). The relationship of public park accessibility to dogs to the

- presence of *Toxocara* species ova in the soil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(2), 177–180. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0244>
- Badley, J. E., Grieve, R. B., Rockey, J. H., & Glickman, L. T. (1987). Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: the role of excretory-secretory antigens. *Parasite Immunology*, 9(1), 133–143. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3024.1987.TB00494.X>
- Bass, J. L., Mehta, K. A., Blocker, R., Glickman, L. T., & Eppes, B. M. (2016). Asymptomatic Toxocariasis in Children. *Clinical Pediatrics*, 26(9), 441–446. <https://doi.org/10.1177/000992288702600902>
- Beaver, P. C., Snyder, C. H., Carrera, G. M., Dent, J. H., & Lafferty, J. W. (1952). Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans; Report of three cases. *Pediatrics*, 9(1), 7–19. <https://doi.org/10.1542/PEDS.9.1.7>
- Bing, S. J., Ha, D., Ahn, G., Cho, J., Kim, A., Park, S. K., ... Jee, Y. (2015). Galectin isolated from parasite inhibits remission of experimental autoimmune encephalomyelitis by up-regulating autoantibody. *Clinical and Experimental Immunology*, 180(3), 419–431. <https://doi.org/10.1111/CEI.12594>
- Bittner, S., Afzali, A. M., Wiendl, H., & Meuth, S. G. (2014). Myelin Oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *Journal of Visualized Experiments*, (86). <https://doi.org/10.3791/51275>
- Boldiš, V., Ondriska, F., Špitalská, E., & Reiterová, K. (2015). Immunodiagnostic approaches for the detection of human toxocarosis. *Experimental Parasitology*, 159, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.10.006>
- Bouchet, F., Boulard, Y., Baccain, D., & Leger, N. (1986). Ultrastructural studies of alterations induced by microwaves in *Toxocara canis* eggs: prophylactic interest. *Zeitschrift Für Parasitenkunde Parasitology Research*, 72(6), 755–764. <https://doi.org/10.1007/BF00925096>
- Bowman, D. D. (2020). History of *Toxocara* and the associated larva migrans. *Advances in Parasitology*, 109, 17–38. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.037>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Parasites – Soil-transmitted helminths.

Retrieved from <https://www.cdc.gov/parasites/sth/index.html>

- Charabati, M., Donkers, S. J., Kirkland, M. C., & Osborne, L. C. (2020). A critical analysis of helminth immunotherapy in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(12), 1448–1458. <https://doi.org/10.1177/1352458519899040>
- Chen, J., Liu, Q., Liu, G. H., Zheng, W. Bin, Hong, S. J., Sugiyama, H., ... Elsheikha, H. M. (2018). Toxocariasis: A silent threat with a progressive public health impact. *Infectious Diseases of Poverty*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0437-0>
- Chen, N., Yuan, Z. G., Xu, M. J., Zhou, D. H., Zhang, X. X., Zhang, Y. Z., ... Zhu, X. Q. (2012). *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine*, 30(23), 3478–3482. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.075>
- Choi, D., Lim, J. H., Choi, D. C., Paik, S. W., Kim, S. H., & Huh, S. (2008). Toxocariasis and ingestion of raw cow liver in patients with eosinophilia. *Korean Journal of Parasitology*, 46(3), 139–143. <https://doi.org/10.3347/kjp.2008.46.3.139>
- Chojnacki, S., Cowley, A., Lee, J., Foix, A., & Lopez, R. (2017). Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W550–W553. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx273>
- da Silva, M. B., Urrego A., J. R., Oviedo, Y., Cooper, P. J., Pacheco, L. G., Pinheiro, C. S., ... Alcantara-Neves, N. M. (2018). The somatic proteins of *Toxocara canis* larvae and excretory-secretory products revealed by proteomics. *Veterinary Parasitology*, 259, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.015>
- Dattoli, V. C. C., Freire, S. M., Mendonça, L. R., Santos, P. C., Meyer, R., & Alcantara-Neves, N. M. (2011). *Toxocara canis* infection is associated with eosinophilia and total IgE in blood donors from a large Brazilian centre. *Tropical Medicine & International Health*, 16(4), 514–517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02719.x>
- de Savigny, D. H., Voller, A., & Woodruff, A. W. (1979). Toxocariasis: Serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, 32(3), 284–288. <https://doi.org/10.1136/jcp.32.3.284>
- Del Prete, G. F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., ... Romagnani, S. (1991). Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with

- stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(1), 346–350. <https://doi.org/10.1172/JCI115300>
- Dent, L. A., Daly, C. M., Mayrhofer, G., Zimmerman, T., Hallett, A., Bignold, L. P., ... Parsons, J. C. (1999). Interleukin-5 transgenic mice show enhanced resistance to primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis* but not primary infections with *Toxocara canis*. *Infection and Immunity*, 67(2), 989–993. <https://doi.org/10.1128/iai.67.2.989-993.1999>
- Deutz, A., Fuchs, K., Auer, H., Kerbl, U., Aspöck, H., & Köfer, J. (2005). *Toxocara*-infestations in Austria: A study on the risk of infection of farmers, slaughterhouse staff, hunters and veterinarians. *Parasitology Research*, 97(5), 390–394. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1469-5>
- Długosz, E., Milewska, M., & Bańska, P. (2021). Identification of *Toxocara canis* antigen-interacting partners by yeast two-hybrid assay and a putative mechanism of these host–parasite interactions. *Pathogens*, 10(8), 949. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080949>
- Doedens, A., Loukas, A., & Maizels, R. M. (2001). A cDNA encoding Tc-MUC-5, a mucin from *Toxocara canis* larvae identified by expression screening. *Acta Tropica*, 79(3), 211–217. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00137-1)
- Dos Santos, L. M., Donassolo, R. A., Berne, M. E., Leite, F. P. L., Da Costa Avila, L. F., Scaini, C. J., ... Conceição, F. R. (2019). The serodiagnostic potential of recombinant proteins TES–30 and TES–120 in an indirect ELISA in the diagnosis of toxocariasis in cattle, horses, and sheep. *PLoS ONE*, 14(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213830>
- Dos Santos, L. M., Magalhães, C. G., Telmo, P. D. L., Cerqueira, M. P., Donassolo, R. A., Leite, F. P. L., ... Conceição, F. R. (2018). Sensitivity and specificity of recombinant proteins in *Toxocara* spp. for serodiagnosis in humans: Differences in adult and child populations. *PLoS ONE*, 13(12), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208991>
- Elefant-Rubinsky, G., Shimizu, S. H., Arroyo Sanchez, M. C., Miuki, C., Jacob, A., & Ferreira, A. W. (2006). A Serological Follow-up of Toxocariasis Patients After Chemotherapy Based on the Detection of IgG, IgA, and IgE Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 20, 164–172.

<https://doi.org/10.1002/jcla.20126>

- Elefant, G. R., Roldán, W. H., Seebock, A., & Kosma, P. (2016). Evaluation of a di-O-methylated glycan as a potential antigenic target for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunology*, *38*(4), 236–243. <https://doi.org/10.1111/pim.12311>
- Falcone, F. H., Tetteh, K. K. A., Hunt, P., Blaxter, M. L., Loukas, A., & Maizels, R. M. (2000). The new subfamily of cathepsin-Z-like protease genes includes Tc-cpz-1, a cysteine protease gene expressed in *Toxocara canis* adults and infective stage larvae. *Experimental Parasitology*, *94*(3), 201–207. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4489>
- Fan, C. K., Holland, C. V., Loxton, K., & Barghouth, U. (2015). Cerebral toxocariasis: Silent progression to neurodegenerative disorders? *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 663–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.00106-14>
- Fattah, D. I., Maizels, R. M., McLaren, D. J., & Spry, C. J. F. (1986). *Toxocara canis*: Interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. *Experimental Parasitology*, *61*(3), 421–431. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(86\)90198-0](https://doi.org/10.1016/0014-4894(86)90198-0)
- Fillaux, J., & Magnaval, J. F. (2013). Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary Parasitology*, *193*(4), 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.028>
- Flecher, M. C., Musso, C., Martins, I. V. F., & Pereira, F. E. L. (2016). Larval migration of the ascarid nematode *Toxocara canis* following infection and re-infection in the gerbil *Meriones unguiculatus*. *Journal of Helminthology*, *90*(5), 569–576. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000760>
- Frey, A., Di Canzio, J., & Zurakowski, D. (1998). A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, *221*, 35–41. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00170-7)
- Gavignet, B., Piarroux, R., Aubin, F., Millon, L., & Humbert, P. (2008). Cutaneous manifestations of human toxocariasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *59*(6), 1031–1042. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.06.031>
- Gems, D., Ferguson, C. J., Robertson, B. D., Nieves, R., Page, A. P., Blaxter, M. L., & Maizels, R. M. (1995). An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.31.18517>

- Gems, D., & Maizels, R. M. (1996). An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(4), 1665–1670. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.4.1665>
- Glickman, L. T., & Schantz, P. M. (1981). Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiologic Reviews*, 3, 230–250. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036235>
- Glickman, L. T., & Summers, B. A. (1983). Experimental *Toxocara canis* infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *American Journal of Veterinary Research*, 44(12), 2347–2354.
- González-Páez, G. E., Alba-Hurtado, F., García-Tovar, C. G., & Argüello-García, R. (2014). Proteinases in excretory-secretory products of *Toxocara canis* second-stage larvae: Zymography and modeling insights. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/418708>
- Gonzalez-Quintela, A., Gude, F., Campos, J., Garea, M. T., Romero, P. A., Rey, J., ... Vidal, C. (2006). *Toxocara* infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. *International Archives of Allergy and Immunology*, 139(4), 317–324. <https://doi.org/10.1159/000091603>
- Hayashi, E., Tuda, J., Imada, M., Akao, N., & Fujita, K. (2005). The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among schoolchildren in Manado, Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 36(6), 1399–1406. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16610641/>
- Hogarth-Scott, R. S., Johansson, S. G., & Bennich, H. (1969). Antibodies to *Toxocara* in the sera of visceral larva migrans patients: the significance of raised levels of IgE. *Clinical and Experimental Immunology*, 5(6), 619–625. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4189126>
- Holland, C. V. (2017). Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: The enigma remains. *Parasitology*, 144(1), 81–94. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001407>
- Hotez, P. J. (2020). Toxocariasis: A neglected infection for the Anthropocene epoch. *Advances in Parasitology*, 109, 879–883. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.03.004>

- Hübner, J., Uhlíková, M., & Leissová, M. (2001). Diagnosis of the early state of larval toxocariasis using IgG avidity. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie*, *50*(2), 67–70. Retrieved from <https://europepmc.org/article/med/11329729>
- Ishida, M. M. I., Rubinsky-Elefant, G., Ferreira, A. W., Hoshino-Shimizu, S., & 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*(1), 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.09.005>
- Jarosz, W., Mizgajska-Wiktor, H., Kirwan, P., Konarski, J., Rychlicki, W., & Wawrzyniak, G. (2010). Developmental age, physical fitness and *Toxocara* seroprevalence amongst lower-secondary students living in rural areas contaminated with *Toxocara* eggs. *Parasitology*, *137*(1), 53–63. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990874>
- Jenkins, S. J., & Allen, J. E. (2010). Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1155/2010/262609>
- Jimenez, J. F., Valladares, B., Fernandez-Palacios, J. M., de Armas, F., & del Castillo, A. (1997). A serologic study of human toxocariasis in the Canary Islands (Spain): environmental influences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *56*(1), 113–115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9063372>
- Jin, Y., Shen, C., Huh, S., Choi, M. H., & Hong, S. T. (2015). Cross-reactivity of Toxocariasis with crude antigen of *Toxascaris leonina* larvae by ELISA. *Journal of Korean Medical Science*, *30*(5), 549–551. <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.5.549>
- Jin, Y., Shen, C., Huh, S., Sohn, W. M., Choi, M. H., & Hong, S. T. (2013). Serodiagnosis of toxocariasis by ELISA using crude antigen of *Toxocara canis* larvae. *Korean Journal of Parasitology*, *51*(4), 433–439. <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.4.433>
- Johansson, S. G., Mellbin, T., & Vahlquist, B. (1968). Immunoglobulin levels in Ethiopian preschool children with special reference to high concentrations of immunoglobulin E (IgND). *Lancet*, *1*(7552), 1118–1121. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(68\)90187-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(68)90187-6)
- Khoo, K. H., Maizels, R. M., Page, A. P., Taylor, G. W., Rendell, N. B., & Dell, A. (1991). Characterization of nematode glycoproteins: The major o-glycans of *Toxocara* excretory-secretory antigens are o-methylated trisaccharides. *Glycobiology*, *1*(2), 163–

171. <https://doi.org/10.1093/glycob/1.2.163>
- Kirchner, T., & Altmann, H. W. (1987). Parasitenlarven als Ursache umschriebener Leberherde. Morphologie und Differentialdiagnose. *Pathologe*, 8(1), 31–36.
- Kochanowski, M., Dąbrowska, J., Różycki, M., Sroka, J., Karamon, J., Bełcik, A., ... Cencek, T. (2022). Proteomic Profiling and In Silico Characterization of the Secretome of *Anisakis simplex* Sensu Stricto L3 Larvae. *Pathogens*, 11(2), 246. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020246>
- Kolářová, L. (2006). Tkáňové helmintózy. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*, 12(4), 131–134.
- Kusama, Y., Takamoto, M., Kasaharat, T., Takatsu, K., Nariuchi, H., & Sugane, K. (1995). Mechanisms of eosinophilia in BALB/c-nu/+ and congenitally athymic BALB/c-nu/n nu mice infected with *Toxocara canis*. *Immunology*, 84(3), 461. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7751031/>
- Lassen, B., Janson, M., Viltrop, A., Neare, K., Hütt, P., Golovljova, I., ... Jokelainen, P. (2016). Serological evidence of exposure to globally relevant zoonotic parasites in the Estonian population. *PLoS ONE*, 11(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164142>
- Lee, J. Y., Yang, M. H., Hwang, J. H., Kang, M., Paeng, J. W., Yune, S., ... Choi, D. C. (2015). The prevalence of toxocariasis and diagnostic value of serologic tests in asymptomatic Korean adults. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 7(5), 467–475. <https://doi.org/10.4168/air.2015.7.5.467>
- Liu, H., Zeng, H., Yao, Q., Yuan, J., Zhang, Y., Qiu, D., ... Liu, Z. (2012). *Steinernema glaseri* surface enolase: Molecular cloning, biological characterization, and role in host immune suppression. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 185(2), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.06.006>
- Lombardi, S., Vegni-Talluri, M., Banchieri, L., & Esposito, F. (1990). The in vitro adherence of murine eosinophils, neutrophils and non-induced and induced macrophages to infective larvae of *Toxocara canis* (Nematoda, Ascarididae). *International Journal for Parasitology*, 20(5), 603–613. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90117-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90117-6)
- Loukas, A., Doedens, A., Hintz, M., & Maizels, R. M. (2000a). Identification of a new C-type

- lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. *Parasitology*, *121*(5), 545–554. <https://doi.org/10.1017/s0031182099006721>
- Loukas, A., Hintz, M., Linder, D., Mullin, N. P., Parkinson, J., Tetteh, K. K., & Maizels, R. M. (2000b). A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(50), 39600–39607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005632200>
- Loukas, A., Mullin, N. P., Tetteh, K. K., Moens, L., & Maizels, R. M. (1999). A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Current Biology*, *9*(15), 825–828. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80366-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80366-2)
- Loukas, Alex, Selzer, P. M., & Maizels, R. M. (1998). Characterisation of Tc-cpl-1, a cathepsin L-like cysteine protease from *Toxocara canis* infective larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *92*(2), 275–289. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00245-4)
- Lynn, M. K., Morrissey, J. A., & Conserve, D. F. (2021). Soil-Transmitted Helminths in the USA: a Review of Five Common Parasites and Future Directions for Avenues of Enhanced Epidemiologic Inquiry. *Current Tropical Medicine Reports*, *8*(1), 32–42. <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00221-2>
- Ma, G., Holland, C. V., Wang, T., Fan, C. K., Maizels, R. M., Hotez, P. J., & Gasser, R. B. (2018). Human toxocariasis. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*(1), e14–e24. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6)
- Ma, Guangxu, Rostami, A., Wang, T., Hofmann, A., Hotez, P. J., & Gasser, R. B. (2020). Global and regional seroprevalence estimates for human toxocariasis: A call for action. *Advances in Parasitology*, *109*, 275–290. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.011>
- MagnaVal, J. F., Fabre, R., Maurieres, P., Charlet, J. P., & De Larrard, B. (1992). Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(9), 2269–2274. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.9.2269-2274.1992>
- MagnaVal, J. F., Glickman, L. T., Dorchie, P., & Morassin, B. (2001). Highlights of human toxocariasis. *Korean Journal of Parasitology*, *39*(1), 1–11. <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>

- MagnaVal, J. F., Michault, A., Calon, N., & Charlet, J. P. (1994). Epidemiology of human toxocariasis in La Réunion. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(5), 531–533. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90148-1)
- Maizels, R., Loukas, A., Kennedy, M., & Harnett, W. (2001). The surface and secreted antigens of *Toxocara canis*: genes, protein structure and function. In M. W. Kennedy & W. Harnett (Eds.), *Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology* (pp. 229–246). CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851994239.0229>
- Maizels, R. M. (2013). *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.032>
- Maizels, R. M., de Savigny, D., & Ogilvie, B. M. (1984). Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunology*, 6(1), 23–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1984.tb00779.x>
- Maizels, R. M., Schabussova, I., Callister, D. M., & Nicoll, G. (2006). Molecular Biology and Immunology of *Toxocara canis*. In C. V Holland & H. V Smith (Eds.), *Toxocara: The Enigmatic Parasite* (pp. 3–17). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Maizels, R. M., Tetteh, K. K., & Loukas, A. (2000). *Toxocara canis*: Genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *International Journal for Parasitology*, 30(4), 495–508. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00022-9)
- Maraghi, S., Rafiei, A., Hajihosseini, R., & Sadjjadi, S. M. (2012). Seroprevalence of toxocariasis in hypereosinophilic individuals in Ahwaz, south-western Iran. *Journal of Helminthology*, 86(2), 241–244. <https://doi.org/10.1017/S0022149X11000307>
- Maurelli, M. P., Santaniello, A., Fioretti, A., Cringoli, G., Rinaldi, L., & Menna, L. F. (2019). The presence of *Toxocara* eggs on dog's fur as potential zoonotic risk in animal-assisted interventions: A systematic review. *Animals*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/ani9100827>
- Mazur-Melewska, K., Mania, A., Sluzewski, W., & Figlerowicz, M. (2020). Clinical pathology of larval toxocariasis. *Advances in Parasitology*, 109, 153–163. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.004>
- Mohamad, S., Azmi, N. C., & Noordin, R. (2009). Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant

- antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), 1712–1717. <https://doi.org/10.1128/JCM.00001-09>
- Montaner-Tarbes, S., Galiano, A., Trelis, M., Martin-Jaular, L., del Portillo, H. A., Bernal, D., & Marcilla, A. (2014). The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during parasitic infections. *Frontiers in Immunology*, 5, 433. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00433>
- Morales-Yanez, F. J., Sariego, I., Vincke, C., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Polman, K., & Muyldermans, S. (2019). An innovative approach in the detection of *Toxocara canis* excretory/secretory antigens using specific nanobodies. *International Journal for Parasitology*, 49(8), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.03.004>
- Moreira, G., Telmo, P. D. L., Mendonça, M., Moreira, N., McBride, A., Scaini, C. J., & Conceição, F. R. (2014). Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends in Parasitology*, 30(9), 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.003>
- Mughini-Gras, L., Harms, M., van Pelt, W., Pinelli, E., & Kortbeek, T. (2016). Seroepidemiology of human *Toxocara* and *Ascaris* infections in the Netherlands. *Parasitology Research*, 115(10), 3779–3794. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5139-6>
- Muñoz-Guzmán, M. A., del Río-Navarro, B. E., Valdivia-Anda, G., & Alba-Hurtado, F. (2010). The increase in seroprevalence to *Toxocara canis* in asthmatic children is related to cross-reaction with *Ascaris suum* antigens. *Allergologia et Immunopathologia*, 38(3), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2009.09.007>
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- Nakamura, A., Yasuda, K., Adachi, H., Sakurai, Y., Ishii, N., & Goto, S. (1999). Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264(2), 580–583. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1549>
- Neghina, R., Neghina, A. M., Marincu, I., & Iacobiciu, I. (2011). Epidemiology and history of human parasitic diseases in Romania. *Parasitology Research*, 108(6), 1333–1346. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2256-0>

- Noordin, R., Smith, H. V., Mohamad, S., Maizels, R. M., & Fong, M. Y. (2005). Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Tropica*, 93(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.009>
- Noordin, R., Yunus, M. H., Tan Farrizam, S. N., & Arifin, N. (2020). Serodiagnostic methods for diagnosing larval toxocariasis. *Advances in Parasitology*, 109, 131–152. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.003>
- Noormahomed, E. V., Nhacupe, N., Mascaró-Lazcano, C., Mauaie, M. N., Buene, T., Funzamo, C. A., & Benson, C. A. (2014). A Cross-sectional Serological Study of Cysticercosis, Schistosomiasis, Toxocariasis and Echinococcosis in HIV-1 Infected People in Beira, Mozambique. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9), e3121. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003121>
- Novák, J., Panská, L., Macháček, T., Kolářová, L., & Horák, P. (2017). Humoral response of mice infected with *Toxocara canis* following different infection schemes. *Acta Parasitologica*, 62(4), 823–835. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0099>
- Nutman, T. B. (2015). Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. *Parasite Immunol*, 37(6), 304–313. <https://doi.org/10.1111/pim.12194>
- Obwaller, A., Jensen-Jarolim, E., Auer, H., Huber, A., Kraft, D., & Aspöck, H. (1998). *Toxocara* infestations in humans: Symptomatic course of toxocarosis correlates significantly with levels of IgE/anti-IgE immune complexes. *Parasite Immunology*, 20(7), 311–317. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00146.x>
- Okulewicz, A., Perec-Matysiak, A., Buńkowska, K., & Hildebrand, J. (2012). *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in wild and domestic carnivores. *Helminthologia*, 49(1), 3–10. <https://doi.org/10.2478/s11687-012-0001-6>
- Overgaauw, P. A. M., & Nederland, V. (1997). Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocarosis in dogs and cats. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(3), 233–251. <https://doi.org/10.3109/10408419709115138>
- Overgaauw, P. A. M., & van Knapen, F. (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035>

- Page, A. P., Hamilton, A. J., & Maizels, R. M. (1992a). *Toxocara canis*: Monoclonal antibodies to carbohydrate epitopes of secreted (TES) antigens localize to different secretion-related structures in infective larvae. *Experimental Parasitology*, *75*(1), 56–71. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90122-Q](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90122-Q)
- Page, A. P., Rudin, W., Fluri, E., Blaxter, M. L., & Maizels, R. M. (1992b). *Toxocara canis*: A labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Experimental Parasitology*, *75*(1), 72–86. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90123-R](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90123-R)
- Pavlinová, J., Kinčeková, J., Ostró, A., Saksun, L., Vasilková, Z., & Königová, A. (2011). Parasitic infections and pregnancy complications. *Helminthologia*, *48*(1), 8–12. <https://doi.org/10.2478/s11687-011-0002-x>
- Pawlowski, Z. (2001). Toxocariasis in humans: Clinical expression and treatment dilemma. *Journal of Helminthology*, *75*(4), 299–305. <https://doi.org/10.1017/S0022149X01000464>
- Peixoto, P. L., Nascimento, E., Cançado, G. G. L., Rocha, R. L., Araujo, R. N., & Fujiwara, R. T. (2011). Identification of candidate antigens from adult *Toxocara canis* for the human visceral larva migrans immunodiagnosis. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*(2), 200–206. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000200014>
- Peón, A. N., Ledesma-Soto, Y., Olgúin, J. E., Bautista-Donis, M., Sciutto, E., & Terrazas, L. I. (2017). Helminth Products Potently Modulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Downregulating Neuroinflammation and Promoting a Suppressive Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/8494572>
- Pérez-Morales, D., & Espinoza, B. (2015). The role of small heat shock proteins in parasites. *Cell Stress and Chaperones*, *20*(5), 767–780. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0607-y>
- Perlingiero, J. G., & Gyorgy, P. (1947). Chronic Eosinophilia: Report of a Case with Necrosis of the Liver, Pulmonary Infiltrations, Anemia and *Ascaris* Infestation. *American Journal of Diseases of Children*, *73*(1), 34–43. <https://doi.org/10.1001/ARCHPEDI.1947.02020360041003>
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>

- Pinelli, E., Brandes, S., Dormans, J., Gremmer, E., & Van Loveren, H. (2008). Infection with the roundworm *Toxocara canis* leads to exacerbation of experimental allergic airway inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(4), 649–658. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02908.x>
- Pino, P. A., & Cardona, A. E. (2010). Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. *Journal of Visualized Experiments*, (48). <https://doi.org/10.3791/2348>
- Poulsen, C. S., Skov, S., Yoshida, A., Skallerup, P., Maruyama, H., Thamsborg, S. M., & Nejsum, P. (2015). Differential serodiagnostics of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* - is it possible? *Parasite Immunology*, 37(4), 204–207. <https://doi.org/10.1111/pim.12181>
- Quattrocchi, G., Nicoletti, A., Marin, B., Bruno, E., Druet-Cabanac, M., & Preux, P. M. (2012). Toxocariasis and Epilepsy: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1775. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001775>
- Radovic, I., Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Cvetkovic, J., Mojsilovic, S., Devic, M., & Sofronic-Milosavljevic, L. (2015). Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory-secretory antigens. *Immunologic Research*, 61(3), 312–325. <https://doi.org/10.1007/S12026-015-8626-4>
- Raulf, M. K., Jordan, D., Auer, H., Warnecke, J. M., Lepenies, B., & Strube, C. (2021). A new ELISA and Western Blot technique based on recombinant TES antigen and/or larval antigen for the detection of toxocariasis in humans. *Parasitology*, 148(3), 333–340. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002085>
- Resende, N. M., Gazzinelli-Guimarães, P. H., Barbosa, F. S., Oliveira, L. M. S., Nogueira, D. S., Gazzinelli-Guimarães, A. C., ... Fujiwara, R. T. (2015). New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0962-7>
- Reyes, J. L., Espinoza-Jiménez, A. F., González, M. I., Verdin, L., & Terrazas, L. I. (2011). *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular Immunology*, 267(2), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.11.006>
- Robertson, B. D., Bianco, A. T., Mckerrow, J. H., & Maizels, R. M. (1989). *Toxocara canis*: Proteolytic enzymes secreted by the infective larvae in vitro. *Experimental Parasitology*, 69(1), 30–36. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(89\)90168-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90168-9)

- Romasanta, A., Romero, J. L., Arias, M., Sánchez-Andrade, R., López, C., Suárez, J. L., ... Paz-Silva, A. (2003). Diagnosis of Parasitic Zoonoses by Immunoenzymatic Assays – Analysis of Cross-Reactivity Among the Excretory/Secretory Antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunological Investigations*, 32(3), 131–142. <https://doi.org/10.1081/IMM-120022974>
- Rostami, A., Ma, G., Wang, T., Koehler, A. V., Hofmann, A., Chang, B. C. H., ... Gasser, R. B. (2019a). Human toxocariasis – A look at a neglected disease through an epidemiological ‘prism.’ *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 104002. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104002>
- Rostami, A., Riahi, S. M., Holland, C. V, Taghipour, A., Khalili-Fomeshi, M., Fakhri, Y., ... Gasser, R. B. (2019b). Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(12), e0007809. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007809>
- Rubinsky-Elefant, G., Hirata, C. E., Yamamoto, J. H., & Ferreira, M. U. (2010). Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 104(1), 3–23. <https://doi.org/10.1179/136485910X12607012373957>
- Rudzińska, M., Kowalewska, B., & Sikorska, K. (2017). Clinical usefulness of Western blotting and ELISA avidity for the diagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunology*, 39(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/pim.12400>
- Sager, H., Moret, C. S., Grimm, F., Deplazes, P., Doherr, M. G., & Gottstein, B. (2006). Coprological study on intestinal helminths in Swiss dogs: Temporal aspects of anthelmintic treatment. *Parasitology Research*, 98(4), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0093-8>
- Sánchez, S. S., García, H. H., & Nicoletti, A. (2018). Clinical and magnetic resonance imaging findings of neurotoxocariasis. *Frontiers in Neurology*, 9, 53. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00053>
- Schabussova, I., Amer, H., van Die, I., Kosma, P., & Maizels, R. M. (2007). O-Methylated glycans from *Toxocara* are specific targets for antibody binding in human and animal infections. *International Journal for Parasitology*, 37(1), 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.09.006>

- Schacher, J. F. (1957). A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. *The Journal of Parasitology*, 43(6). <https://doi.org/10.2307/3286548>
- Schnieder, T., Laabs, E. M., & Welz, C. (2011). Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 175(3–4), 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.027>
- Sewell, D., Qing, Z., Reinke, E., Elliot, D., Weinstock, J., Sandor, M., & Fabry, Z. (2003). Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *International Immunology*, 15(1), 59–69. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg012>
- Shahbakhsh, M., Hosseini, S., Bonab, S., Malekzadeh, P., Moghadasi, A., Shayan, P., ... Jalousian, F. (2022). Recombinant C-type lectin protein of *Toxocara canis* increases the population of spleen Foxp3⁺ regulatory T cells in BALB/c mice. *Annals of Parasitology*, 68(1), 143–149. <https://doi.org/10.17420/ap6801.418>
- Skulinová, K., Novák, J., Kašný, M., & Kolářová, L. (2020). Seroprevalence of Larval Toxocarosis in the Czech Republic. *Acta Parasitologica*, 65, 68–76. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00121-0>
- Smith, H., & Noordin, R. (2006). Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. In C. V Holland & H. V Smith (Eds.), *Toxocara: The Enigmatic Parasite* (pp. 89–112). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Smith, H. V., Holland, C., Taylor, M., Magnaval, J. F., Schantz, P. M., & Maizels, R. M. (2009). How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.00650>
- Sperotto, R. L., Kremer, F. S., Aires Berne, M. E., Costa de Avila, L. F., da Silva Pinto, L., Monteiro, K. M., ... Borsuk, S. (2017). Proteomic analysis of *Toxocara canis* excretory and secretory (TES) proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 211, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.09.002>
- Stejskal, F. (2005). Současná léčba helmintóz. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 19, 111–115.
- Stensvold, C. R., Skov, J., Møller, L. N., Jensen, P. M., Kapel, C. M. O., Petersen, E., & Nielsen, H. V. (2009). Seroprevalence of human toxocariasis in Denmark. *Clinical and*

- Vaccine Immunology*, 16(9), 1372–1373. <https://doi.org/10.1128/CVI.00234-09>
- Strube, C., Heuer, L., & Janecek, E. (2013). *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 375–389. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033>
- Strube, C., Waindok, P., Raulf, M. K., & Springer, A. (2020). *Toxocara*-induced neural larva migrans (neurotoxocarosis) in rodent model hosts. *Advances in Parasitology*, 109, 189–218. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.006>
- Su Park, M., Joon Ahn, Y., & Rye Moon, K. (2010). Familial Case of Visceral Larval Migrans of *Toxocara canis* after Ingestion of Raw Chicken Liver. *Korean Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 13(1), 70–74. <https://doi.org/10.5223/KJPGN.2010.13.1.70>
- Takamoto, M., Ovington, K. S., Behm, C. A., Sugane, K., Young, I. G., & Matthaei, K. I. (1997). Eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57B1/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunology*, 90(4), 511–517. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00208.x>
- Taylor, M. R. (2001). The epidemiology of ocular toxocariasis. *Journal of Helminthology*, 75(2), 109–118. <https://doi.org/10.1079/JOH200175>
- Taylor, M. R. H. (2006). Ocular toxocariasis. In C. V. Holland & H. V. Smith (Eds.), *Toxocara: The Enigmatic Parasite* (pp. 127–144). CABI Publishing.
- Taylor, M. R. H., Keane, C. T., O’connor, P., Anthony Girdwood, R. W., & Smith, H. (1987). Clinical features of covert toxocariasis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 19(6), 693–696. <https://doi.org/10.3109/00365548709117206>
- Tetteh, K. K., Loukas, A., Tripp, C., & Maizels, R. M. (1999). Identification of abundantly expressed novel and conserved genes from the infective larval stage of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy. *Infection and Immunity*, 67(9), 4771–4779. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4771-4779.1999>
- Uhlíková, M., & Hübner, J. (1998). Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in Czech Republic. *Central European Journal of Public Health*, 6(3), 195–198. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9787920>
- Waindok, P., Raulf, M.-K., Springer, A., & Strube, C. (2021). The Zoonotic Dog Roundworm *Toxocara canis*, a Worldwide Burden of Public Health. *Dog Parasites Endangering*

Human Health, 5–26. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53230-7_2

- Wang, X., Zhou, S., Chi, Y., Wen, X., Hoellwarth, J., He, L., ... Su, C. (2009). CD4+CD25+ Treg induction by an HSP60-derived peptide SJMHE1 from *Schistosoma japonicum* is TLR2 dependent. *European Journal of Immunology*, 39(11), 3052–3065. <https://doi.org/10.1002/eji.200939335>
- Wang, Z., Shibata, M., Nguyen, Y. T. H., Hayata, Y., Nonaka, N., Maruyama, H., & Yoshida, A. (2018). Development of nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Ascaris suum* contamination in meat and organ meats. *Parasitology International*, 67(5), 622–626. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.06.006>
- Wangchuk, P., Lavers, O., Wishart, D. S., & Loukas, A. (2020). Excretory/secretory metabolome of the zoonotic roundworm parasite *Toxocara canis*. *Biomolecules*, 10(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom10081157>
- Wattanakuppanich, D. (2010). Diagnostic Trends of Human Toxocariasis. *Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 33(1), 44–52.
- Williamson, A. L., Brindley, P. J., & Loukas, A. (2003). Hookworm cathepsin D aspartic proteases: Contributing roles in the host-specific degradation of serum proteins and skin macromolecules. *Parasitology*, 126(2), 179–185. <https://doi.org/10.1017/S0031182002002706>
- Won, K. Y., Kruszon-Moran, D., Schantz, P. M., & Jones, J. L. (2008). National seroprevalence and risk factors for zoonotic *Toxocara* spp. infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(4), 552–557.
- World Medical Association Declaration of Helsinki. (2013). *JAMA*, 310(20), 2191. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
- Wu, T., & Bowman, D. D. (2020). Visceral larval migrans of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* in non-canid and non-felid hosts. *Advances in Parasitology*, 109, 63–88. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.02.001>
- Yunus, M. H., Farrizam, S. N. T., Karim, I. Z. A., & Noordin, R. (2018). A lateral flow rapid test for human toxocariasis developed using three *Toxocara canis* recombinant antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(1), 32–38.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0632>

- Zahabiun, F., Sadjjadi, S. M., Yunus, M. H., Rahumatullah, A., Moghaddam, M. H. F., Saidin, S., & Noordin, R. (2015). Production of *Toxocara cati* TES-120 recombinant antigen and comparison with its *T. canis* homolog for serodiagnosis of toxocariasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(2), 319–325. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0190>
- Zhan, B., Ajmera, R., Geiger, S. M., Gonçalves, M. T. P., Liu, Z., Wei, J., ... Hotez, P. (2015). Identification of immunodominant antigens for the laboratory diagnosis of toxocariasis. *Tropical Medicine and International Health*, 20(12), 1787–1796. <https://doi.org/10.1111/tmi.12607>
- Zhan, B., Liu, Y., Badamchian, M., Williamson, A., Feng, J., Loukas, A., ... Hotez, P. J. (2003). Molecular characterisation of the *Ancylostoma*-secreted protein family from the adult stage of *Ancylostoma caninum*. *International Journal for Parasitology*, 33(9), 897–907. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00111-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00111-5)
- Zhou, R., Jia, H., Du, Z., Jiang, A., Song, Z., Wang, T., ... Ma, G. (2022). The non-glycosylated protein of *Toxocara canis* MUC-1 interacts with proteins of murine macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(9), e0010734. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010734>
- Zhu, H. H., Ma, G. X., Luo, Y. F., Luo, Y. L., Yin, S. S., Xiong, Y., & Zhou, R. Q. (2017). Tissue distribution and functional analysis of vitellogenin-6 of *Toxocara canis*. *Experimental Parasitology*, 177, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.03.009>
- Zhu, X. Q., Korhonen, P. K., Cai, H., Young, N. D., Nejsun, P., Von Samson-Himmelstjerna, G., ... Gasser, R. B. (2015). Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*. *Nature Communications*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms7145>
- Zibaei, M., Firoozeh, F., Bahrami, P., & Sadjjadi, S. M. (2013). Investigation of Anti-*Toxocara* Antibodies in Epileptic Patients and Comparison of Two Methods: ELISA and Western Blotting. *Epilepsy Research and Treatment*, 2013, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2013/156815>

9.1 Publikace č. 1

Acta Parasitologica
<https://doi.org/10.2478/s11686-019-00121-0>

ORIGINAL PAPER



Seroprevalence of Larval Toxocarosis in the Czech Republic

Katerina Skulinova¹ · Jan Novak¹ · Martin Kasny^{2,3} · Libuse Kolarova^{1,4}

Received: 16 May 2019 / Accepted: 9 September 2019
 © Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences 2019

Abstract

Background Larval toxocarosis (LT), a zoonotic disease transmitted by dogs, cats, and other carnivores, is caused by roundworms of the genus *Toxocara*. Humans become infected by ingesting embryonated eggs of this parasite. In this study, we present data on the seroprevalence of LT in the Czech Republic collected by the National Reference Laboratory for Tissue Helminthoses in 2012–2016.

Methods Using enzyme-linked immunosorbent assay, a total of 4428 adults and children with or without clinical symptoms were examined for the presence of IgG antibodies against *Toxocara canis* excretory–secretory antigens.

Results Of all the persons examined, specific *Toxocara* antibodies were detected in 160 (3.6%) individuals. There were, however, significant differences between various regions, with seropositivity rates ranging from 1.4 to 7.5%.

Conclusion In comparison to studies from 1998 and 2004, our results suggest a decrease in overall *Toxocara* seroprevalence in the Czech population, whereby the rates are similar to or even lower than rates in some other Central European countries.

Keywords Seroprevalence · *Toxocara canis* · *Toxocara cati* · Toxocarosis · Zoonosis · Czech Republic

Introduction

Larval toxocarosis (LT) is a cosmopolitan zoonotic disease caused by *Toxocara canis* or *T. cati*. Infection is acquired by ingesting eggs that contain infective third-stage larvae (L3) [1]. Parasite eggs are released with the feces of various definitive carnivore hosts (dogs, cats, foxes, etc.) as immature ova, which then mature within several weeks. In the lifecycle of roundworms, humans—as well as some other animals, such as rodents, pigs or poultry—represent accidental (paratenic) hosts [2], in whose bodies the parasites do not mature into the adult stage. After the ingestion of infective

eggs, larvae hatch in the host's small intestine, penetrate the mucosa, and migrate further to various organs. The initial phase of infection corresponds to the early phase of infection in the definitive hosts, in that the most affected organs are the liver and the lungs, where tissue injuries develop. Under certain circumstances, which depend mainly on host's immune status, the larvae encapsulate and remain in an arrested stage of development (dormant stadia) [1]. Even so, however, they induce an inflammatory response in the surrounding tissue.

LT usually develops after consumption of contaminated food, water, or soil, but ingestion of infective eggs present on the fur of pets is also possible. Last but not least, consumption of undercooked meat from paratenic hosts which contains encapsulated larvae can also result in LT [3].

A broad range of clinical manifestations can develop after the ingestion of parasite eggs, spanning from asymptomatic infection to severe multiorgan failure [1, 4–7]. The clinical course of the disease depends on the intensity of infection, type of affected tissue, and immune status of the exposed individual [2]. In humans, heavy infection can result in a visceral larva migrans syndrome, which can lead to serious and irreversible damage of the internal organs. Infections with a lower number of larvae can lead to a rare ocular toxocarosis, an eye injury which usually

✉ Libuse Kolarova
 parazit@vfn.cz

¹ Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

² Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

³ Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁴ National Reference Laboratory for Tissue Helminthoses, General Faculty Hospital in Prague and the First Faculty of Medicine, Charles University, Studničkova 7, 128 00 Prague, Czech Republic

appears later in life. The disease can also manifest itself as neurotoxocarosis, which involves various neurological disorders, or as a covert toxocarosis with non-specific clinical signs but *Toxocara* seropositive results [1, 4, 6].

The most typical laboratory findings, especially in the acute phase of visceral larva migrans syndrome, are leucocytosis with predominance of eosinophils, decreased albumin/globulin ratio, IgM, IgG, and IgE hypergammaglobulinemia, and increased anti-A or anti-B isohemagglutinin titers [1].

The most frequently used diagnostic tool for LT are immunological tests, especially enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the detection of anti-*T. canis*-specific IgG antibodies, where larval parasite excretory–secretory products (TES) are used as a pooled antigen [8]. Sensitivity and specificity of these methods are approximately 91% and 86%, respectively. Alternatively, a soluble fraction of larval somatic homogenate can be used as an antigen of comparable efficacy [9]. Although ELISA tools are sensitive, it is recommended that obtained results should be confirmed by additional immunochemical methods, such as Western Blot [10]. Due to possible cross-reactivity of antibodies with antigens of different helminths, reconfirmation of positive results is necessary especially in cases where polyparasitism is a relevant possibility [11]. Recently, recombinant forms of several particular protein antigens have also been tested. Their specificity and potential for implementation as relevant markers in commercial kits are promising [12, 13], but native TES antigens are still the dominant method in routine detection of *Toxocara*-specific antibodies. Direct diagnostic methods of LT include a histopathological examination of tissue biopsies for presence of *Toxocara* spp. larvae, but this is used only in specific cases [5].

Benzimidazoles (albendazole, mebendazole, thiabendazole) are the drugs of choice for LT treatment. Diethylcarbamazine can also be used but this treatment is suitable only for acute LT or to prevent larvae from entering the central nervous system or eyes. Treatment should be supplemented by corticosteroids (usually in cases of ocular toxocarosis) because decaying granulomas containing larvae may cause immune system's inflammatory response to *Toxocara* antigens. Covert toxocarosis is usually left untreated and non-specific symptoms, if present, fade away with no need of drug treatment [14, 15].

The study aims to map the current seroprevalence of larval toxocarosis in the Czech Republic (2012–2016). We had the intention to present complex data which are discussed not only in relation to local trends and tendencies in the seroprevalence of larval toxocarosis but also in the context of published data from other European countries.

Methods

In 2012–2016, a total of 4428 human blood or serum samples with various diagnoses were provided by physicians of different specializations. The samples were obtained on a routine basis. All analyses were performed in the National Reference Laboratory for Tissue Helminthoses. All samples were tested for the presence of IgG specific antibodies to *T. canis* TES antigens.

Serological examination was performed by in-house IgG ELISA method using larval *T. canis* TES antigen prepared as described by de Savigny [8]. Nunc Maxisorp 96-well microplates (Thermo-Fisher Scientific, USA) were coated with 100- μ l antigen diluted in a bicarbonate buffer (50 mM, pH 9.6) and incubated overnight at 4 °C. The plates were washed three times with 0.05% Tween 20 in PBS (100 mM, pH 7.2) and 100 μ l of serum samples diluted at 1:200 (PBS with Tween 20) were added. After 1-h incubation at 37 °C, the plates were washed three times and bound antibodies were detected using horseradish peroxidase-labeled goat anti-human IgG conjugate (Calbiochem, USA) diluted at 1:60,000 (100 μ l per well). After incubation for 1 h at 37 °C, the plates were washed three times with 0.05% Tween 20 in PBS. The reaction was visualized by adding 100 μ l of substrate (*O*-phenylenediamine) with 0.05% H₂O₂ in a citrate buffer (50 mM, pH 5.0). The reaction was stopped after 15 min of incubation in the dark at laboratory temperature by addition of 50 μ l of 2 M H₂SO₄, and optical density was measured spectrophotometrically at 490 nm (MR5000, Dynatech).

Samples recognized as *Toxocara* spp. positive were retested using a commercial ELISA kit (TestLine Clinical Diagnostics, Czech Republic) according to manufacturer's instructions. Only samples of patients seropositive in both tests were included as infected persons in subsequent statistical analyses.

To obtain anamnestic data of patients, i.e., their gender, age, place of residence, results of serological findings, and clinical status at the time of LT diagnosis, a questionnaire was included in the present study, logged, and analyzed (Excel, MS Office 2010, Microsoft, Redmont, WA, USA). Chi-squared test (Graph Pad, San Diego, CA) was used to assess statistical differences between the categorical variables in case of two categories—males and females in particular age groups and age groups regardless of sex ($P < 0.05$).

All procedures performed in this study were in accordance with WMA Declaration of Helsinki–Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [16].

Results

Of the total of 4428 patients examined (2320 females and 2108 males), 412 were children, teenagers or young adults (0–19 years old), and 4016 were adults (≥ 20 years old). Specific antibodies were detected in 160 (3.6%) patients (Table 1): 74 females (3.4%) and 86 males (3.8%). Among children and teenagers, antibodies were detected in 16 individuals (3.9%), among adults in 144 persons (3.6%). All cases were classified as LT.

The youngest and the oldest patient was 4 and 75 years old, respectively (Table 1). The mean age and median age of seropositive patients was 48.1 and 51, respectively. These values were lower in males (mean 47.2; median 49) than in females (mean 49.1; median 51). Differences between the children and adults ($P=0.781$) and ratios of males and females regardless of age groups ($P=0.126$) were, however, not statistically significant.

Highest seropositivity rates were detected in adults of both sexes in age groups 70–79 and 60–69 years (Fig. 1), while the lowest number of seropositive individuals was found in females and males in age groups 20–29 and 30–39 years, respectively. Differences between ratios of males and females in each age group were not statistically significant ($P > 0.05$). There was significant difference between age groups 0–9 and 20–29 ($P=0.037$), 0–9 and 30–39 ($P=0.046$), 20–29 and 40–49 ($P=0.016$), 20–29 and 50–59 ($P=0.005$), 20–29 and 60–69 ($P < 0.0001$), 20–29 and 70–79 ($P=0.0008$), 30–39 and 40–49

($P=0.014$), 30–39 and 50–59 ($P=0.004$), 30–39 and 60–69 ($P < 0.0001$), 30–39 and 70–79 ($P=0.004$) regardless of sex.

In 2012–2016, overall seroprevalence of LT in the Czech Republic reached 3.6% (Table 2), but there were notable differences between various Czech and Moravian regions (Fig. 2). The origin of seropositive patients varied between regions, but most came from Prague and Southern Moravia (Table 2, Fig. 2).

By place of residence, the highest number of seropositive patients came from Ústí nad Labem (7.5%), Liberec (7.1%), and South Moravian (7.0%) regions, while the lowest seroprevalence (1.4%) was recorded in Zlín region.

Serological examination was mostly requested by infectiousologists, followed by allergologists and immunologists, internists, and pediatricians (Table 3).

As mentioned above, according to the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10) [17], final diagnoses were classified as visceral larva migrans syndrome (B830). On the other hand, analysis of initial diagnoses made by physicians during the initial physical examinations of patients had shown that only in 21 seropositive patients (13%) was visceral larva migrans syndrome noted as the main complaint. In the remaining 139 patients (87%), requests for serological examination were made because of unspecified fever (R509), need for special screening for other infectious and parasitic diseases (Z118), special screening for unspecified infectious and parasitic diseases (Z119), observation of unspecified suspected disease or condition (Z039), unspecified immunodeficiency (B849), unspecified liver disease (K769), or eosinophilia (D721).

Table 1 Gender and age of *Toxocara* spp. seropositive patients during the period of 2012–2016

Sex	Year	No.	0–9	10–19	20–29	Age groups (Years)		50–59	60–69
						30–39	40–49		
Male	2012	28	1	2	3	4	4	5	7
	2013	18	0	2	1	3	6	3	4
	2014	17	1	1	1	3	3	3	4
	2015	6	0	1	0	0	1	1	3
	2016	17	2	0	1	1	2	5	1
	Total	86	4	6	6	11	16	15	19
Female	2012	31	3	2	0	5	5	5	9
	2013	22	1	0	0	2	6	4	4
	2014	8	0	0	0	2	2	1	3
	2015	5	0	0	1	0	1	1	2
	2016	8	0	0	3	0	1	1	2
	Total	74	4	2	4	9	15	14	20
Total male and female	2012	59	4	4	3	9	9	10	16
	2013	40	1	2	1	5	12	7	8
	2014	25	1	1	1	5	5	4	7
	2015	11	0	1	1	0	2	2	5
	2016	25	2	0	4	1	3	6	3
	Total	160	8	3	10	20	31	29	39

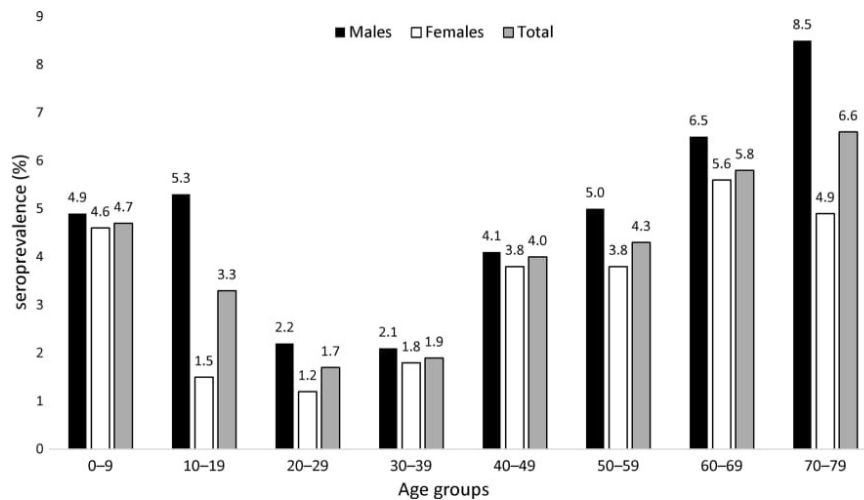


Fig. 1 *Toxocara* spp. seropositive patients according to the sex and age in 2012–2016

Table 2 The number of patients from various regions of the Czech Republic who were examined by the National Reference Laboratory for Tissue Helminthoses for the presence of *Toxocara* spp. antibodies in 2012–2016

Region	Number of patients	Seropositive patients	Seroprevalence (%)
Prague	2059	54	2.6
Central Bohemian region	176	9	5.1
South Bohemian region	292	11	3.7
Plzen region	154	6	3.6
Karlovy Vary region	42	2	4.7
Usti nad Labem region	53	4	7.5
Liberec region	70	5	7.1
Hradec Kralove region	153	5	3.2
Pardubice region	289	11	3.8
Vysocina region	184	11	5.9
South Moravian region	413	29	7.0
Olomouc region	102	3	2.9
Moravian-Silesian region	243	8	3.3
Zlin region	70	1	1.4
Not available	118	1	0.8
Total	4428	160	3.6

Discussion

Our study presents serological data on the occurrence of LT in various parts of the Czech Republic in 2012–2016. Similar to other comparable studies [18–20], most patients

were examined due to suspected visceral larva migrans syndrome, but in some cases, special screening was also requested only due to eosinophilia or elevated total-IgE levels detected earlier.

Among the Czech regions, mean seroprevalence rates varied from 1.4 to 7.5%, with the overall mean at 3.6%. Such generally low seroprevalence rates were observed also in the neighboring Austria [21], but not in western Slovakia [22] or Poland [10]. In Austria, a country with similar demographic profile as the Czech Republic, the values ranged from 1.4 to 3.7% in the general population, but in persons engaged in high-risk occupations, such as farmers, it reached 44.0% [21]. In Slovakia, overall seroprevalence rate is estimated to be between 5.5 and 15.3%, but in socioeconomically disadvantaged minorities, often those with lower hygiene standards, the value reaches 22.1% [22, 23] (Table 4). In Poland, overall seroprevalence is estimated to range between 6.1 and 29.6% [10], but this estimate is based on analyses of data from four geographically distant parts of the country and different age groups. In Germany, the last country neighboring the Czech Republic, recent data on LT seroprevalence are missing.

Numbers of patients examined by the National Reference Laboratory for Tissue Helminthoses differed among the regions of the Czech Republic (Table 2) because LT serology can also be performed in another 36 Czech laboratories. Nevertheless, communication with these laboratories revealed analogous results in different regions. Similarly as in other European countries, Czech data (Fig. 2) confirm that elevated risk of infection by *Toxocara* spp. is linked

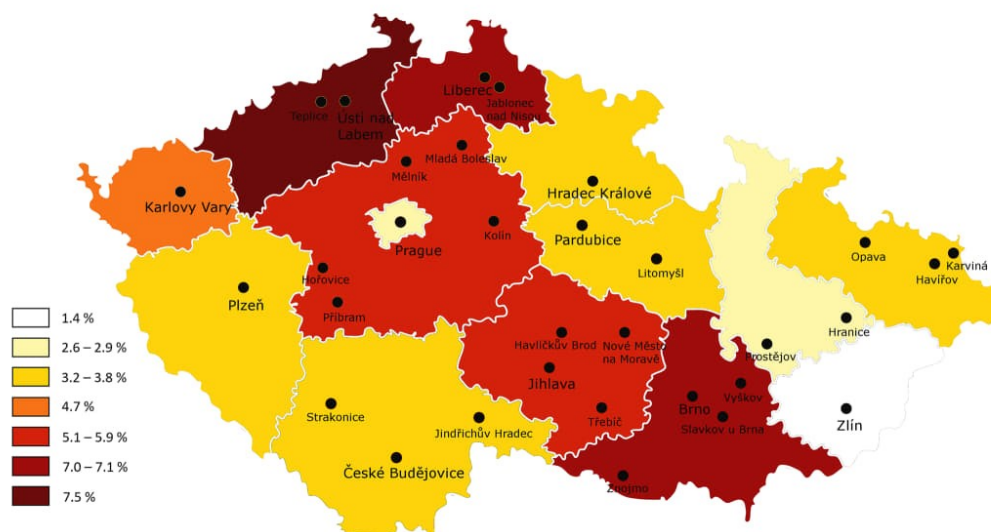


Fig. 2 *Toxocara* spp. seroprevalence rates (in %) in various regions of the Czech Republic in 2012–2016. Medical facilities which requested a serological examination for LT are marked by a dot (•)

Table 3 The number of examinations for LT requested by various medical specialists in 2012–2016

Medical department	Number of patients	Number of seropositive patients	Seropositivity ratio (%)
Infectology	2863	97	3.4
Allergology and Immunology	394	9	2.3
Internal medicine	217	10	4.6
Pediatrics	176	14	8.0
Self-paying patients	111	1	0.9
General practitioners	86	3	3.5
Pulmonary department	75	3	4.0
Ophthalmology	75	5	6.7
Hematology department	74	7	9.5
Gastroenterology	67	1	1.5
Others	290	10	3.5
Total	4428	160	3.6

to a number of geographic, socioeconomic, ecological, and genetic factors as well as population structure, residence in rural areas, etc. [24]. In our country, the highest seroprevalence was noted in Ústí nad Labem (7.5%) and Liberec (7.1%) regions, i.e., in areas with a higher incidence of socially excluded population and higher unemployment rates (according to 2016 data of the Ministry of Labor and

Social Affairs) [25]. In areas with similar characteristics, i.e., in the Moravian-Silesian (3.3%), Olomouc (2.9%), and Zlín (1.4%) regions, figures did not, however, follow this pattern; this may be due to a lower number of patients which were screened by us (Table 2). In eastern Moravia, Silesia, and Zlín, patients are usually examined for LT in hospitals of the regional capitals, that is, in Ostrava, Olomouc and Zlín, and these data were not available in detail.

Among the factors which influence the occurrence of LT, environmental conditions play an important role. Although in Europe, seroprevalence is rather high in some countries with warm and humid climate, such as Bulgaria, low seroprevalence in general tends to be associated with colder regions and countries, such as Denmark (Table 4) [26, 27]. The relatively high seroprevalence rate in southern Moravia (7.0%) is probably due to specific climatic and other factors of the area: according to data of the Czech Meteorological Institute, the region has the highest average annual temperature in the Czech Republic and it is a fertile rural lowland, where relatively many people are engaged in agriculture, including wine production, similarly as noted Deutz et al. [21]. On the other hand, a German study [28] revealed that in sandpits, highest numbers of infective eggs were present during the cold months, which may suggest that lower temperatures positively influence the viability (i.e., infectivity) of *Toxocara* spp. eggs. Our study does not support this hypothesis, because our unpublished observations show a

Table 4 Seroprevalence of LT in Europe in 2000–2018

Country	Seroprevalence (%)	Region	Studied population	References
Austria	1.4–3.7			*Deuz et al. (2005) [21]
Bulgaria	19.3	WC	WP	Rainova et al. (2018) [27]
Croatia	31.0	Zagreb city	CH	Sviben et al. (2009) [50]
Oenmgrk	2.4	WC	WP	Stensvold et al. (2009) [26]
Estonia	7.9–13.3	WC	A/CH	Lassen et al. (2016) [51]
Greece	12.5	Northern Greece and Macedonia	CH	Theodoridis et al. (2001) [52]
Italy	1.6	Marche region	A	Habluetzel et al. (2003) [53]
	4.3	Ancona city	WP	Giacometti et al. (2000) [54]
	6.6–11.8	Catania, Sicily	A	Nicoletti et al. (2008) [19]
Netherlands	8.0	WC	WP	Mughini-Gras et al. (2016) [35]
Norway	11.7	WC	A	Jogi et al. (2018) [55]
Poland	6.1–29.6			*Rudzinska et al. (2017) [10]
	6.1	Trl-City area	CH	Kotlowski et al. (2011) [56]
	7.3	Poznari city	CH	Luzna-Lyskov (2000) [57]
	12.9	East and Southeastern Poland	AF	Zukiewicz-Sobczak et al. (2014) [58]
	14.5	Poznań city	CH	Jarosz et al. (2010) [59]
	20.7	North Eastern Poland	WP	Hermanowska-Szpakowicz et al. (2001) [60]
Romania	30.0			*Neghina et al. (2011) [61]
Russia (European part)	5.4–7.4			*Moskvina and Ermolenko (2016) [62]
Serbia	13.0	North, East and Southeastern Serbia	WP	Gabrielli et al. (2017) [63]
	26.4	Belgrade city	WP	Colovic-Calovski et al. (2014) [64]
Slovakia	5.5	Eastern Slovakia	AW	Pavlinova et al. (2011) [65]
	15.3	Western Slovakia (4 regions)	WP	Boldiš et al. (2015) [22]
Slovenia	28.0	WC	WP	Logar et al. (2004) [66]
Spain	28.6	A Estrada region	A	Gonzalez-Quintela et al. (2006) [67]
Switzerland	2.7–6.5			*Sager et al. (2006) [68]

WC whole country, WP whole population, CH children, A adults, A/CH adults and children, AW adult women, AF adult foresters

*Review

higher number of patients with confirmed seropositivity in early spring and autumn, that is, during the moderately warm months when people engage in outdoor activities including gardening, harvesting, etc.

In comparison to data from 2006 [29] and 1998 [30], when overall LT seroprevalence in the Czech Republic ranged between 18 and 20% [29] and 18.4% (minimum 5.8%, maximum 36% in particular regions) [30], our recent data show a general decrease to 3.6%. In part, this finding could be explained by different cohorts of patients in mentioned studies. Uhlíková and Hübner (1998) [30] and Kolářová [29] based their data on the examination of individuals some of whom were asymptomatic. Our results are based on a cohort of mostly symptomatic patients referred by specialized medical departments, i.e., a pre-selected group of people suffering from various health disorders. It should be noted that the seropositivity of healthy Czech population could be lower.

Not surprisingly, specialized examination was recommended mostly by infectologists (Table 3); the number of requests for LT examination from other medical specialists, such as allergologists, immunologists, internists, and pediatricians, was relatively much lower. Even so, this seems to suggest good awareness of LT symptoms and related laboratory findings across various medical specializations. It also reflects a functioning system of screening where patients go through a checklist, step by step, first for a basic check-up, then to specialists, mostly infectologists, and finally their samples are sent for a specialized examination to parasitological laboratories.

Similar to other studies [22, 26, 31–34], we found no statistically significant differences in seroprevalence rates between children/teenagers and adults or between men and women, although men in all age groups had higher seropositivity rates than women. While in young children (0–9 years), overall seropositivity in males (4.9%) was

slightly higher than in females (4.6%); in older children and teenagers (10–19 years), the difference between the sexes was more pronounced, reaching seropositivity rates of 5.3% and 1.5% in males and females, respectively. However, this difference was not significant ($P=0.15$).

The highest seroprevalence in men (8.5%) was noted in the 70–79 age group, whereas in women it was in the 60–69 age group (5.6%). For both sexes jointly, the lowest values were found in age groups 20–29 years (1.7%) and 30–39 years (1.9%). The seroprevalence rates were significantly lower compared to most age groups. Mean seropositivity, again for both sexes jointly, for children of 0–9 years of age and teenagers of 10–19 years was only 4.7% and 3.3%, respectively, which contrasts with the age group of 70–79 years, where the value reached 6.6% with no statistical significance.

The median age of all our positive patients was 51 years, which may suggest that the risk of infection is higher in older people who have been continuously exposed to *Toxocara* spp. eggs over a long period of time [35, 36]. Moreover, our results reflect the fact that the current generation of seniors grew up mostly in rural areas where they often engaged in an ‘agricultural lifestyle’, including gardening as a hobby, and close contact with contaminated soil seems to be the primary route of transmission of *Toxocara* spp. eggs to humans [7]. And last but not least, our results also confirm long-lasting IgG seropositivity in patients even 10 years post infection [30, 37].

In children, the noted lower seroprevalence contrasts with their vulnerability to infections due to deficient hygienic habits and activities such as playing in sandpits [38–40]. Approximately 20 years ago, Uhlíková and Hübnér [30] reported a 13.8% LT seroprevalence in children aged 1–14 years. Our lower values may reflect a higher level of sand quality control in sandpits in recent years. On the other hand, however, despite the decrease of infection risk by *Toxocara* spp. eggs by more intensive controls (Act No. 258/2000 Coll. on protection of public health and Decree 97/2014 Coll.), prevalence of *Toxocara* spp. eggs in some Prague sandpits in 2000–2013 reached 11.9%, which is almost the same as estimated 40 years ago (12.1%) [41, 42]. Nevertheless, it seems that intensive application of precautions against infection, including a strict ban on animal access to children’s playgrounds (fencing of the sandpits and use of covers), led to a decrease of infection risk by parasite eggs similarly as reported, for instance, in Turkey [43].

Toxocara canis is considered to be the main source of LT. In some cases, however, *T. cati* eggs discharged by cats can also spread the infection. The importance of *T. cati* is often overlooked because many studies on *Toxocara* spp. soil contamination do not differentiate between the species of the eggs. In The Netherlands, the prevalence of dogs

shedding eggs was 4.6%; while for cats, the figure was 7.2% [44, 45]. Moreover, a stochastic model estimated that Dutch stray and household cats contribute to soil contamination by 46%, while dogs and foxes are responsible for 39% and 15%, respectively [46]. The presence of rodents in urban areas and increasing synantrophy make red foxes a potential reservoir of LT that should not be underestimated [47, 48]. In Poland, the situation is even worse: 27.9% of examined fecal samples positive for *Toxocara* spp. eggs originated from stray cats, which is significantly more than the 16.8% deposited by stray dogs [49]. In the Czech Republic, no study focused specifically on *T. cati* prevalence in the past 50 years, but it can be expected, according to similar socioeconomic and geographic factors, that the situation could be analogical to that of our Polish neighbors. Despite the presented data, the seroprevalence in the Czech Republic is rather low in relation to the increasing number of dogs and cats all over Europe. And while stray dogs are relatively rare in the Czech Republic, there are many stray cats, both in urban and rural areas, which possibly could be overlooked reservoir of infection in the future.

Conclusion

For the period of 2012–2016, overall LT seroprevalence in the Czech Republic is estimated at 3.6%, which is a lower value than in the past. Studies performed 21 and 13 years ago reported rates of 5.8%–36.0% [30] and 18%–20%, respectively [29]. Our data, therefore, clearly suggest a current decrease in seroprevalence of larval toxocarosis. In comparison to data from neighboring countries, Czech seropositivity rates are relatively low and comparable to the situation in Austria. Recorded decrease in the risk of LT infection in humans may be linked to an increased percentage of dogs and cats which are regularly dewormed as recommended by the Czech authorities, and in part also attributed to improved habits of pet owners, who more frequently collect their pet’s excrements. Nevertheless, it seems that the most important source of infection is soil contaminated with *Toxocara* spp. eggs via the feces of dogs and cats.

Acknowledgements We would like to thank Markéta Leissová for technical assistance during the examination and Anna Pilátová, Ph.D. for editing the final draft. The study was supported by the Charles University under Grants [GA UK 902217, Progres Q25 and SVV 260369].

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors report no conflict of interest.

References

- Glickman LT, Schantz PM (1981) Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocarosis. *Epidemiol Rev* 3:230–250
- Strube C, Heuer L, Janecek E (2013) *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol* 193:375–389
- Overgaauw PAM, van Knapen F (2013) Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol* 193:398–403
- Magnaval JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B (2001) Highlights of human toxocarosis. *Korean J Parasitol* 39:1–11
- Despommier D (2003) Toxocarosis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev* 16:265–272
- Fan CK, Holland CV, Loxton K, Barghouth U (2015) Cerebral toxocarosis: Silent progression to neurodegenerative disorders? *Clin Microbiol Rev* 28:663–686
- Holland CV (2017) Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. *Parasitology* 144:81–94
- de Savigny DH (1975) In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitol* 61:781–782
- Jin Y, Shen C, Huh S, Sohn WM, Choi MH, Hong ST (2013) Serodiagnosis of toxocarosis by ELISA using crude antigen of *Toxocara canis* larvae. *Korean J Parasitol* 51:433–439
- Rudzińska M, Kowalewska B, Sikorska K (2017) Clinical usefulness of Western blotting and ELISA avidity for the diagnosis of human toxocarosis. *Parasite Immunol* 39:1–6
- Smith HV, Holland CV, Taylor M, Magnaval JF, Schantz PM, Maizels RM (2009) How common is human toxocarosis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol* 25:182–188. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.006>
- Yamasaki H, Araki K, Lim PK, Zaszny N, Mak JW, Taib R, Aoki T (2000) Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocarosis. *J Clin Microbiol* 38:1409–1413
- Anderson JP, Rascoe LN, Levert K, Chastain HM, Reed MS, Rivera HN, McAuliffe I, Zhan B, Wiegand RE, Hotez PJ, Wilkins PP, Pohl J, Handali S (2015) Development of a luminex bead based assay for diagnosis of toxocarosis using recombinant antigens Tc-CTL-1 and Tc-TES-26. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0004168
- Ma G, Holland CV, Wang T, Fan CK, Maizels RM, Hotez PJ, Gasser RB (2018) Human toxocarosis. *Lancet Infect Dis* 18:e14–e24
- Stejskal F (2005) Current treatment of helminthoses. *Klin Farmakol a Farm* 19:111–115
- World Medical Association Declaration of Helsinki (2013) *JAMA* 310:2191
- ICD-10 Version:2010. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>. Accessed 9 May 2019
- Kaplan M, Kamanli A, Kalkan A, Kuk S, Gülkesen A, Ardiçoğlu O, Demirdağ K (2005) Toxocarosis seroprevalence in patients with rheumatoid arthritis. *Turkiye parazitolojii Derg* 29:251–254
- Nicoletti A, Sofia V, Mantella A, Vitale G, Contrafatto D, Sorbello V, Biondi R, Preux PM, Garcia HH, Zappia M, Bartoloni A (2008) Epilepsy and toxocarosis: a case-control study in Italy. *Epilepsia* 49:594–599
- Dattoli VCC, Freire SM, Mendonça LR, Santos PC, Meyer R, Alcantara-Neves NM (2011) *Toxocara canis* infection is associated with eosinophilia and total IgE in blood donors from a large Brazilian centre. *Trop Med Int Heal* 16:514–517
- Deutz A, Fuchs K, Auer H, Kerbl U, Aspöck H, Köfer J (2005) *Toxocara*-infestations in Austria: a study on the risk of infection of farmers, slaughterhouse staff, hunters and veterinarians. *Parasitol Res* 97:390–394
- Boldiš V, Ondriska F, Špitalská E, Reiterová K (2015) Immunodiagnostic approaches for the detection of human toxocarosis. *Exp Parasitol* 159:252–258
- Antolova D, Jarčuška P, Janičko M, Madarasová-Gecková A, Halánová M, Čisláková L, Kalinová Z, Reiterová K, Škutová M, Pella D, Mareková M, Team H (2015) Seroprevalence of human *Toxocara* infections in the Roma and non-Roma populations of Eastern Slovakia: a cross-sectional study. *Epidemiol Infect* 143:2249–2258
- Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira MU (2010) Human toxocarosis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Ann Trop Med Parasitol* 104:3–23
- Unemployment rate in 2016 in the Czech Republic. <https://www.czso.cz/csu/czso/podil-nezamestnaných-osob-v-cr-a-kraji-ch-2016>. Accessed 9 May 2019
- Stensvold CR, Skov J, Møller LN, Jensen PM, Kapel CMO, Petersen E, Nielsen HV (2009) Seroprevalence of human toxocarosis in Denmark. *Clin Vaccine Immunol* 16:1372–1373
- Rainova I, Harizanov R, Kaftandjiev I, Tsvetkova N, Mikov O, Kaneva E (2018) Human parasitic diseases in Bulgaria in between 2013 and 2014. *Balkan Med J* 35:61–67
- Kleine A, Springer A, Strube C (2017) Seasonal variation in the prevalence of *Toxocara* eggs on children's playgrounds in the city of Hanover, Germany. *Parasit Vectors* 10:248
- Kolářová L (2006) Tkáňové helmintózy. *Klin Mikrobiol Infekce Lek* 12:131–134
- Uhlíková M, Hübner J (1998) Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in Czech Republic. *Cent Eur J Public Health* 6:195–198
- Jimenez JF, Valladares B, Fernandez-Palacios JM, de Armas F, del Castillo A (1997) A serologic study of human toxocarosis in the Canary Islands (Spain): environmental influences. *Am J Trop Med Hyg* 56:113–115
- Sadjadi SM, Khosravi M, Mehrabani D, Oryan A (2000) Seroprevalence of *Toxocara* infection in school children in Shiraz, Southern Iran. *J Trop Pediatr* 46:327–330
- Rubinsky-Elefant G, da Silva-Nunes M, Malafronte RS, Muniz PT, Ferreira MU (2008) Human toxocarosis in rural Brazilian Amazonia: seroprevalence, risk factors, and spatial distribution. *Am J Trop Med Hyg* 79:93–98
- Lee RM, Moore LB, Bottazzi ME, Hotez PJ (2014) Toxocarosis in North America: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3116
- Mughini-Gras L, Harms M, van Pelt W, Pinelli E, Kortbeek T (2016) Seroepidemiology of human *Toxocara* and *Ascaris* infections in the Netherlands. *Parasitol Res* 115:3779–3794
- Farmer A, Beltran T, Choi YS (2017) Prevalence of *Toxocara* species infection in the US: results from the national health and nutrition examination survey, 2011–2014. *PLoS Negl Trop Dis* 11:5818
- Fenoy S, Cuéllar C, Aguila C, Guillén JL (1992) Persistence of immune response in human toxocarosis as measured by ELISA. *Int J Parasitol* 22:1037–1038
- Paludo ML, Falavigna DLM, Elefant GR, Gomes ML, Baggio MLM, Amadei LB, Falavigna-Guilherme AL (2007) Frequency of *Toxocara* infection in children attended by the health public service of Maringá, South Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49:343–348
- Manini MP, Marchioro AA, Colli CM, Nishi L, Falavigna-Guilherme AL (2012) Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara* spp. in children. *Vet Parasitol* 188:48–52
- Macpherson CNL (2013) The epidemiology and public health importance of toxocarosis : a zoonosis of global importance. *Int J Parasitol* 43:999–1008

41. Bozděch V, Mikolášová B, Vandasová D (1979) Pražské parky zdrojem toxokarózy u dětí? *Cesk Pediatr* 34:289–290
42. Dubná S, Langrová I, Jankovská I, Vadlejch J, Pekár S, Nápravník J, Fechtner J (2007) Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 144:81–86
43. Avcioglu H, Balkaya I (2011) The relationship of public park accessibility to dogs to the presence of *Toxocara* species ova in the soil. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 11:177–180
44. Nijse R, Ploeger HW, Wagenaar JA, Mughini-Gras L (2015) *Toxocara canis* in household dogs: prevalence, risk factors and owners' attitude towards deworming. *Parasitol Res* 114:561–569
45. Nijse R, Ploeger HW, Wagenaar JA, Mughini-Gras L (2016) Prevalence and risk factors for patent *Toxocara* infections in cats and cat owners' attitude towards deworming. *Parasitol Res* 115:4519–4525
46. Nijse R, Mughini-Gras L, Wagenaar JA, Franssen F, Ploeger HW (2015) Environmental contamination with *Toxocara* eggs: a quantitative approach to estimate the relative contributions of dogs, cats and foxes, and to assess the efficacy of advised interventions in dogs. *Parasit Vectors* 8:397
47. Luty T (2001) Prevalence of species of *Toxocara* in dogs, cats and red foxes from the Poznan region, Poland. *J Helminthol* 75:153–156
48. Reperant LA, Hegglin D, Tanner I, Fischer C, Deplazes P (2009) Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. *Parasitology* 136:329–337
49. Zajac V, Wójcik-Fatla A, Sawczyn A, Cisak E, Sroka J, Kloc A, Zajac Z, Buczek A, Dutkiewicz J, Bartosik K (2017) Stray dogs and cats as potential sources of soil contamination with zoonotic parasites. *Ann Agric Environ Med* 24:39–43
50. Sviben M, Čavlek TV, Missoni EM, Galinović GM (2009) Seroprevalence of *Toxocara canis* infection among asymptomatic children with eosinophilia in Croatia. *J Helminthol* 83:369–371
51. Lassen B, Janson M, Viltrop A, Neare K, Hütt P, Golovljova I, Tummeleht L, Jokelainen P (2016) Serological evidence of exposure to globally relevant zoonotic parasites in the Estonian population. *PLoS One* 11:1–13
52. Theodoridis I, Frydas S, Papazahariadou M, Hatzistilianou M, Adamama-Moraitou KK, Di Gioacchino M, Felaco M (2001) Toxocarosis as zoonosis. A review of literature and the prevalence of *Toxocara canis* antibodies in 511 serum samples. *Int J Immunopathol Pharmacol* 14:17–23
53. Habluetzel A, Traldi G, Ruggieri S, Atili AR, Scuppa P, Marchetti R, Menghini G, Esposito F (2003) An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet Parasitol* 113:243–252
54. Giacometti A, Cirioni O, Fortuna M, Osimani P, Antonicelli L, Del Prete MS, Riva A, D'errico MM, Petrelli E, Scalise G (2000) Environmental and serological evidence for the presence of toxocarosis in the urban area of Ancona, Italy. *Eur J Epidemiol* 16:1023–1026
55. Jøgi NO, Svanes C, Siiak SP, Logan E, Holloway JW, Iglund J, Johannessen A, Levin M, Real FG, Schlunssen V, Horsnell WGC, Bertelsen RJ (2018) Zoonotic helminth exposure and risk of allergic diseases: a study of two generations in Norway. *Clin Exp Allergy* 48:66–77
56. Kotłowski A, Kowalewska B, Rudzińska M (2011) *Toxocara* eggs in children kindergartens in Tri-city area and evaluation of interdependence quantification of invasion with frequency of antibodies incidence among population under study. *Med Środowiskowa* 14:45–50
57. Luźna-Lyskov A (2000) Toxocarosis in children living in a highly contaminated area: an epidemiological and clinical study. *Acta Parasitol* 45:40–42
58. Żukiewicz-Sobczak W, Zwoliński J, Chmielewska-Badora J, Galińska EM, Cholewa G, Krasowska E, Zagórski J, Wojtyła A, Tomaszewicz K, Kłapac T (2014) Prevalence of antibodies against selected zoonotic agents in forestry workers from eastern and southern Poland. *Ann Agric Environ Med* 21:767–770
59. Jarosz W, Mizgajska-Wiktor H, Kirwan P, Konarski J, Rychlicki W, Wawrzyniak G (2010) Developmental age, physical fitness and *Toxocara* seroprevalence amongst lower-secondary students living in rural areas contaminated with *Toxocara* eggs. *Parasitology* 137:53–63
60. Hermanowska-Szapakowicz T, Kondrusik M, Swierzbńska R, Zajkowska J, Pancewicz S (2001) Incidence of antibody detection against *Toxocara canis* and clinical symptoms in inhabitants of North-Eastern Poland. *Pol Merkur Lekarski* 10:168–170
61. Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I (2011) Epidemiology and history of human parasitic diseases in Romania. *Parasitol Res* 108:1333–1346
62. Moskvina TV, Ermolenko AV (2016) Helminth infections in domestic dogs from Russia. *Vet World* 9:1248–1258
63. Gabrielli S, Tasić-Otašević S, Ignjatović A, Fraulo M, Trenkić-Božinović M, Momčilović S, Cancrini G (2017) Seroprevalence and risk factors for *Toxocara canis* infection in Serbia during 2015. *Foodborne Pathog Dis* 14:43–49
64. Colovic-Calovski I, Jekic A, Stevanovic O, Dubljanin E, Kulisic Z, Dzamic AM (2014) Anti-*Toxocara* antibodies in patients with suspected visceral larva migrans and evaluation of environmental risk of human infection in Belgrade, Serbia. *Arch Biol Sci* 66:545–551
65. Pavlinová J, Kinčeková J, Ostrá A, Saksun L, Vasilková Z, Königová A (2011) Parasitic infections and pregnancy complications. *Helminthologia* 48:8–12
66. Logar J, Soba B, Kraut A, Stirn-Kranjc B (2004) Seroprevalence of *Toxocara* antibodies among patients suspected of ocular toxocarosis in Slovenia. *Korean J Parasitol* 42:137–140
67. Gonzalez-Quintela A, Gude F, Campos J, Gareia MT, Romero PA, Rey J, Meijide LM, Fernandez-Merino MC, Vidal C (2006) *Toxocara* infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. *Int Arch Allergy Immunol* 139:317–324
68. Sager H, Moret CS, Grimm F, Deplazes P, Doherr MG, Gottstein B (2006) Coprological study on intestinal helminths in Swiss dogs: temporal aspects of anthelmintic treatment. *Parasitol Res* 98:333–338

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

9.2 Publikace č. 2

Acta Parasitologica
https://doi.org/10.1007/s11686-021-00485-2

ORIGINAL PAPER



Antigenic Proteins from the Excretory–Secretory Products of *Toxocara canis* Larvae and Evaluation of Their Potential for Immunodiagnosics of Larval Toxocarosis

Kateřina Skulinov1,2, Jan Novk¹ · Libuše Kolřov^{1,3} · Martin Kašny⁴

Received: 9 June 2021 / Accepted: 14 October 2021

© The Author(s) under exclusive licence to Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences 2022

Abstract

Background Larval toxocarosis is a zoonosis caused by larvae of *Toxocara canis* and *T. cati*, a gastrointestinal nematode of canids and felids, respectively. Diagnosis is usually performed by ELISA IgG using *Toxocara* excretory–secretory products as an antigen. Due to laboriousness of isolation of the products and subsequent process of standardization of antigenic compounds, routine use of this method is limited and can produce inaccurate diagnostical results. The purpose of this study was to discover new specific antigenic proteins that could be used in routine serological methods of larval toxocarosis.

Materials and Methods *Toxocara* excretory–secretory products were collected and separated by SDS-PAGE. Proteins from the gel were electro-transferred to a membrane and incubated with mouse sera. Antigenic proteins were analyzed using the liquid chromatography–tandem mass spectrometry approach. Selected proteins were prepared in recombinant form and tested with mice and human sera by ELISA and Western blot.

Results A total of four recombinant protein antigens were prepared (rTc-*TES-26*, rTc-*ASA*, rTc-*PDP*, and rTc-*ASP*). They were analyzed by ELISA and Western blot using mice and human sera. For all sera, three of the four recombinant antigens correlated with *Toxocara* excretory–secretory products in ELISA analysis. By Western blot, the infection was confirmed in all experimentally infected mice and two out of seven human patients.

Conclusion Combination of the presented methods and analyses represents a possible method of effective identification of *Toxocara* protein antigens for the purpose of routine serodiagnosis.

Keywords *Toxocara canis* · Toxocariasis · Toxocarosis · Recombinant protein · Antigen · Diagnostics

Introduction

Larval toxocarosis (LT) is a widespread zoonotic disease caused by L3 (third stage) infectious larvae of *Toxocara* spp. roundworms, which mature only in canids and felids.

Depending on the climate, humidity, socioeconomic situation of human population, etc., seroprevalence of larval toxocarosis in particular populations varies. Still, it is estimated that currently its value stands globally at about 19%, in other words, that larval toxocarosis affects over 1.4 billion people worldwide [1].

Humans are accidental hosts of the parasites, but the course of the infection is the same as in other paratenic hosts. The disease develops after ingestion of food or water contaminated with the infectious parasite eggs, i.e., with developed L3 larvae. After ingestion, the larvae hatch in the small intestine and migrate via blood to various organs, mainly to the liver and lungs but other tissues (muscular, nervous, etc.) can be affected as well. The infection can also be acquired by consumption of undercooked meat containing encapsulated larvae, which after release from the meat tissue go on migrate through the body as described above. Settlement in host tissues is accompanied by encapsulation

✉ Martin Kašny
martin.kasny01@gmail.com

¹ Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

² Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

³ National Reference Laboratory for Tissue Helminthoses, General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁴ Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Published online: 13 January 2022

Springer

of larvae, whereby encapsulated larvae can survive in this dormant stage for many years [2].

Depending on location of the larvae, infected hosts develop various symptoms and signs of larval toxocarosis. The most common form of the disease is visceral larva migrans (VLM) but ocular (OLM) or neural larva migrans can develop as well. Severity of the disease varies but most infections are asymptomatic, i.e., take a covert form. Severe forms of larval toxocarosis are linked to tissue damage and inflammation caused by migration and encapsulation of the larvae. Clinical signs are mostly nonspecific and may include pyrexia, myalgia, cutaneous manifestation, and hepatosplenomegaly; laboratory examination can reveal eosinophilia and, naturally, positive serology [3].

Serology is the gold standard in diagnosing larval toxocarosis. Most commonly used is the ELISA test with detection of specific IgG and avidity, followed by a Western blot (WB) confirmation. Relatively sufficient sensitivity and specificity of reactions has been achieved by a mixture of antigens (proteins) prepared from *Toxocara* excretory-secretory products (TES) produced by L3 larvae cultivated *in vitro*. Increased sensitivity (97%) and specificity (36%) of IgG-TES ELISA can be achieved with IgG subclasses [4]. Preparation of an effective antigenic compound is, however, laborious. First of all, it depends on a successful cultivation of *Toxocara canis*/*T. cati* larvae and subsequent long-term sampling of the TES. Depending on the processing conditions, the obtained isolates may vary in the relative representation of particular antigens, which makes standardization of the final suspension problematic. Despite relatively high sensitivity and specificity of TES antigens, one can notice cross-reactions with antibodies that develop during other types of helminthic infections, which can lead to unintended false results [5]. According to Smith *et al.* [6], however, possible cross-reactions can be at least partly eliminated by use of low molecular weight (24–32 kDa) antigens, which seem to act more specifically. Most recent serological research therefore focuses on identification of novel specific TES antigens. Some have already been described but data on characterization of most antigenic TES components are still limited. It has been observed, though, that the proteome of *Toxocara canis* larvae contains functionally different classes of molecules which originate either from larval surface or its excretory-secretory products. Due to the migratory ability of the larvae and their ability to form dormant stages that can survive in tissues for a long time, it is rather likely that some of these molecules are also involved in evasion of the host immune system [7].

Using mass spectrometric (MS) methods, Sperotto *et al.* [8] and da Silva *et al.* [9] for the first time outlined the complex protein composition of the TES and provided information about TES components and possible

functions and localizations of molecules, which can be useful for improvement of diagnostics. Among the most abundant proteins identified in the TES are heat-shock proteins or superoxide dismutase, which play an important role in parasite survival within the host [8, 9]. The composition of larval products identified by the above-mentioned studies included some of the main TES compounds (namely Tc-TES-120, Tc-TES-32, and Tc-TES-26) which had been known previously [10, 11].

The Tc-TES-120 consists of secreted mucins, which are heavily glycosylated proteins covering the surface of L3 larvae. It is encoded by at least five genes (*Tc-muc-1–5*), which include several copies of a conserved six-cysteine domain (SXC) [12, 13]. It has been observed that this glycoprotein coat is shed when host's immune system attacks the migrating larvae [10, 14].

Calcium-dependent lectin Tc-TES-32 (Tc-CTL-1) is a carbohydrate-binding protein which shows affinity to two monosaccharides, namely *N*-acetylgalactosamine and *D*-mannose. It is abundant in the larval TES as well as in the cuticular matrix [15]. Due to its similarity to mammalian immune cells receptors, this lectin is probably associated with parasite's evasion of host's immune system [16, 17]. A variant of this lectin (Tc-CTL-1) has also been described (and named Tc-CTL-2) and a partial gene sequence *Tc-ctl-3* suggests the existence of Tc-CTL-3 [18, 19]. The Tc-TES-26 protein is homologous to mammalian phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) with N-terminal SXC domain [17]. It is a membrane component probably involved in lipid transport [11].

All three protein antigens have been previously prepared in recombinant forms and evaluated regarding their potential for detection of *T. canis* antibodies with convincing sensitivity and specificity [20–22]. Other proteins, such as arginine kinase and cathepsin L-1, were analyzed as well but turned out to have low specificity [23].

In conclusion, to increase specificity, that is, to avoid cross-reactivity in serological reactions, one should focus on designing novel synthetic proteins consisting of multiple epitopes along the lines reported by Ebrahimi *et al.* [24]. The authors charted *in silico* the antigenic regions of Tc-TES-120, Tc-TES-30, and Tc-TES-26 and designed a multiepitope fusion protein that can serve as a useful instrument in diagnostics of larval toxocarosis. Using bioinformatic tools in conjunction with newest molecular technologies, one should thus be able to create a single molecule with multiple epitopes whose production would eliminate the need for cultivation of larvae.

The aim of this study was thus to discover new possible protein antigens from the TES, prepare them in recombinant forms, and test their antigenicity.

Materials and Methods

Larvae Cultivation and TES Preparation

Adult parasites were isolated from feces of naturally infected dogs from animal shelters in the Czech Republic. Hatching and isolation of L3 larvae was carried out according to De Savigny [25]. The larvae were further cultivated in RPMI 1640 medium containing 100 IU/ml penicillin and 250 µg/ml streptomycin at 37 °C in 5% CO₂ conditions for several months. Starting on the day when the larvae were immersed in the medium, TES was collected daily for the following 14 days and then once a week for several months. After each collection, the products were immediately concentrated (3 kDa Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Merck) and purified into phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3; protein concentration was determined by the Quant-iT Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Then the TES were stored in – 80 °C.

Sera

Mouse sera were obtained as follows: ten animals (BALB/cAnNCrW specific pathogen free) were experimentally infected by different infectious doses (ID) of L3 larvae. From the mice, we thus obtained a total of ten individual sera and four pooled sera.

The samples included three negative sera (group L0), three positive sera from individuals infected daily (for 22 weeks except weekends) by ten larvae (group L10), three positive sera from individuals infected 22 times once a week by 100 larvae (group L100), and one positive serum from a mouse infected twice (primoinfection on day 1 and reinfection on day 14) by 1000 larvae (group L1000). The sera of each group were pooled. Sera were taken on day 86 after the first infection.

All mouse sera were obtained from the Institute of Immunology and Microbiology (First Faculty of Medicine, Charles University). Experimental animals were handled in accordance with the relevant European and Czech legislation.

Human sera were obtained as follows: a total of ten samples previously examined for the presence of anti-*TES* IgG antibodies by the National Reference Laboratory for Tissue Helminthoses. We investigated three negative and seven positive sera. All procedures performed in this study were in accordance with ethical standards of the institutional research committee and WMA Declaration of Helsinki—Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

Indirect ELISA

A checkerboard assay was performed to determine optimal amounts for well-coating by the recombinant form of protein antigens and TES, as well as dilutions of mouse/human sera and secondary antibodies in the ELISA. Each sample was analyzed in duplicate. TES as a control plus the recombinant form of protein antigens (Tc-*TES*-26, Tc-*ASA*, Tc-*PDP*, and Tc-*ASP*) were used in concentration of 0.5 µg/well. As primary antibodies, we used mouse and human positive/negative sera.

MaxiSorp Nunc 96-well microtiter plates (Thermo Fisher Scientific) were coated overnight at 4 °C with 0.5 µg/well TES antigen solubilized in a 0.2 M bicarbonate buffer (pH 9.6). The wells were washed three times in each step with PBS-Tween (PBST) and blocked with 1% BSA (1 h at 37 °C). Mouse (diluted to 1:800 in PBST) or human (diluted to 1:100 in PBST) sera were added (100 µl/well) and plates incubated for 1 h at 37 °C. After washing, we added to the wells a monoclonal anti-mouse IgG HRP secondary antibody diluted to 1:10,000 (Thermo Fisher Scientific) or anti-human IgG HRP secondary antibody diluted to 1:5,000 (Thermo Fisher Scientific) for 1 h at 37 °C. As a substrate, we used a TMB Slow Kinetic Form (Sigma-Aldrich). The reaction was stopped by addition of 50 µl of 1 M HCl. Optical density (OD) was read at 450 nm versus 630 nm as reference. Subsequently, we calculated the mean absorbance of each pair of duplicate sera.

Cut-off values for each antigen were calculated from control/negative mouse and human sera as described before [26].

SDS-Page and Western Blot

We performed both types of the Western blot (WB): (1) TES collected daily for 14 days were used to identify the immune reaction of separated proteins present in the TES with pooled mouse sera. The concentration of each TES was 3 µg/strip; (2) the recombinant antigens were used for confirmation of their antigenicity with individual mouse and human sera. The concentration of each recombinant antigen was 200 ng/strip.

The TES and recombinant proteins were separated by SDS-PAGE (10% gel) and transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and Silver Stain Plus kit (Bio-Rad). As a ladder, we used the Precision Plus All Blue Protein Standard (Bio-Rad).

The membrane was cut into strips and blocked with 5% BSA (Sigma-Aldrich) overnight on shaker. The strips were incubated with mouse sera diluted to 1:500 or human sera diluted to 1:100 in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST) for 90 min. In each step, the membranes were washed with

PBST three times for 15 min. As a secondary antibody, we used a monoclonal anti-mouse IgG HRP (Thermo Fisher Scientific) or anti-human IgG HRP (Thermo Fisher Scientific) diluted to 1:5000 for 1 h. The development of blots was performed using Opti-4CN (Bio-Rad), reaction was stopped by ddH₂O.

Mass Spectrometric Analysis

The SDS-PAGE gel with TES collected daily for 14 days and WB strips incubated with pooled mouse sera from each group were captured on a high-resolution scanner GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) (Fig. 1). The overlays were compared to identify the immunogenic reaction of proteins distributed in bands. Based on the immune response on the WB (Type I), protein bands with significant reaction were chosen for further analyses.

Protein bands related to the position of reaction (kDa) on WB (Fig. 1) were manually excised, destained, washed, and each incubated with 125 ng of trypsin (Promega) for 2 h at 40 °C. Tryptic peptides were extracted from gels by 2.5% formic acid (FA) in 50% acetonitrile (ACN) and subsequently concentrated in a SpeedVac concentrator (Thermo Fisher Scientific).

Liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses of peptide mixture was conducted using the RSLCnano system (Thermo Fisher Scientific) online connected to an Impact II Ultra-High Resolution Qq-Time-Of-Flight mass spectrometer with CaptiveSpray nanoBooster ion source (Bruker). Prior to liquid chromatography separation, tryptic digests were online concentrated and desalted using a trapping column

(100 µm × 30 mm) filled with a 3.5-µm X-Bridge BEH 130 C18 sorbent (Waters). After washing the trapping column with a 0.1% FA, the peptides were eluted (300 nl/min) from the trapping column onto a Acclaim Pepmap100 C18 column (3 µm particles, 75 µm × 500 mm; Thermo Fisher Scientific) by the following gradient program: mobile phase A—0.1% FA in water, mobile phase B—0.1% FA in 80% ACN. The gradient elution started at 1% of mobile phase B and increased from 1 to 13% during the first 55 min (13% in minute 15 and 27% in minute 25), then increased linearly to 85% of mobile phase B over the next 5 min and remaining at this state for the final 5 min.

MS data were acquired in a data-dependent strategy with 3 s-long cycle time. Mass range was set to 150–2200 *m/z* and precursors were selected from 300 to 2000 *m/z*. Acquisition speed of MS and MS/MS scans was 5 Hz and 4–16 Hz, respectively. Speed of MS/MS spectra acquisition was based on precursor intensity (with low and high absolute thresholds at 650 and 50,000 cts, respectively). Preprocessing of the mass spectrometric data was carried out in DataAnalysis software (4.2 SR1; Bruker). Exported MS/MS spectra were analyzed in the Proteome Discoverer software (Thermo Fisher Scientific, version 1.4) using the in-house Mascot (Matrixscience, version 2.6.1) search engine. Mascot MS/MS ion searches were done against in-house databases: *T. canis* (Uniprot, 18,499 sequences, version from 27.11.2017) and cRAP contaminants (based on <http://www.thegpm.org/crap>). Oxidation of methionine, deamidation (N, Q), and propionamide (C) as variable modifications, and two allowed enzyme mis-cleavages were set for all searches.

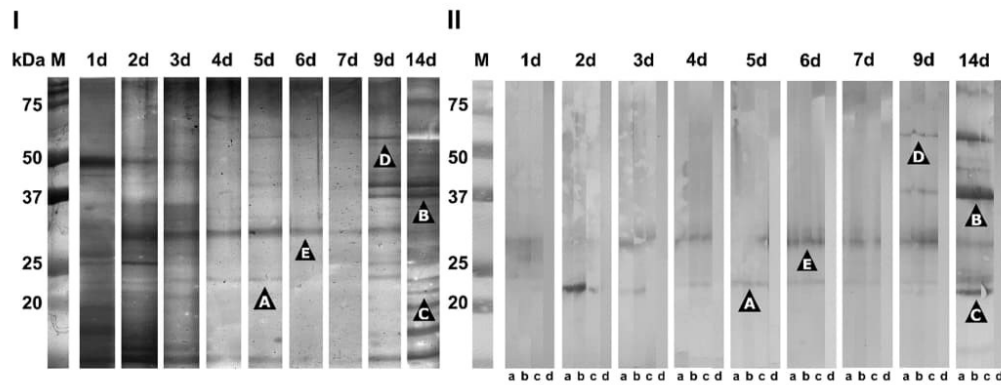


Fig. 1 Comparison of TES collected daily during the first 14 days of cultivation on (I) SDS-PAGE gel and (II) reactivity of pooled sera from a group of mice infected by different amounts of L3 *T. canis* larvae: a) L10, b) L100, c) L100 and d) negative controls. M molecular

weight marker; 1d–14d day of collection; antigenic proteins selected for preparation in recombinant form (I) and their reactivity on WB (II) marked with black arrows: A, Tc-TES-26; B, Tc-ASA; C, Tc-PDP; D, Tc-ASP. E, Tc-TES-32

Preparation of Recombinant Proteins-Antigens

Of all the amino acid sequences related to proteins identified by the MS analysis, we selected four proteins for preparation in their recombinant form: Tc-TES-26 (Uniprot, Acc. No. A0A0B2UIK8), Tc-ASA (Uniprot, Acc. No. A0A0B2VYF0), Tc-PDP (Uniprot, Acc. No. A0A0B2UUN4), and Tc-ASP (Uniprot, Acc. No. A0A0B2VNW7). We selected them based on strong reactivity with the mouse sera, low molecular weight (24–32 kDa) to prevent nonspecific reactions, increasing abundance during the collection period, and sufficient amounts in the TES.

Presence of a signal peptide in amino acid sequences was predicted by SignalP 4.1 [27]. Molecular mass and theoretical pI (isoelectric point) of the deduced proteins were determined by Compute pI/Mw software available at the ExpASY web portal [28].

Nucleotide sequences of the selected proteins without the part coding the signal peptide were codon-optimized in silico for expression in a bacterial system. The gene was inserted by digestion into the vector pET22b+ using restriction sites for NdeI-XhoI enzymes. A 6×His-tag was incorporated on the C-terminus of each protein. The constructs were transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) (General Biol) and verified by DNA sequencing. Protein expression was then triggered by addition 0.5 mM IPTG (VWR) and confirmed by incubation at 37 °C for 4 h.

Harvested cells were resuspended in Tris-NaCl-8 M Urea buffer (pH 8.0). The solution was sonicated on ice (Φ3, 3 s on/6 s off, 5 min), centrifuged at 10,000×g for 10 min at 4 °C, and filtered through a 0.22 μm filter. Recombinant proteins were purified by Ni-chelating chromatography (Ni-NTA beads 6FF, Bio-Rad), washed with PBS-8 M Urea buffer (pH 7.4) by increasing concentrations of imidazole (20–60 mM), and eluted from the column by PBS-8 M Urea buffer, 500 mM Imidazole (pH 7.4). Protein concentration was determined by Enhanced BCA Protein Assay Kit (Beyotime). Estimated purity was > 80%. All recombinant proteins (rTc-TES-26, rTc-ASA, rTc-PDP, rTc-ASP) were prepared commercially (EZBiolab).

Results

In samples collected during the first 14 days, we recorded different protein profiles of TES and, using pooled mouse sera, investigated the different profiles of antibody reactions with particular TES proteins (Fig. 1). Antigenic proteins were observed in the range of 20–100 kDa; band intensity varied depending on the day of TES collection (Fig. 1).

Analysis of all recombinant proteins (Table 1) revealed a specific reactivity with the tested mouse and human sera in only three (rTc-TES-26, rTc-PDP, and rTc-ASP) of the four recombinant proteins (Fig. 2). TES-32 was detected but the protein was not produced in a recombinant form.

Reactivity of all positive and negative mouse sera with the three recombinant antigens (rTc-TES-26, rTc-PDP, rTc-ASP) correlated precisely with results obtained by TES-ELISA (Table 2). In contrast with the anti-*Toxocara* IgG of all positive mice recognizing antigens of 25–30 kDa in the WB, in control sera this reaction was not observed (Fig. 3).

Examination of human sera by TES-ELISA confirmed positive and negative results in all positive and negative sera, respectively. The same sera were further used in ELISA with recombinant rTc-TES-26, rTc-PDP, and rTc-ASP antigens. The results correlated precisely with the TES. Analysis of rTc-PDP by WB did not, however, reveal any anti-*Toxocara* immune reaction. In WB assay with rTc-TES-26 and

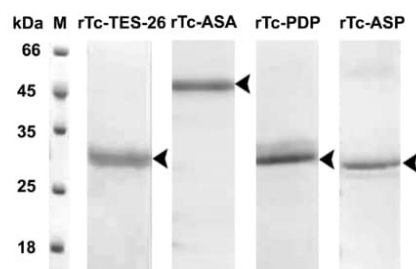


Fig. 2 SDS-PAGE: Molecular weight of recombinant antigens of rTc-TES-26, rTc-ASA, rTc-PDP, and rTc-ASP after purification. M, molecular weight marker

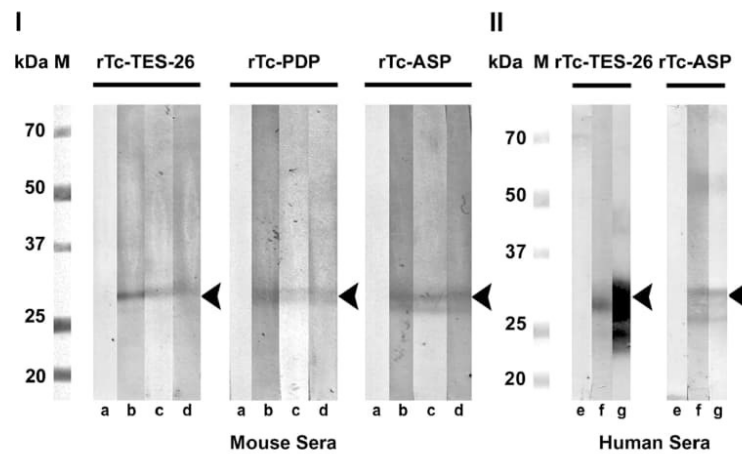
Table 1 Characteristics of the four immunogenic proteins selected for preparation in recombinant form

Name	UniProt acc. no.	Description	Length	Calculated Mw	Real Mw	Localization
Tc-TES-26	A0A0B2UIK8	Phosphatidylethanolamine-binding protein	262	28.2 kDa	25–30 kDa	Membrane
Tc-ASA	A0A0B2VYF0	<i>Anisakis simplex</i> allergen	414	45.4 kDa	45–50 kDa	Unknown
Tc-PDP	A0A0B2UUN4	Pepsin-I3 domain-containing protein	207	23.5 kDa	25–30 kDa	Extracellular or secreted
Tc-ASP	A0A0B2VNW7	<i>Ancylostoma</i> secreted protein	247	27.8 kDa	25–30 kDa	Extracellular or secreted

Table 2 Reactivity of rTc-TES-26, rTc-PDP, and rTc-ASP with mouse and human sera in ELISA and WB. Results of each individual recombinant antigen with a particular serum sample is indicated by either a '+' (positive reaction) or a '-' (negative reaction)

	Serum no.	Tc-TES-26 (ELISA/WB)	Tc-PDP (ELISA/WB)	Tc-ASP (ELISA/WB)	TES (ELISA)
Mouse					
Negative/Control (Group L0)	1	-/-	-/-	-/-	-
	2	-/-	-/-	-/-	-
	3	-/-	-/-	-/-	-
Positive (Group L10)	4	+/+	+/+	+/+	+
	5	+/+	+/+	+/+	+
	6	+/+	+/+	+/+	+
Positive (Group L100)	7	+/+	+/+	+/+	+
	8	+/+	+/+	+/+	+
	9	+/+	+/+	+/+	+
Positive (Group L1000)	10	+/+	+/+	+/+	+
Cut-off value		0.178	0.085	0.069	0.262
Human					
Seronegative	1	-/-	-/-	-/-	-
	2	-/-	-/-	-/-	-
	3	-/-	-/-	-/-	-
Seropositive	4	+/-	+/-	+/-	+
	5	+/-	+/-	+/-	+
	6	+/-	+/-	+/-	+
	7	+/-	+/-	+/-	+
	8	+/+	+/-	+/+	+
	9	+/+	+/-	+/+	+
	10	+/-	+/-	+/-	+
Cut-off value		0.497	0.384	0.259	0.703

Fig. 3 Reactivity of mouse (I) and human (II) sera with particular recombinant antigens (rTc-TES-26, rTc-PDP, and rTc-ASP) in WB. Mouse sera refers to samples of mice infected by different number of larvae: a) negative, b) by 10, c) 100, or d) by 1,000 larvae. Human sera refer to samples of human individuals: e) negative, f) and g) positive for anti-*Toxocara* antibodies



rTc-ASP, specific antibodies were present only in two patient samples only, which corresponded with the ELISA results (Table 2).

Discussion

To increase the sensitivity and specificity of serological methods for diagnosis of larval toxocarosis, we prepared four antigenic proteins (Tc-TES-26, Tc-ASA, Tc-PDP, and Tc-ASP) in a recombinant form using the LC-MS/MS approach and then evaluated them by ELISA and Western blot.

While the biology and ecology of the genus *Toxocara* have been thoroughly researched, existing knowledge of their molecular/immunological characteristics of particular *Toxocara* proteins/antigens is limited. Nevertheless, sequencing of the *T. canis* genome [7, 29] opened up possibilities of studying this parasite from various molecular perspectives. In conjunction with the mass spectrometry approach performed by Sperotto *et al.* [8] in their analyses of *Toxocara* sp. proteome, this created a broad base for further studies. The main goal of protein identification in the TES (or L3 larvae) is to reveal the specific function of each molecule [8, 9].

The pioneering mass spectrometry study detected in the TES proteome a total of 19 proteins [8] and 64 proteins were identified in a subsequent study [9]. It has been observed that these molecules, though rather diverse, were involved mainly in modulation of hosts' immune response and evasion mechanisms, e.g., cytokine homologues or cathepsins, respectively [8, 9]. In contrast to these studies, whose authors aimed at identifying the full spectrum of proteins in the TES, our goal was to use the mass spectrometry to identify only those molecules which elicit a specific immune response and could thus serve as potential recombinant antigens for improved routine serodiagnostics. In line with previous studies [8, 9], we also identified protein Tc-TES-26. And, similar to Mohamad *et al.* [20], our study confirmed that this antigen prepared in a recombinant form seems promising for serological diagnosis. Our results on immune response to the Tc-PDP and Tc-ASP proteins are not published yet; the latter (Tc-ASP) was identified in the TES proteome by da Silva *et al.* [9] but with no further characterization.

In short, similar to other studies [30–32], our data suggest that the LC-MS/MS technology is a suitable instrument for searching for antigen candidates. We selected proteins as potential antigens not only for their antigenicity (Fig. 1), but also for their low molecular weight (24–32 kDa) which seem related to higher specificity [6]. Except for one selected protein, this assumption was borne out by our results. In the study, we observed a nonspecific reaction with human sera in ELISA and WB only in the case of rTc-ASA (45–50 kDa).

We used pooled mouse sera to select potential antigens for diagnosis of human patients. Our results indicate that the Tc-ASA protein reacted more specifically with mouse sera than with the human ones.

Three of the selected recombinant proteins (rTc-TES-26, rTc-PDP, rTc-ASP) reacted specifically in WB with the positive mouse sera (Fig. 3) and these results correlated with TES data obtained by ELISA (Table 2). Comparison of mice infected several times in predefined intervals (L10 and L100) showed that serum from a mouse infected only twice with 1,000 larvae (group L1000) had a weaker immunological response on the blot (Fig. 3). Although only one mouse serum from the L1000 group was tested in our study, one could speculate in animals which are repeatedly infected at regular intervals (groups L10 and L100) over a long period of time, the immune response is gradually stimulated and becomes more significant; this is a development similar to what is described in Novák *et al.* in their study [33].

The TES is broadly used in ELISA (with a possible subsequent confirmation by WB) in serological tests aimed at identification of seropositive and seronegative patients in clinical diagnostics. Despite certain limitations, this approach is also widely used as a routine screening method [34]. Our results thus support the claim that the use of recombinant antigens is important not only for standardization of routine diagnostics but also for increasing its sensitivity and specificity [4, 6].

Similar as for the TES, antibodies from human LT-positive sera recognized rTc-TES-26, rTc-PDP and rTc-ASP recombinant antigens in ELISA IgG (Table 2). WB analyses were used as a confirmatory examination for all human samples. Still, while in the mouse sera where the recombinant antigens and TES correlated with the infected/control groups in WB, human sera did not recognize the rTc-PDP antigen at all. On the other hand, for the rTc-TES-26 and rTc-ASP antigens we observed in the WB a positive reaction in two out of seven seropositive sera (Fig. 3). This result indicates confirmed positivity for both patients because the WB tends to be more specific than ELISA. Compared to the WB with mouse sera, we must bear in mind that the mice were infected regularly with a high number of larvae in one or several doses. In humans, who are accidental hosts, one can assume that the infectious dose and larval burden is significantly lower, which may result in a weaker or absent reaction on the WB [34].

In mouse sera, the cutoff values helped us separate the control or negative from the positive sera, whereas in humans in general, seropositivity does not necessarily indicate an infection. Because the TES are a complex of antigens, many people may be falsely positive because patient sera may react with antigens which are not specific only to *T. canis* but also other species of parasites [35]. In our climatic

conditions and prevalent lifestyle, we believe that what we observed was a nonspecific reaction of various antibodies in patients' serum caused by unknown diseases rather than polyparasitism. Moreover, the only way to verify the infection directly is to find larvae in the tissue, which is obviously unfeasible.

Last but not least, in connection with recent decline of human parasitic diseases worldwide, including Central Europe [36, 37], it has been predicted that the number of people suffering from larval toxocarosis will increase, especially in Europe and North America [38]. It is necessary to work towards the discovery of new diagnostic markers and their recognition. The aim of the present study was to look for and test possible new antigens which would be more specific in diagnostics of larval toxocarosis. Although only mouse sera were used for the initial experiments, the study shows that the selected antigens could be analogously applicable in human serodiagnosis. In conclusion, our study shows that the combination of methods and analyses we used is a robust tool that can help in effective identification of new *Toxocara* protein antigens.

Acknowledgements The CEITEC Proteomics Core Facility is gratefully acknowledged for obtaining the scientific data presented in this paper. We would like to thank the Laboratory of Helminthology (Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University) and the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry (Czech Academy of Sciences) for technical support, Pavel Roudnický and Jiří Vorel for help with data analysis, and Anna Pilátová, PhD., for editing the final draft.

Funding The study was supported by Charles University, programs GAUK 902 217, SVV 260 520, Progres Q25.

Declarations

Conflict of interest The authors report no conflict of interest.

References

- Rostami A, Riahi SM, Holland CV, Taghipour A, Khalili-Fomeshi M, Fakhri Y, Omrani VF, Hotez PJ, Gasser RB (2019) Seroprevalence estimates for toxocarosis in people worldwide: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0007809. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007809>
- Strube C, Heuer L, Janecek E (2013) *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol* 193:375–389. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033>
- Despommier D (2003) Toxocarosis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev* 16:265–272. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265>
- Ma G, Holland CV, Wang T, Fan CK, Maizels RM, Hotez PJ, Gasser RB (2018) Human toxocarosis. *Lancet Infect Dis* 18:e14–e24. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6)
- Ishida MM, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, Hoshino-Shimizu S, Vaz AJ (2003) Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop* 89:73–84. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.09.005>
- Smith HV, Holland CV, Taylor M, Magnaval JF, Schantz PM, Maizels RM (2009) How common is human toxocarosis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.006>
- Zhu XQ, Korhonen PK, Cai H, Young ND, Nejsum P, Von Samson-Himmelstjerna G, Boag PR, Tan P, Li Q, Min J, Yang Y, Wang X, Fang X, Hall RS, Hofmann A, Sternberg PW, Jex AR, Gasser RB (2015) Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*. *Nat Commun* 6:1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms7145>
- Sperotto RL, Kremer FS, Aires Berne ME, Costa de Avila LF, da Silva PL, Monteiro KM, Caumo KS, Ferreira HB, Berne N, Borsuk S (2017) Proteomic analysis of *Toxocara canis* excretory and secretory (TES) proteins. *Mol Biochem Parasitol* 211:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.09.002>
- da Silva MB, Urrego AJR, Oviedo Y, Cooper PJ, Pacheco LG, Pinheiro CS, Ferreira F, Briza P, Alcantara-Neves NM (2018) The somatic proteins of *Toxocara canis* larvae and excretory-secretory products revealed by proteomics. *Vet Parasitol* 259:25–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.015>
- Maizels RM, de Savigny D, Ogilvie BM (1984) Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol* 6:23–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1984.tb00779.x>
- Gems D, Ferguson CJ, Robertson BD, Nieves R, Page AP, Blaxter ML, Maizels RM (1995) An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *J Biol Chem* 270:18517–18522
- Loukas A, Hintz M, Linder D, Mullin NP, Parkinson J, Tetteh KK, Maizels RM (2000) A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *J Biol Chem* 275:39600–39607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005632200>
- Doedens A, Loukas A, Maizels RM (2001) A cDNA encoding Te-MUC-5, a mucin from *Toxocara canis* larvae identified by expression screening. *Acta Trop* 79:211–217. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00137-1)
- Page AP, Rudin W, Fluri E, Blaxter ML, Maizels RM (1992) *Toxocara canis*: a labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Exp Parasitol* 75:72–86. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90123-R](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90123-R)
- Page AP, Hamilton AJ, Maizels RM (1992) *Toxocara canis*: Monoclonal antibodies to carbohydrate epitopes of secreted (TES) antigens localize to different secretion-related structures in infective larvae. *Exp Parasitol* 75:56–71. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90122-Q](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90122-Q)
- Loukas A, Mullin NP, Tetteh KK, Moens L, Maizels RM (1999) A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Curr Biol* 9:825–828. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80366-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80366-2)
- Maizels RM, Tetteh KK, Loukas A (2000) *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Int J Parasitol* 30:495–508. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00022-9)
- Tetteh KK, Loukas A, Tripp C, Maizels RM (1999) Identification of abundantly expressed novel and conserved genes from the infective larval stage of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy. *Infect Immun* 67:4771–4779. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4771-4779.1999>
- Zhan B, Ajmera R, Geiger SM, Gonçalves MTP, Liu Z, Wei J, Wilkins PP, Fujiwara R, Gazzinelli-Guimaraes PH, Bottazzi ME, Hotez P (2015) Identification of immunodominant antigens for the

- laboratory diagnosis of toxocarriasis. *Trop Med Int Heal* 20:1787–1796. <https://doi.org/10.1111/tmi.12607>
20. Mohamad S, Azmi NC, Noordin R (2009) Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocarriasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J Clin Microbiol* 47:1712–1717. <https://doi.org/10.1128/JCM.00001-09>
 21. Dos Santos LM, Donassolo RA, Berne ME, Leite FPL, Da Costa Avila LF, Scaini CJ, Moreira AN, Conceição FR (2019) The serodiagnostic potential of recombinant proteins TES-30 and TES-120 in an indirect ELISA in the diagnosis of toxocarriasis in cattle, horses, and sheep. *PLoS ONE* 14:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213830>
 22. Raulf MK, Jordan D, Auer H, Warnecke JM, Lepenies B, Strube C (2020) A new ELISA and Western Blot technique based on recombinant TES antigen and/or larval antigen for the detection of toxocarriasis in humans. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002085>
 23. Varghese A, Raina OK, Chandra D, Mirdha BR, Kelawala NH, Solanki JB, Kumar N, Ravindran R, Arun A, Rialch A, Lalrinkima H, Kelawala RN, Samanta S (2017) Sero-detection of *Toxocara canis* infection in human with *T.canis* recombinant arginine kinase, cathepsin L-1 and TES-26 antigens. *Acta Parasitol* 62:775–778. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0093>
 24. Ebrahimi M, Seyyedtabaei SJ, Ranjbar MM, Tahvildar-biderouni F, Javadi-Mamaghani A (2020) Designing and modeling of multi-epitope proteins for diagnosis of *Toxocara canis* infection. *Int J Pept Res Ther* 26:1371–1380. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09940-1>
 25. de Savigny DH (1975) In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitol* 61:781–782. <https://doi.org/10.2307/3279492>
 26. Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D (1998) A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* 221:35–41. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00170-7)
 27. Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786
 28. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, verine Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Ien Grosdidier A, Iline Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, bastien Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, goire Rossier G, Xenarios I, Stockinger H (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 40:W597–W603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>
 29. Kong J, Won J, Yoon J, Lee UJ, Il KJ, Huh S (2016) Draft genome of *Toxocara canis*, a pathogen responsible for visceral larva migrans. *Korean J Parasitol* 54:751–758. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.6.751>
 30. Kiel M, Josh P, Jones A, Windon R, Hunt P, Kongsuwan K (2007) Identification of immuno-reactive proteins from a sheep gastrointestinal nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Parasitol* 37:1419–1429. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.016>
 31. González-Miguel J, Rosario L, Rota-Nodari E, Morchón R, Simón F (2010) Identification of immunoreactive proteins of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* recognized by sera from patients with pulmonary and subcutaneous dirofilariasis. *Parasitol Int* 59:248–256. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.02.010>
 32. Bien J, Cabaj W, Moskwa B (2015) Proteomic analysis of potential immunoreactive proteins from muscle larvae and adult worms of *Trichinella spiralis* in experimentally infected pigs. *Folia Parasitol (Praha)* 62:1–8. <https://doi.org/10.14411/fp.2015.022>
 33. Novák J, Panská L, Macháček T, Kolářová L, Horák P (2017) Humoral response of mice infected with *Toxocara canis* following different infection schemes. *Acta Parasitol* 62:823–835. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0099>
 34. Smith H, Noordin R (2006) Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocarriasis. In: Holland CV, Smith HV (eds) *Toxocara: the enigmatic parasite*. CABI Publishing, Wallingford, pp 89–112
 35. Magnaval JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, de Larrard B (1991) Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocarriasis. *Parasitol Res* 77:697–702. <https://doi.org/10.1007/BF00928685>
 36. Deutz A, Fuchs K, Auer H, Kerbl U, Aspöck H, Köfer J (2005) *Toxocara*-infestations in Austria: a study on the risk of infection of farmers, slaughterhouse staff, hunters and veterinarians. *Parasitol Res* 97:390–394. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1469-5>
 37. Skulinová K, Novák J, Kašný M, Kolářová L (2020) Seroprevalence of Larval Toxocarosis in the Czech Republic. *Acta Parasitol* 65:68–76. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00121-0>
 38. Hotez PJ (2018) Human parasitology and parasitic diseases: heading towards. In: Rollinson D, Stothard JR (eds) *Advances in parasitology*, 1st edn. Elsevier Ltd, pp 29–38

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Parasitology

cambridge.org/par

Research Article

Cite this article: Novák J, Macháček T, Majer M, Kostelanská M, Skulinová K, Černý V, Kolářová L, Hrdý J, Horák P (2022). *Toxocara canis* infection worsens the course of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Parasitology* **149**, 1720–1728. <https://doi.org/10.1017/S0031182022001238>

Received: 3 June 2022

Revised: 22 July 2022

Accepted: 21 August 2022

First published online: 2 September 2022

Key words:

EAE; experimental autoimmune encephalomyelitis; helminth; MOG; multiple sclerosis; *Toxocara canis*

Author for correspondence:

Jan Novák, E-mail: jan.novak2@lf1.cuni.cz

Toxocara canis infection worsens the course of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice

Jan Novák¹, Tomáš Macháček², Martin Majer², Marie Kostelanská¹, Kateřina Skulinová^{1,2}, Viktor Černý¹, Libuše Kolářová^{1,3}, Jiří Hrdý¹ and Petr Horák²

¹Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Studničkova 7, 128 00, Praha 2, Czechia; ²Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, 128 44, Praha 2, Czechia and ³National Reference Laboratory for Tissue Helminthoses, General University Hospital in Prague, Studničkova 7, 128 00, Praha 2, Czechia

Abstract

Toxocara canis, a gastrointestinal parasite of canids, is also highly prevalent in many paratenic hosts, such as mice and humans. As with many other helminths, the infection is associated with immunomodulatory effects, which could affect other inflammatory conditions including autoimmune and allergic diseases. Here, we investigated the effect of *T. canis* infection on the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of multiple sclerosis. Mice infected with 2 doses of 100 *T. canis* L3 larvae 5 weeks prior to EAE induction (the *Tc*+EAE group) showed higher EAE clinical scores and greater weight loss compared to the non-infected group with induced EAE (the EAE group). Elevated concentrations of all measured serum cytokines (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ and TNF- α) were observed in the *Tc*+EAE group compared to the EAE group. In the CNS, the similar number of regulatory T cells (Tregs; CD4+FoxP3+Helios+) but their decreased proportion from total CD4+ cells was found in the *Tc*+EAE group compared to the EAE group. This could indicate that the group *Tc*+EAE harboured significantly more CD4+ T cells of non-Treg phenotype within the affected CNS. Altogether, our results demonstrate that infection of mice with *T. canis* worsens the course of subsequently induced EAE. Further studies are, therefore, urgently needed to reveal the underlying pathological mechanisms and to investigate possible risks for the human population, in which exposure to *T. canis* is frequent.

Introduction

Toxocara canis is a widespread parasite of canids and many paratenic hosts including humans (Holland, 2017; Ma *et al.*, 2018, 2020). These paratenic hosts become infected by accidental ingestion of embryonated eggs containing infective third-stage larvae (L3) or by ingestion of raw meat from infected hosts (Strube *et al.*, 2013). After infection of a paratenic host, L3 larvae penetrate the small intestine mucosa and migrate through various tissues to the central nervous system (CNS). Depending on the immune status of the paratenic host and the infection dose, L3 larvae can damage the affected tissue, persist in them as arrested dormant stages (Glickman and Schantz, 1981; Rubinsky-Elefant *et al.*, 2010) and elicit host immune response. In a mouse model of neural larva migrans (NLM, neurotoxocarosis) (Fan *et al.*, 2015), somatic migration of *T. canis* L3 larvae can be divided into 3 phases (Strube *et al.*, 2020a) – acute, sub-acute and chronic – and occurs in a biphasic pattern, with the first peak of brain migration described at day 7 post infection (p.i.) and the second peak beginning at day 35 p.i. (Janecek *et al.*, 2014). The general trend is a continuous accumulation of L3 larvae in the brain during infection (Strube *et al.*, 2020a).

As with many other helminths, *T. canis* L3 larval infection has been associated with immunomodulatory effects (Maizels and McSorley, 2016; Waindok and Strube, 2019; Loukas *et al.*, 2021), which could possibly influence a number of inflammatory conditions, including autoimmune and allergic diseases (Maizels, 2020; Loukas *et al.*, 2021).

The immunomodulation induced by helminth antigens is often associated with Th2 polarization, differentiation of macrophages towards the M2 phenotype or induction of regulatory T cells (Tregs). All these pathways result in downregulation of Th1 and Th17 response and decreased production of pro-inflammatory cytokines, establishing an anti-inflammatory/regulatory milieu. This state minimizes pathological sequelae and allows long-term survival of helminths in the host (Maizels and McSorley, 2016; Smallwood *et al.*, 2017; Maizels, 2020).

Due to their immunomodulatory potential, a number of helminths or their products have been studied as a possible alternative to ameliorate the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the rodent model of multiple sclerosis (MS) (Charabati *et al.*, 2020). Such helminth immunotherapy (HIT) could represent an experimental approach to current immunomodulatory and immunosuppressive treatments (Dargahi *et al.*, 2017; Hauser *et al.*, 2021) of human MS. Indeed, a wide variety of helminths and their products

© The Author(s), 2022. Published by Cambridge University Press



<https://doi.org/10.1017/S0031182022001238> Published online by Cambridge University Press

have been tested (Charabati *et al.*, 2020). The vast majority of studies reported a positive effect of HIT (remission of EAE), especially when infection or administration of the products was prophylactic (i.e. preceding EAE induction). There is a wide range of the helminths and their products with positive effects, e.g. *Heligmosomoides polygyrus* (Wilson *et al.*, 2010; Donskow-Lysoniewska *et al.*, 2012, 2018; White *et al.*, 2020), *Trichinella spiralis* (Gruden-Movsesijan *et al.*, 2010; Kuijk *et al.*, 2012; Sofronic-Milosavljevic *et al.*, 2013; Radovic *et al.*, 2015), *Trichinella pseudospiralis* (Wu *et al.*, 2010), *Trichuris suis* (Kuijk *et al.*, 2012), *Schistosoma mansoni* (La Flamme *et al.*, 2003; Sewell *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2012), *Schistosoma japonicum* (Zheng *et al.*, 2008), *Taenia crassiceps* (Reyes *et al.*, 2011; Peon *et al.*, 2017; Terrazas *et al.*, 2017), *Fasciola hepatica* (Walsh *et al.*, 2009; Finlay *et al.*, 2016; Lund *et al.*, 2016), *Nippostrongylus brasiliensis* (Tran *et al.*, 2017). However, there are also studies that show zero effect of HIT on the treatment of EAE, e.g. the infection with the larvae of *Strongyloides venezuelensis* (Chiuso-Minicucci *et al.*, 2011) or administration of *Acanthocheilonema viteae*-derived excretory-secretory protein 62 (Doonan *et al.*, 2018). The only exception with a negative effect on the course of EAE was the administration of recombinant galectin 9 (rTL-gal) derived from *Toxascaris leonina*, which after administration inhibits EAE remission (Bing *et al.*, 2015).

Although it has been shown that the larvae of the worldwide distributed *T. canis* can exhibit neurotropic activity in an abnormal host, the significance of such parasite behaviour for the development of various neuropathologies has not yet been elucidated in detail. Therefore, we took the opportunity to study the issue in a laboratory-standardized animal model of MS – in mice with EAE – to investigate the effect of parasitic infection on the development of neuropathological changes. This is of particular interest as *T. canis* is a worldwide distributed neurotropic roundworm affecting millions of people, but its impact on MS is unknown.

Materials and methods

Animals

Female C57BL/6J (Charles River) mice, 5 weeks old, were housed in a 12 hours light/dark cycle in the animal facility of the First Faculty of Medicine, Charles University (Prague, Czechia). Prior to the experiment, mice were left to acclimate for 2 weeks. Mice were divided into 4 groups, each consisting of 12 animals (4 mice per cage). The first group consisted of control non-infected mice (naive), the second group (*Tc*) consisted of animals that were orally infected with 2×100 *T. canis* L3 larvae on days 0 and 7 post the first infection, in the third group (EAE) only EAE was induced, and in the fourth group (*Tc*+EAE), mice were infected similarly as the group *Tc* and EAE was induced in the same way as in the group EAE (Fig. 1). The experimental design and procedures were approved by the Ethical Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University and the Ministry of Education, Youth and Sports (ID: MSMT-21527/2017-10, 10 August 2017). The experiments were performed in strict accordance with institutional guidelines and national/EU animal welfare laws and directives.

Toxocara canis infections

Adult females of *T. canis* were isolated from the feces of naturally infected dogs in the dog shelters after antihelminthic treatment. Egg isolation, embryonation, hatching and isolation of L3 larvae were performed according to established protocols (Bowman *et al.*, 1987; Desavigny *et al.*, 1979). Isolated L3 larvae were

cultivated *in vitro* in RPMI 1640 medium (Biosera, NUAILLE, France, cat. no. LM-R1639) containing 100 IU mL⁻¹ penicillin and 100 ng mL⁻¹ streptomycin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, cat. no. P4333) at 37°C and 5% CO₂. Prior to infections, L3 larvae were centrifuged in 50 mL tubes at 600 g at 20°C for 5 min, washed 3 times with sterile phosphate-buffered saline (PBS) and counted in 10 aliquots of 50 µL. The L3 larval suspension was then diluted with PBS to a concentration of 200 L3 larvae per mL and mice were infected orally by drinking 100 L3 larvae resuspended in 0.5 mL PBS; the reinfection was performed after 7 days. The viability of L3 larvae was controlled visually under the microscope. The success of the infection was confirmed by the determination of specific serum IgG antibodies against *T. canis* excretory-secretory antigens (TES) by ELISA according to Novák *et al.* (2017).

EAE induction

EAE was induced according to Bittner *et al.* (2014) on day 35 post the first *T. canis* infection. Briefly, 200 µg myelin oligodendrocyte glycoprotein-derived 35–55 amino acid peptide (MOG) in 200 µL in PBS and complete Freund's adjuvant containing 1 mg mL⁻¹ *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, cat. no. F5881) were injected subcutaneously into 2 different sites on each hind flank, being followed by intraperitoneal injection of 500 ng pertussis toxin (PT) in 200 µL PBS. After 48 hours, intraperitoneal injection of the same amount of PT was repeated. The MOG was synthesized by solid-phase synthesis (purity >96%) and was kindly donated by Dr. Ladislav Drož and Dr. Věra Černá (APIGENEX). The PT was kindly donated by Professor Peter Šebo (Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences).

Measurement of clinical symptom scores and weight loss

Starting on the day of EAE induction (d.e.i.), mice were weighed daily and scored for clinical signs (CS) of EAE according to Radovic *et al.* (2015): 0 = no CS; 1 = flaccid tail; 2 = hind limb paresis; 3 = complete bilateral hind limb paralysis often associated with incontinence; and 4 = moribund state or death. Clinical scores and normalized percentage weight changes were compared for all groups. These data were pooled from 2 independent experiments. Mice were observed 50 days after induction of EAE.

Serum sampling and leucocyte isolation from spleen, mesenteric lymph nodes, brain and spinal cord

Serum and leucocytes from spleen, mesenteric lymph nodes (MLN), brain and spinal cord (CNS) were taken from 14 to 50 d.e.i. in weekly intervals from 2 animals of each group. Because all mice were already in the chronic phase of infection (i.e. a large proportion of larvae was already in the CNS), and because no large differences or patterns were observed in the quantification of individual cytokines, antibodies and cell populations, all these data were treated as a single set for statistical processing regardless of the date of collection.

Mice were narcotized, blood samples were taken by puncture of the facial vein and serum was collected and kept frozen at –80°C. The mice were perfused through the left heart ventricle with sterile ice-cold PBS, and the spleen, MLN, brain and spinal cord were extracted. The spleen was homogenized and strained through a 70 µm cell strainer (Sigma, Corning Cell Strainer 70 µm Nylon, cat. no. 431751), erythrocytes were lysed with lysis buffer (BD Pharm Lyse, cat. no. 555899) and the samples were washed twice with PBS followed by centrifugation at 200 g at 4°C for 10 min, and finally washed using the staining buffer (eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer, Massachusetts,

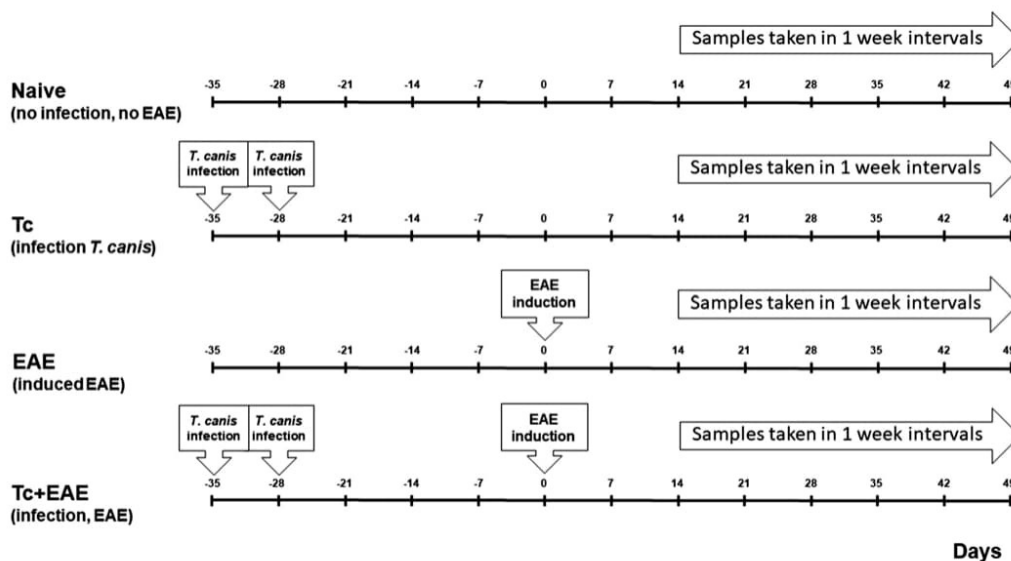


Fig. 1. Experimental design: 48 mice were divided into 4 separate groups of 12: (i) Naive – control non-infected mice; (ii) Tc – animals that were infected with 100 *T. canis* L3 larvae on day 0 and reinfected on day 7; (iii) EAE – experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced on day 35 post the first infection; (iv) Tc+EAE – mice were infected in the same way as in group Tc and EAE was induced in the same way as in group EAE. Time data (days) showing when infections and re-infections, EAE inductions and sampling were performed. EAE was induced by subcutaneous injection MOG peptide in phosphate-buffered saline (PBS) and complete Freund's adjuvant, followed by 2 intraperitoneal injections of pertussis toxin (PT). After EAE induction, clinical symptom scores were monitored and mice were weighed. From day 14 after EAE induction, mice were sacrificed at weekly intervals and serum, spleen, mesenteric nodes, brain and spinal cord were collected and used to (1) determine TES IgG-specific antibodies, (2) determine serum cytokine concentrations and (3) determine Tregs populations.

USA, cat. no. 00-4222-26). MLN lymphocytes were treated in the same manner with the exception of erythrocyte lysis.

Brain and spinal cord were washed with sterile PBS and further processed according to Pino and Cardona (2011). Briefly, the brain and spinal cord were washed in PBS, homogenized, strained, centrifuged and then mixed with isotonic Percoll solution (Percoll Plus, Sigma Aldrich, cat. no. E0414) in Hank's balanced salt solution (HBSS) (HBSS 10 \times , Biosera, NUAILLE, France, cat. no. XC-S2064/500) to give a Percoll concentration of 30%. This material was carefully layered on top of Percoll 70% in HBSS in the 50 mL Falcon tube and centrifuged at 500 g at 18°C for 30 min. After centrifugation, the myelin floating on the top was removed, and the cells of interest floating in 30/70 interphase were collected, washed twice with HBSS and finally in the staining buffer. Identification of the Tregs population was performed using eBioscience™ Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #2 (eBioscience, Massachusetts, USA, cat. no. 88-8118-40) and Helios staining using a PE-Cy7 labelled monoclonal antibody [Exbio, Czech Republic, Mab to Helios (22F6) PE-Cy7, Cat. No. T7-771-T100] according to the manufacturer's instructions. The labelled antibodies were used at the following quantities per 1 million cells: CD4-FITC 0.25 μ L per test, CD25-PE 0.3 μ L per test, FoxP3-APC 2.5 μ L per test and Helios-PE-Cy7 2 μ L per test. The final volume during staining was less than 50 μ L. The samples were acquired by BD FACS Canto II and analysed in FlowJo (v. 10.7.1). A representative gating strategy is shown in Supplementary Fig. 1.

Cytokine cytometric bead array

Serum concentrations of interleukin (IL)-4, IL-10, IL-6, tumour necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , IL-2 and IL-17A

were measured using the BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD, New Jersey, USA, cat. no. 560485) and IL-1 α using the CBA Mouse IL-1 α Flex Set (BD, New Jersey, USA, cat. no. 560157) with slight modification. The lower CBA detection limits for the cytokines are as follows: IL-2: 0.1 pg mL⁻¹, IL-4: 0.03 pg mL⁻¹, IL-6: 1.4 pg mL⁻¹, IFN- γ : 0.5 pg mL⁻¹, TNF- α : 0.9 pg mL⁻¹, IL-17A: 0.8 pg mL⁻¹, IL-10: 16.8 pg mL⁻¹, IL-1 α : 1 pg mL⁻¹. The upper limit of the calibration curve is 5000 pg mL⁻¹ for all cytokines mentioned, except IL-1 α , where the upper limit is 2500 pg mL⁻¹. Prior to measurement, the beads for IL-1 α detection were tested along with those for other cytokines in the Th1/Th2/Th17 kit and the optimal serum dilution was determined based on the manufacturer's protocol, previous experiments and consultation with a BD application specialist. Briefly, the bead mixture from both kits was prepared and distributed into tubes, then diluted (1:9) serum samples were added and vortexed. The detection reagent was then added, samples were vortexed and incubated for 2 h at room temperature, protected from light. After incubation, 1 mL wash buffer was added and tubes were centrifuged at 200 g for 5 min. The supernatants were discarded and the pellets were resuspended in 300 μ L of wash buffer. A calibration curve was generated for each cytokine using the kit standards. Fluorescence was measured using BD FACS Canto II (BD) and cytokine concentrations were determined by comparison with the calibration curve for each cytokine using the BD CBA software package.

Statistical analysis

Clinical scores and normalized body weights were examined by 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures (mixed-effects model analysis) followed by Sidák's test. Antibody and cytokine levels were assessed by the Kruskal-

Wallis test followed by Dunn's test. Flow cytometry data were evaluated by ordinary 1-way ANOVA followed by Šidák's test. The normality of the residuals was checked by inspection of Q-Q plots. Multiple comparison tests (Šidák's or Dunn's test) were used to analyse the following group pairs: naive vs *Tc*, naive vs EAE, *Tc* vs EAE, *Tc* vs *Tc*+EAE and EAE vs *Tc*+EAE. All tests were performed by GraphPad Prism version 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Results

Toxocara canis infection was confirmed by the presence of TES-specific IgG by ELISA

In both infected groups (*Tc* and *Tc*+EAE), infection with *T. canis* L3 larvae elicited a significant TES-specific IgG antibody response (Fig. 2) compared to both non-infected groups (naive and EAE). Although there were small differences between group *Tc* and group *Tc*+EAE, these differences were not statistically significant.

Toxocara canis infection worsened clinical symptoms of EAE mice and exacerbated their weight loss

Occurrence of EAE symptoms was detected from 7 d.e.i. in *Tc*+EAE and also in EAE; however, the main increase in scores was observed from 14 d.e.i. From 27 d.e.i. until the end of the experiment, *Tc*+EAE mice exhibited a significantly higher (worse) clinical score compared to EAE mice (Fig. 3A). Of note, 4 *Tc*+EAE and 2 EAE mice died during the experiment (*Tc*+EAE 20, 23, 24, 27 d.e.i., EAE 29, 36 d.e.i.). No symptoms or mortality were recorded in naive and *Tc* mice.

Considerable weight loss was noticed in *Tc*+EAE and EAE mice starting 15 d.e.i. While the weight loss ceased in EAE mice within 2 weeks, in *Tc*+EAE mice it remained decreased until the end of the experiment, being significantly different

from EAE mice from 26 d.e.i. (Fig. 3B). No weight loss was found in both control groups (naive and *Tc*).

Increased concentrations of all measured serum cytokines were found in *Tc*+EAE mice

To determine the concentration of cytokines in serum, the CBA method was used, which allows determining the concentration of all cytokines in 1 sample at the same time. The concentrations of all measured cytokines (IL-4, IL-10, IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-2 and IL-17A) were significantly elevated in *Tc*+EAE mice compared to EAE mice (Fig. 4). *Tc* mice had higher concentrations of all measured cytokines than naive mice, but when compared to EAE mice, a significant increase was found only for IL-10, IL-1 α , IL-6, IFN- γ and IL-17A. Moreover, except for IL-17A, *Tc*+EAE mice tended to show higher levels of all cytokines compared with *Tc* mice (Fig. 4).

Tc+EAE mice exhibited increased infiltration of the CNS by CD4+ T cells along with the reduced frequency of Tregs

The flow cytometry analysis revealed a decrease in the amount of CD4+ T cells and CD4+FoxP3+Helios+ Tregs in the spleen and MLN of EAE and *Tc*+EAE mice, but the frequency of Tregs was not strikingly affected in the organs (Fig. 5A and B). On the contrary, significantly more CD4+ T cells were recruited into the CNS of *Tc*+EAE mice. While the amount of Tregs was similar to EAE mice, their frequency was significantly lower (Fig. 5C) suggesting that other CD4+ T cell subpopulations were enriched in the CNS.

Discussion

Toxocara canis is a socioeconomically important zoonotic human pathogen. A large percentage of the population has been infected with *T. canis* (Strube *et al.*, 2020b), which can have in some cases serious health consequences. These include, e.g. granulomatous hepatitis, myocarditis, nephritis, asthma, retinitis and vitritis, which can result in blindness and other pathologies. Neurodegenerative disorders associated with neurotoxocarosis are also studied (e.g. seizure, schizophrenia, dementia and cognitive deficits) (Ma *et al.*, 2018). However, *T. canis*, like other helminths, also possesses mechanisms that allow long-term survival in the host, preventing pathological manifestations by altering the immune reaction. This could result in concomitant recovery from other pathologies associated with inflammation (Ditgen *et al.*, 2014; Maizels and McSorley, 2016; Loukas *et al.*, 2021). This study focused on the impact of a low *T. canis* larvae infection dose on the course of EAE, and, in the discussion, on the possible (positive) immunomodulatory potential of other helminths.

Our results showed that *T. canis* infection 5 weeks before EAE induction led to worsening of the clinical symptom score compared to EAE mice without infection. Two doses of 100 L3 larvae each were used for infection to minimize behavioural changes that may be observed when infection with a high dose of larvae or eggs is used (Holland and Cox, 2001; Hamilton *et al.*, 2006; Janeczek *et al.*, 2017; Strube *et al.*, 2020a). The immune response to infection with 100 larvae was confirmed by detection of TES-specific IgG according to a previous study (Novák *et al.*, 2017). Even with the infection by 2 small doses of 100 larvae each, we can assume that in the chronic phase of the infection a part of the larvae is already located in the CNS (Ollero *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2017). Our data showed that the first symptoms of the disease appeared from day 7 after EAE induction, however, the onset of the majority of symptoms was observed in EAE and *Tc*+EAE

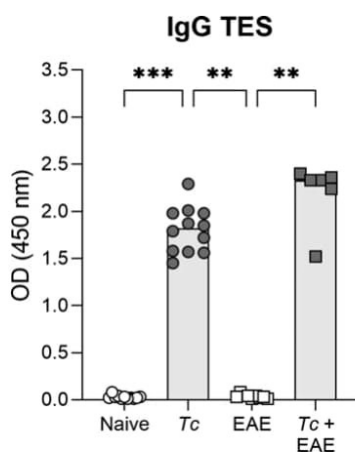


Fig. 2. Specific IgG antibodies against *T. canis* excretory-secretory antigen (IgG TES) in mouse sera were measured by ELISA at optical density 450 nm. Individual data are shown along with the group median, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test were used to evaluate the differences between pre-selected groups (naive vs *Tc*, naive vs EAE, *Tc* vs EAE, *Tc* vs *Tc*+EAE and EAE vs *Tc*+EAE) ($n = 12$ mice in naive and *Tc* groups, $n = 10$ mice in EAE group and $n = 8$ mice in *Tc*+EAE group: 2 and 4 mice died during the experiment in EAE and *Tc*+EAE groups, respectively). Significant differences are indicated by asterisks (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). *Tc*, *Toxocara canis*, EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis.

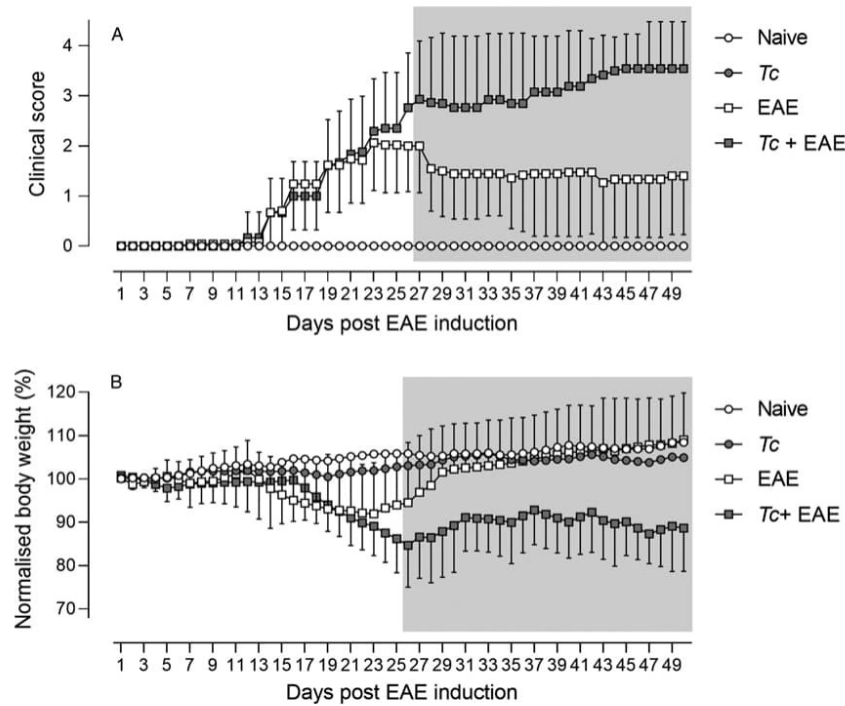


Fig. 3. Infection with *T. canis* L3 larvae worsened the clinical score of EAE (A) and led to a reduction in the body weight (B) of infected mice with EAE (*Tc*+EAE) compared to the group with only induced EAE (group EAE). The differences between these groups were significant from day 27 (clinical score) and from day 26 (normalized body weight %) post the EAE induction (indicated by the grey area). Data are presented as means \pm standard deviations (omitted in naive and EAE for clarity) from 2 independent experiments ($n=12$ mice per group in each experiment, i.e. data for 24 animals entering the experiment per group in total are shown). Data for the clinical score of EAE (A) of *Tc* mice are not visible, this group had no symptoms, overlaid on the naive group in the figure.

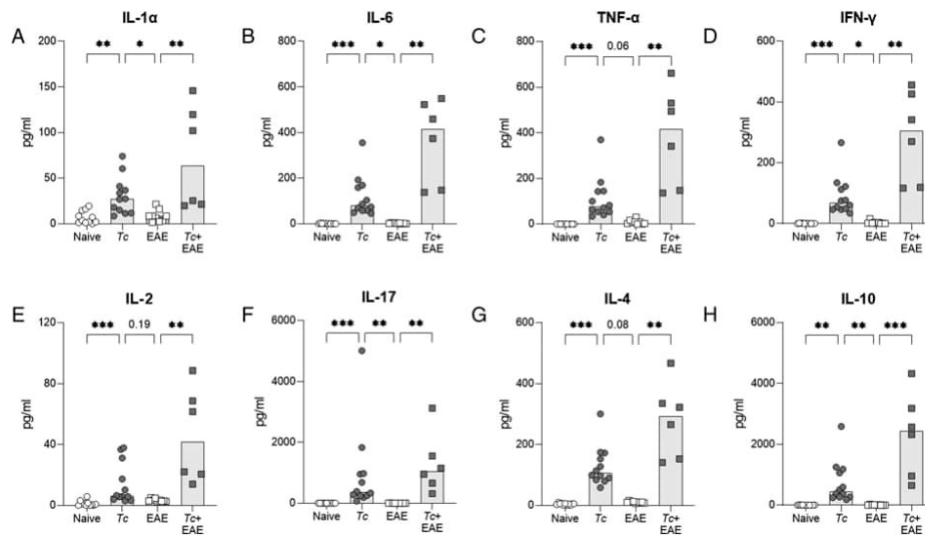


Fig. 4. Serum concentrations of IL-1 α (A), IL-6 (B), TNF- α (C), IFN- γ (D), IL-2 (E), IL-17A (F), IL-4 (G) and IL-10 (H) as measured using the BD cytometric bead array (CBA). Individual data are shown along with the group median, Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test were used to evaluate the differences between pre-selected groups (naive vs *Tc*, naive vs EAE, *Tc* vs EAE, *Tc* vs *Tc*+EAE and EAE vs *Tc*+EAE). Group naive and *Tc*: $n=12$, group EAE: $n=9$, group *Tc*+EAE: $n=6$. Significant differences are indicated by asterisks (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$) or P values are shown. *Tc*, *Toxocara canis*; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis.

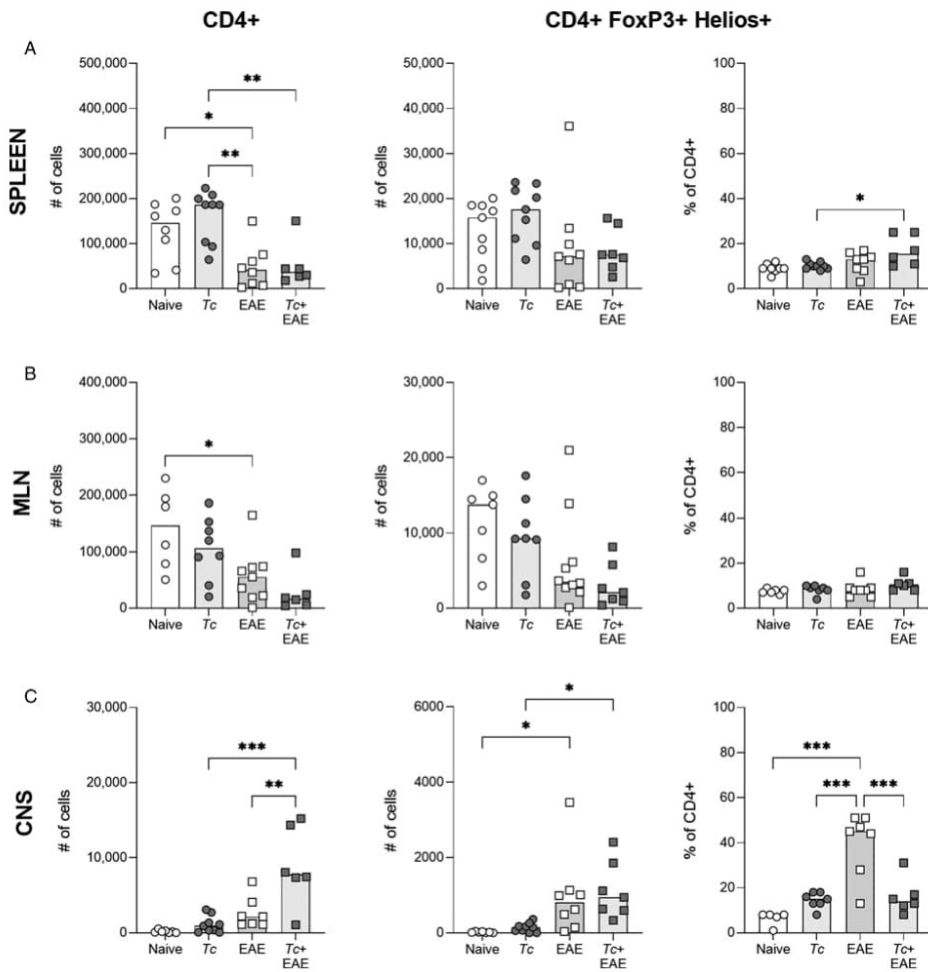


Fig. 5. CD4⁺ T cells and Treg cells (CD4⁺FoxP3⁺Helios⁺) were analysed by flow cytometry in spleen (**A**), mesenteric lymph node (MLN; **B**) and central nervous system (CNS; **C**). Individual data are shown along with the group median, Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s test were used to evaluate the differences between pre-selected groups (naive vs Tc, naive vs EAE, Tc vs EAE, Tc vs Tc+EAE and EAE vs Tc+EAE). Group naive: n = 6, group Tc: n = 7, group EAE: n = 8, group Tc+EAE: n = 7. Significant differences are indicated by asterisks (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001). Tc, *Toxocara canis*, EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis.

mice from day 14. This is consistent with the previous studies (Wu *et al.*, 2010; Bittner *et al.*, 2014; Bing *et al.*, 2015; Donskow-Lysoniewska *et al.*, 2018). Similarly, the first weight reduction was noticed in Tc+EAE and EAE mice from day 17. Higher clinical symptom scores and greater weight losses in Tc+EAE compared to EAE mice were visible from day 23 after induction of EAE, and from day 27 (symptom scores) and 26 (weight losses) were statistically significant until the end of the experiment. Our data show that a negative effect of previous infection on the course of EAE was recorded for both parameters studied. This observation markedly contradicts most studies conducted with various helminths or their products (reviewed by Charabati *et al.*, 2020). In this respect, our data are similar to the results with rTl-gal derived from *Toxascaris leonina* (Bing *et al.*, 2015). Administration of the galectin resulted in worsening of EAE symptoms, greater demyelination and increased inflammatory infiltration. Surprisingly, the same galectin attenuated

clinical symptoms of inflammatory bowel disease in mice (Kim *et al.*, 2010). The mechanism by which rTl-gal exacerbates EAE has not yet been explained in detail. A possible explanation is that treatment with rTl-gal leads to a strong, combined (Th1, Th17, Th2, inflammatory and humoral) immune response to MOG peptide, which may exacerbate the autoimmunity by increasing the production of potentially pathogenic autoantibodies against myelin (Genain *et al.*, 1996; Ohtani *et al.*, 2011; Bing *et al.*, 2015).

To better understand the mechanisms of worsening symptoms and weight losses, we measured serum cytokine concentrations using the CBA method. For all cytokines determined, significantly increased levels were measured in Tc+EAE mice compared to EAE mice. For Th2-associated (IL-4) and Treg-associated (IL-10) cytokines, we measured significantly increased serum concentrations in Tc+EAE mice compared to the EAE mice, which is consistent with previous studies (Sewell *et al.*, 2003;

Gruden-Movsesijan *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Donskow-Lysoniewska *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Sofronic-Milosavljevic *et al.*, 2013; Peon *et al.*, 2017). However, the positive immunomodulatory effect of IL-4 and IL-10 in *T. canis* infections in our study is likely to be suppressed by the action of Th1 (TNF- α , IFN- γ) and Th17 (IL-17, IL-6) cytokines produced at elevated amounts as well. Our data showed that the levels of all these cytokines were also significantly increased in *Tc*+EAE mice compared to the EAE mice. Increased concentrations of Th17-associated cytokines were similarly described in EAE with subsequent infection with *T. crassiceps* (IL-17) (Reyes *et al.*, 2011) and *H. polygyrus* (IL-17, IL-6) (Donskow-Lysoniewska *et al.*, 2012). In contrast, infection or administration of products of *T. spiralis* and *T. crassiceps* resulted in decreased levels of IL-17 (Sofronic-Milosavljevic *et al.*, 2013; Radovic *et al.*, 2015; Peon *et al.*, 2017) and IL-6 (Gruden-Movsesijan *et al.*, 2010). Our measurements of increased concentrations of Th1-associated cytokines (TNF- α and IFN- γ) also contrast with the decreased concentrations of these cytokines after administration of *T. crassiceps* products (Reyes *et al.*, 2011; Peon *et al.*, 2017) or infection with *S. mansoni* (La Flamme *et al.*, 2003). Thus, the worsening of clinical symptoms and weight losses may be the result of *T. canis* infection and its neuroinvasion, together with the presence of anti-myelin pathogenic autoantibodies, and increased concentrations of Th1- and Th17-associated cytokines.

Not surprisingly, we found low levels of serum cytokines in naive mice and EAE mice. Some studies that have measured serum cytokine levels have also measured low levels of cytokines in the uninfected group with EAE (Donskow-Lysoniewska *et al.*, 2012) and low level of IL-4 and IFN- γ (Zheng *et al.*, 2008). On the other hand, there are studies showing significantly increased levels of all cytokines in EAE mice compared to the control naive mice (Jahan-Abad *et al.*, 2020). It was also not surprising that we found higher levels of all cytokines in *Tc* mice compared to naive and EAE mice. The detected cytokine concentrations in *Tc* mice were lower than in *Tc*+EAE mice; however, these differences were not statistically significant. This may suggest that the infection with subsequent EAE leads to a further increase in cytokine levels, corresponding to worsening of symptoms and weight losses in *Tc*+EAE mice.

To further elucidate what is behind the worsening symptomatology in *Tc*+EAE mice, we focused on the population of CD4+ and Treg cells in the spleen, MLN and CNS, and their role in disease development. In the CNS, a significantly higher number of CD4+ cells was found in *Tc*+EAE mice compared to the EAE mice, and also compared to *Tc* mice. This would suggest that the 'double hit' caused by *T. canis* neuroinvasion and subsequent EAE led to infiltration of CD4+ cells into the CNS. However, a surprise was the lower percentage of Tregs in the CD4+ cell population in *Tc*+EAE mice, suggesting the presence of non-Treg CD4+ cell populations, such as Th1 and Th17, whose pro-inflammatory effects may contribute to CNS damage and subsequent worsening of the EAE course, consistent with the described symptomatology in this group. Similarly, the milder symptomatology in EAE mice may be due to a significantly higher proportion of Tregs in the CD4+ cell population in the CNS, which may be explained by proliferation of Tregs in response to the presence of autoantigen (MOG peptide), which may subsequently reduce the ongoing autoimmune processes. Higher quantity of CD4+ cells (and Tregs) found in the spleen and MLN samples in naive and *Tc* mice compared to both EAE and *Tc*+EAE mice could be explained by down-regulation of CD4+ T cells and Tregs due to administration of PT during EAE induction. These results suggest that the potential immunomodulatory capacity of *T. canis* in *Tc*+EAE mice is likely reduced and overwhelmed by the consequences of neuroinvasion of L3 larvae, and during subsequent induction of EAE, this

combination causes worsening of symptomatology with increased cytokine levels and infiltration of pro-inflammatory CD4+ cells. However, this hypothesis needs to be experimentally tested.

Conclusion

The data presented here show a negative effect of *T. canis* infection on the course of EAE, the mouse model of MS. Specifically, we observed exacerbation of the clinical scores, prolonged weight losses and strikingly elevated serum levels of multiple cytokines, suggesting dysfunction of the immune regulation in *Tc*+EAE mice. Additionally, these mice harboured significantly more CD4+ T cells of non-Treg phenotype within the affected CNS. Altogether, our results demonstrate that the infection of mice with *T. canis* worsens the course of subsequently induced EAE. Further studies are urgently needed to reveal the underlying pathological mechanisms and to investigate possible risks for the human population, in which the exposure to *T. canis* is frequent.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182022001238>

Data availability. All data are presented within the article or Supplementary materials.

Acknowledgements. We thank Ladislav Drož, Ph.D. and Věra Černá, Ph.D., both from APIGENEX, for providing the MOG peptide and Professor Peter Šebo, Ph.D., Institute of Microbiology, The Czech Academy of Sciences, for providing the pertussis toxin. We thank Jiří Šinkora, Ph.D., BD Czech Republic, for the analysis of the CBA data.

Author's contributions. J. N.: experiment design, execution of experiments, data interpretation, writing article. T. M.: design consultation, statistical analysis, data visualization and interpretation, writing and reviewing article. M. M.: FlowJo analysis. M. K. and K. S.: execution of experiments. V. C.: flow cytometry consultation and data interpretation. L. K.: experiment design, reviewing article. J. H.: experiment design, flow cytometry consultation, reviewing article. P. H.: experiment design, reviewing article.

Financial support. As for Jan Novák, Marie Kostelanská, Kateřina Skulinová, Viktor Černý, Jiří Hrdý and Libuše Kolářová, the study was financially supported by Charles University (GAUK 32915, SVV 360520, SVV 260369, PROGRES Q25, COOPERATIO IMMUNO 207032). As for Tomáš Macháček, Martin Majer and Petr Horák, the study was financially supported by Charles University (COOPERATIO BIOLOGY, UNCE/SCI/012-204072/2018, SVV 260563/2020).

Conflict of interest. None.

Ethical standards. The experimental design and procedures were approved by the Ethical Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University and the Ministry of Education, Youth and Sports (ID: MSMT-21527/2017-10, 10 August 2017). The experiments were performed in strict accordance with institutional guidelines and national/EU animal welfare laws and directives.

References

- Bing SJ, Ha D, Ahn G, Cho J, Kim A, Park SK, Yu HS 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.
- Bittner S, Afzali AM, Wiendl H and Meuth SG (2014) Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG(35–55)) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *Journal of Visualized Experiments* **86**, e51275. doi: 10.3791/51275.
- Bowman DD, Mikagrieve M and Grieve RB (1987) Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody-responses in mice infected with *Toxocara-canis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **36**, 75–82.

- Charabati M, Donkers SJ, Kirkland MC and Osborne LC (2020) A critical analysis of helminth immunotherapy in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* **26**, 1448–1458.
- Chiuso-Minicucci F, Van DB, Zorzella-Pezavento SFG, Peres RS, Ishikawa LLW, Rosa LC, Franca TGD, Turato WM, Amarante AFT and Sartori A (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis evolution was not modified by multiple infections with *Strongyloides venezuelensis*. *Parasite Immunology* **33**, 303–308.
- Dargahi N, Katsara M, Tselios T, Androutsou ME, de Courten M, Matsoukas J and Apostolopoulos V (2017) Multiple sclerosis: immunopathology and treatment update. *Brain Sciences* **7**, 78. doi: 10.3390/brainsci7070078.
- Desavigny DH, Voller A and Woodruff AW (1979) Toxocariasis – serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology* **32**, 284–288.
- Ditgen D, Anandarajah EM, Meissner KA, Brattig N, Wrenger C and Liebau E (2014) Harnessing the helminth secretome for therapeutic immunomodulators. *Biomed Research International* **2014**, 964350. doi: 10.1155/2014/964350.
- Donskow-Lysoniewska K, Krawczak K and Doligalska M (2012) *Heligmosomoides polygyrus*: EAE remission is correlated with different systemic cytokine profiles provoked by L4 and adult nematodes. *Experimental Parasitology* **132**, 243–248.
- Donskow-Lysoniewska K, Krawczak K, Bocian K and Doligalska M (2018) The effects of intestinal nematode L4 stage on mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* **66**, 231–243.
- Doonan J, Thomas D, Wong MH, Ramage HJ, Al-Riyami L, Lumb FE, Bell KS, Fairlie-Clarke KJ, Suckling CJ, Michelsen KS, Jiang HR, Cooke A, Harnett MM and Harnett W (2018) Failure of the anti-inflammatory ParasiticWorm product ES-62 to provide protection in mouse models of type 1 diabetes, multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. *Molecules* **23**. doi: 10.3390/molecules23102669.
- Fan CK, Holland CV, Loxton K and Barghouth U (2015) Cerebral toxocariasis: silent progression to neurodegenerative disorders?. *Clinical Microbiology Reviews* **28**, 663–686.
- Finlay CM, Stefanska AM, Walsh KP, Kelly PJ, Boon L, Lavelle EC, Walsh PT and Mills KHG (2016) Helminth products protect against autoimmunity via innate type 2 cytokines IL-5 and IL-33, which promote eosinophilia. *Journal of Immunology* **196**, 703–714.
- Fonseca GRE, dos Santos SV, Chieffi PP, de Paula FM, Grysczek RCB and Lescano SAZ (2017) Experimental toxocariasis in BALB/c mice: relationship between parasite inoculum and the IgG immune response. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **112**, 382–386.
- Genain CP, Abel K, Belmar N, Villinger F, Rosenberg DP, Linington C, Raine CS and Hauser SL (1996) Late complications of immune deviation therapy in a nonhuman primate. *Science* **274**, 2054–2057.
- Glickman LT and Schantz PM (1981) Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiologic Reviews* **3**, 230–250.
- Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Milic M and Sofronic-Milosavljevic L (2010) Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite Immunology* **32**, 450–459.
- Hamilton CM, Stafford P, Pinelli E and Holland CV (2006) A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. *Parasitology* **132**, 791–801.
- Hauser SL, Kappos L, Montalban X, Craveiro L, Chognot C, Hughes R, Koendgen H, Pasquarelli N, Pradhan A, Prajapati K and Wolinsky JS (2021) Safety of ocrelizumab in patients with relapsing and primary progressive multiple sclerosis. *Neurology* **97**, E1546–E1559.
- Holland CV (2017) Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. *Parasitology* **144**, 81–94.
- Holland CV and Cox DM (2001) *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered host behaviour? *Journal of Helminthology* **75**, 125–135.
- Jahan-Abad AJ, Karima S, Shateri S, Baram SM, Rajaei S, Morteza-Zadeh P, Borhani-Haghighi M, Salari AA, Nikzamir A and Gorji A (2020) Serum pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuropathology* **40**, 84–92.
- Janecek E, Beineke A, Schneider T and Strube C (2014) Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and T-cati for the cerebellum in the paratenic model host mouse. *Parasites and Vectors* **7**, 194. doi: 10.1186/1756-3305-7-194.
- 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**, 0005594. doi: 10.1371/journal.pntd.0005594.
- Kim JY, Cho MK, Choi SH, Lee KH, Ahn SC, Kim DH and Yu HS (2010) Inhibition of dextran sulfate sodium (DSS)-induced intestinal inflammation via enhanced IL-10 and TGF-beta production by galectin-9 homologues isolated from intestinal parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* **174**, 53–61.
- Kuijk LM, Klaver EJ, Kooij G, van der Pol SMA, Heijnen P, Bruijns SCM, Kringel H, Pinelli E, Kraal G, de Vries HE, Dijkstra CD, Bouma G and van Die I (2012) Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Molecular Immunology* **51**, 210–218.
- La Flamme AC, Ruddenklau K and Backstrom BT (2003) Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infection and Immunity* **71**, 4996–5004.
- Loukas A, Maizels RM and Hotez PJ (2021) The yin and yang of human soil-transmitted helminth infections. *International Journal for Parasitology* **51**, 1243–1253.
- Lund ME, Greer J, Dixit A, Alvarado R, McCauley-Winter P, To J, Tanaka A, Hutchinson AT, Robinson MW, Simpson AM, O'Brien BA, Dalton JP and Donnelly S (2016) A parasite-derived 68-mer peptide ameliorates autoimmune disease in murine models of type 1 diabetes and multiple sclerosis. *Scientific Reports* **6**, 37789. doi: 10.1038/srep37789.
- Ma GX, Holland CV, Wang T, Hofmann A, Fan CK, Maizels RM, Hotez PJ and Gasser RB (2018) Human toxocariasis. *Lancet Infectious Diseases* **18**, E14–E24.
- Ma GX, Rostami A, Wang T, Hofmann A, Hotez PJ and Gasser RB (2020). Global and regional seroprevalence estimates for human toxocariasis: a call for action. In Bowman DD (ed.), *Advances in Parasitology: Toxocara and Toxocariasis*, vol. **109**. London, UK: Elsevier Ltd., pp. 275–290.
- Maizels RM (2020) Regulation of immunity and allergy by helminth parasites. *Allergy* **75**, 524–534.
- Maizels RM and McSorley HJ (2016) Regulation of the host immune system by helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **138**, 666–675.
- Novák, J, Panská, L, Macháček, T, Kolářová, L and Horák (2017) Humoral response of mice infected with *Toxocara canis* following different infection schemes. *Acta Parasitologica* **62**, 823–835.
- Ohtani S, Kohyama K and Matsumoto Y (2011) Autoantibodies recognizing native MOG are closely associated with active demyelination but not with neuroinflammation in chronic EAE. *Neuropathology* **31**, 101–111.
- Ollero MD, Fenoy S, Cuellar C, Guillen JL and del Aguila C (2008) Experimental toxocariasis in BALB/c mice: effect of the inoculation dose on brain and eye involvement. *Acta Tropica* **105**, 124–130.
- Peon AN, Ledesma-Soto Y, Olguin JE, Bautista-Donis M, Sciotto E and Terrazas LI (2017) Helminth products potentially modulate experimental autoimmune encephalomyelitis by downregulating neuroinflammation and promoting a suppressive microenvironment. *Mediators of Inflammation* **2017**, 8494572. doi: 10.1155/2017/8494572.
- Pino PA and Cardona AE (2011) Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using Percoll gradients. *Journal of Visualized Experiments* **48**, 2348. doi: 10.3791/2348.
- Radovic I, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Cvetkovic J, Mojsilovic S, Devic M and Sofronic-Milosavljevic L (2015) Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory-secretory antigens. *Immunologic Research* **61**, 312–325.
- Reyes JL, Espinoza-Jimenez AF, Gonzalez MI, Verdin L and Terrazas LI (2011) *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular Immunology* **267**, 77–87.
- Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH and Ferreira MU (2010) Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **104**, 3–23.
- Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M and Fabry Z (2003) Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *International Immunology* **15**, 59–69.

- Smallwood TB, Giacomin PR, Loukas A, Mulvenna JP, Clark RJ and Miles JJ (2017) Helminth immunomodulation in autoimmune disease. *Frontiers in Immunology* **8**, 453. doi: 10.3389/fimmu.2017.00453.
- Sofronic-Milosavljevic L, Radovic I, Ilic N, Majstorovic I, Cvetkovic J and Gruden-Movsesijan A (2013) Application of dendritic cells stimulated with *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Medical Microbiology and Immunology* **202**, 239–249.
- Strube C, Heuer L and Janecek E (2013) *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology* **193**, 375–389.
- Strube C, Waindok P, Raulf MK and Springer A (2020a) *Toxocara*-induced neural larva migrans (neurotoxocarosis) in rodent model hosts. In Bowman DD (ed.), *Advances in Parasitology: Toxocara and Toxocariasis*, vol. **109**. London, UK: Elsevier Ltd., pp. 189–218.
- Strube C, Raulf MK, Springer A, Waindok P and Auer H (2020b) Seroprevalence of human toxocarosis in Europe: a review and meta-analysis. In Bowman DD (ed.), *Advances in Parasitology: Toxocara and Toxocariasis*, vol. **109**. Elsevier Ltd, pp. 375–418.
- Terrazas C, Ruiz-Rosado JD, Amici SA, Jablonski KA, Martinez-Saucedo D, Webb LM, Cortado H, Robledo-Avila F, Oghumu S, Satoskar AR, Rodriguez-Sosa M, Terrazas LI, Guerau-de-Arellano M and Partida-Sanchez S (2017) Helminth-induced Ly6C(hi) monocyte-derived alternatively activated macrophages suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scientific Reports* **7**, 40814. doi: 10.1038/srep40814.
- Tran GT, Wilcox PL, Dent LA, Robinson CM, Carter N, Verma ND, Hall BM and Hodgkinson SJ (2017) Interleukin-5 mediates parasite-induced protection against experimental autoimmune encephalomyelitis: association with induction of antigen-specific CD4(+) CD25(+) T regulatory cells. *Frontiers in Immunology* **8**, 1453. doi: 10.3389/fimmu.2017.01453.
- Waindok P and Strube C (2019) Neuroinvasion of *Toxocara canis* – and *T. cati*–larvae mediates dynamic changes in brain cytokine and chemokine profile. *Journal of Neuroinflammation* **16**, 147. doi: 10.1186/s12974-019-1537-x.
- Walsh KP, Brady MT, Finlay CM, Boon L and Mills KHG (2009) Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *Journal of Immunology* **183**, 1577–1586.
- White MPJ, Johnston CJC, Grainger JR, Konkel JE, O'connor RA, Anderton SM and Maizels RM (2020) The Helminth Parasite *Heligmosomoides polygyrus* Attenuates EAE in an IL-4R alpha-Dependent Manner. *Frontiers in Immunology* **11**, 1830. doi: 10.3389/fimmu.2020.01830.
- Wilson MS, Taylor MD, O'Gorman MT, Balic A, Barr TA, Filbey K, Anderton SM and Maizels RM (2010) Helminth-induced CD19(+)/CD23 (hi) B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *European Journal of Immunology* **40**, 1682–1696.
- Wu ZL, Nagano I, Asano K and Takahashi Y (2010) Infection of non-encapsulated species of *Trichinella* ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis involving suppression of Th17 and Th1 response. *Parasitology Research* **107**, 1173–1188.
- Zheng XP, Hu XQ, Zhou GY, Lu ZQ, Qiu W, Bao H and Dai YQ (2008) Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. *Journal of Neuroimmunology* **194**, 107–114.
- Zhu B, Trikudanathan S, Zozulya AL, Sandoval-Garcia C, Kennedy JK, Atochina O, Norberg T, Castagner B, Seeberger P, Fabry Z, Harn D, Khoury SJ and Guleria I (2012) Immune modulation by Lacto-N-fucopentaose III in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical Immunology* **142**, 351–361.