

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Parazitologie
Studijní obor: Biologie
Katedra parazitologie



Bc. Libuše Turjanicová

Protilátková odpověď specifických hostitelů vůči antigenům ptačích schistosom

Humoral response of specific hosts to bird schistosome antigens

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Školitelka specialista: RNDr. Lucie Lichenbergová, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27.8. 2012

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat svému školiteli, Liboru Mikešovi za velkou pomoc, trpělivost a hlavně za pevné nervy, které byly při psaní této práce více než potřeba. Dále děkuji svojí konzultantce Luce Lichtenbergové za cenné rady a zasvěcení do tajů imunologických metod.

Také bych chtěla poděkovat Martinu Kašnému za pomoc s „molekulárnickou alchymí“, Hance Dvořákové za pomoc při pokusech a za poskytnutí rekombinantních cathepsinů B1 a B2 a vlastně celému osazenstvu helmintologické laboratoře za milé prostředí a velkou toleranci k mým pěveckým výstupům.

V neposlední řadě děkuji za podporu své rodině a přátelům, kteří mě při psaní uklidňovali a rozptylovali. A na závěr patří poděkování mému příteli Honzovi za pomoc s mnoha pro mě zprvu neovladatelnými programy a za klid, který na mě přenesl a díky němuž jsem zvládla pokořit výzvu v podobě dopsání této práce.

Abstrakt

Tato práce zaměřená na humorální odpověď specifických hostitelů proti antigenům různých vývojových stadií ptačích schistosom *T. regenti* a *T. szidati* navazuje na předchozí výzkum protilátkové odpovědi u nespecifických hostitelů (myš, člověk). Pomocí metod ELISA a na western blotu byla testována séra experimentálně nakažených kachen a séra z ulovených divokých kachen. Séra byla odebírána v předem určených intervalech. Výsledky ELISA testu ukazují průběh humorální odpovědi po infekci ptačími schistosomami. Po infekci *T. regenti* se 20. d.p.i. (den po infekci) významně zvýšila hladina specifických protilátek IgY proti homogenátu cercárií *T. regenti*. U kachen nakažených druhem *T. szidati* nebyl podobný vývoj zaznamenán. Změny hladiny specifických IgM proti homogenátu cercárií *T. szidati* byly zaznamenány pouze u kachen nakažených v době plné imunokompetence a u opakovaně infikovaných kachen. Jednalo se o mírné zvýšení hladiny IgM 10. d.p.i. U ulovených kachen nebyla při celkovém vyšetření prokázána infekce ptačími schistosomami, což potvrzují i výsledky ELISA.

Protilátky IgY z sér kachen infikovaných *T. regenti* na imunoblotu silně rozpoznávaly 2 antigeny v oblasti 49-47 kDa a 47-45 kDa. Objevily se i další reakce, které však nebyly zaznamenány u všech jedinců. Western blot, při němž jako antigen sloužil homogenát 7 denních schistosomul *T. regenti*, ukázal specifickou vazbu na antigeny o molekulové velikosti 37 kDa a 18 kDa. Všechna séra testovaných kachen *T. regenti* i *T. szidati* včetně kontrol se nespecificky vážala na rekombinantní cathepsin CB2. Rekombinantní cathepsin CB1.1 byl rozpoznáván pouze některými séry, vždy se ale jednalo o séra infikovaných kachen. Výroba rekombinantní trioso - fosfát izomerázy, která byla v předchozích pokusech silně imunogenní, je ve stádiu zaklonování v expresním systému buněk *Escherichia coli*.

Klíčová slova:

Antigen, ELISA, western blot, IgM, IgY, *Trichobilharzia*, schistosoma, kachna, *Anas*, protilátka

Abstract

This thesis focuses on humoral immune response of specific hosts to antigens of various developmental stages of bird schistosomes *T. regenti* and *T. szidati*, and follows up on previous research of antibody response in non-specific hosts (mouse, human). Sera of experimentally infected and hunted-down wild ducks were examined using the ELISA and western blot methods. The sera samples were taken in predefined intervals. Results of the ELISA analysis show the process of humoral immune response after infection by bird schistosomes. The level of specific antibodies IgY against homogenate of *T. regenti* cercariae increased significantly 20 d.p.i. in ducks infected by *T. regenti*. Such reaction wasn't observed in ducks infected by *T. szidati*. Slight changes in level of specific antibodies IgM against *T. szidati* cercariae homogenate were observed 10 d.p.i. only in fully immunocompetent ducks and in reinfected ducks. Examination of hunted-down wild ducks didn't prove infection by bird schistosomes; this conclusion was confirmed by results of the ELISA analysis.

IgY antibodies from ducks infected by *T. regenti* demonstrated strong reactions with 2 antigens in ranges 49-47 kDa and 47-45 kDa. Other reactions, which were recognized, have not been observed in all specimen. An Western blott with homogenate from 7 days old *T. regenti* schistosomula as an antigen demonstrated a specific reaction to antigens with molecular size 37 kDa and 18 kDa. All sera of examined ducks infected by *T. regenti* as well as *T. szidati* including control groups showed non-specific reactions to recombinant cathepsin CB2. Recombinant cathepsin CB1.1 was recognized only by some sera but all of them belong to infected ducks. Fabrication of recombinant triosephosphate isomerase, which was strongly immunogenic in previous experiments, is in the stage of cloning in an the expression system of *Escherichia coli* cells.

Key words:

Antigen, ELISA, Western blott, IgM, IgY, *Trichobilharzia*, Schistosome, Duck, *Anas*, Antibody

1 Obsah

2	Úvod a cíle práce:.....	1
3	Literární přehled.....	2
3.1	Modelové organismy	2
3.1.1	<i>Trichobilharzia regenti</i>	2
3.1.2	<i>Trichobilharzia szidati</i>	3
3.2	Adaptivní a neadaptivní imunitní odpověď	3
3.3	Orgány imunitního systému ptáků	4
3.4	Th1/Th2 polarizace imunitní odpovědi u ptáků.....	5
3.5	Ptačí protilátková odpověď.....	6
3.5.1	Vznik a vývoj B-lymfocytů.....	6
3.5.2	Obecná struktura imunoglobulinu	7
3.5.3	Ptačí imunoglobuliny	8
3.5.4	Typy ptačích imunoglobulinů	8
3.5.5	Průběh ptačí humorální odpovědi.....	11
3.6	Imunitní odpověď kachen.....	12
3.7	Imunitní odpověď proti <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i> u nespecifických hostitelů.....	13
3.8	Nejvýznamnější antigeny schistosom.....	14
3.8.1	Antigeny lidských schistosom.....	15
3.8.2	Antigeny <i>T. regenti</i>	19
4	Materiál a metodika:.....	21
4.1	Složení použitých pufrů:	21
4.2	Infekce kachen	21
4.2.1	Odběry krve, její zpracování a uchování sér.....	22
4.2.2	Systém značení kachen a odběrů krve	23
4.3	Sběr parazitů na antigen a homogenizace.....	23
4.4	Měření koncentrace proteinu.....	24
4.5	Deglykosylace.....	24
4.6	Biochemické a separační analytické metody.....	24
4.6.1	SDS-PAGE Elektroforéza	24
4.6.2	Western blot.....	25
4.6.3	ELISA	26
4.7	Klonování a exprese trioso - fosfát izomerázy <i>T. szidati</i> (TsTPI).....	26

4.7.1	Izolace celkové RNA a syntéza cDNA.....	27
4.7.2	PCR s degenerovanými primery pro TsTPI	27
4.7.3	Ligace, transformace a výsev buněk <i>E. coli</i>	28
4.7.4	Kontrola transformace buněk	28
4.7.5	Příprava vzorků na sekvenaci	29
4.7.6	PCR se specifickými primery pro TsTPI	29
4.7.7	Transformace do expresního systému	30
5	Výsledky	32
5.1	ELISA IgY – séra kachen experimentálně nakažených <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i>	32
5.2	ELISA IgM – séra kachen experimentálně nakažených <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i>	35
5.3	ELISA IgY a IgM – Séra kachen získaných při myslivecké naháňce.....	38
5.4	Western blot IgY – homogenáty <i>T. regenti</i>	40
5.5	Western blot s homogenátem schistosomul <i>T. regenti</i> - IgY.....	51
5.6	Western blot IgY – homogenáty <i>T. szidati</i>	54
5.7	Ověření zkřížené reaktivity pomocí Western blotu IgY - séra kachen s <i>T. regenti</i> proti homogenátu cercárií <i>T. szidati</i>	54
5.8	Western blot TrCB1.1 a TrCB2 – IgY.....	57
5.9	Western blot IgM – homogenáty cercárií <i>T. regenti</i>	59
5.10	Sekvence TsTPI získaná pomocí degenerovaných primerů	59
6	Diskuse	61
7	Závěr.....	70
8	Seznam zkratk	73
	Zkratky používané v kapitole Výsledky.....	74
9	Použitá literatura.....	75
	Sekundární citace	82
	Další zdroje.....	82

2 Úvod a cíle práce:

Ptačí schistosomy rodu *Trichobilharzia* jsou klasickými zástupci motolic s dixenním cyklem vázaným na vodu. Larvální stadia, cercárie, vylučovaná vodními plži jsou schopna penetrovat nejen do kůže přirozených hostitelů, jimiž jsou vodní ptáci, ale také do kůže savců, často koupajících se lidí. Opakované setkání s penetrujícími cercáriemi vyvolává vznik svědivé vyrážky známé jako cercáriová dermatitida. U citlivějších jedinců se může objevit v místě penetrace otok, případně zvýšení teploty či zvětšení lymfatických uzliny. Jedná se o hypersenzitivní kožní reakci časného typu.

Imunitní systém hostitele reaguje s antigeny obsaženými v těle parazita. Mimo jiné hostitelé vytvářejí spektrum protilátek, které rozpoznávají antigenní struktury. Silně rozpoznávané antigeny lidských schistosom se testují jako možní kandidáti na přípravu účinné vakcíny proti schistosomóze, či jako potenciální indikátory k přesnějšímu stanovení diagnózy onemocnění.

Trichobilharzia regenti a *Trichobilharzia szidati* jsou dva zástupci ptačích motolic, jejichž životní cyklus je úspěšně udržován v naší laboratoři. *T. regenti* je nazální neurotropní druh způsobující svým hostitelům neuromotorické poruchy, *T. szidati* má viscerální lokalizaci. Výzkum imunitní odpovědi přirozených hostitelů těchto parazitů může vést k odhalení významných antigenů, které by mohly být užity při přípravě diagnostického kitu spolehlivě detekujícího prodělanou infekci ptačími schistosomami.

V této diplomové práci jsem se zabývala popisem humorální imunitní odpovědi kachen proti antigenům ptačích schistosom. V minulosti byla popsána imunitní odpověď proti těmto motolicím u nespecifických hostitelů. Vytkla jsem si tyto cíle:

- Monitoring humorální odpovědi (IgY a IgM) proti různým antigenům produkovaným v jednotlivých fázích infekce vývojovými stadii ptačích schistosom druhů *T. regenti* a *T. szidati* (cercárie, schistosomula)
- Porovnání průběhu humorální odpovědi kachen, které prodělaly infekci v době plné zralosti imunitního systému s odpovědí kachen nakažených v době neúplné imunitní kompetence
- Popis humorální imunitní odpovědi kachen při opakované expozici (reinfekci) v definovaných časových intervalech
- Produkce a testování rekombinantních antigenů s diagnostickým potenciálem (trioso – fosfát izomerázy, cathepsinů B1 a B2)

3 Literární přehled

Čeď Schistosomatidae se řadí mezi motolice s dvouhostitelskými cykly vázanými na vodu. Larvální stadia, cercárie, aktivně penetrují do definitivního hostitele. Jako mezihostitelé jim slouží vodní plži, definitivní hostitelé jsou vždy teplokrevní obratlovci. Zástupci čeďi Schistosomatidae jsou na rozdíl od většiny ostatních motolic gonochoristé.

3.1 Modelové organismy

3.1.1 *Trichobilharzia regenti*

Trichobilharzia regenti Horák, Kolářová a Dvořák, 1998, je ptačí motolice z čeďi Schistosomatidae, které slouží jako definitivní hostitelé vodní ptáci z čeďi Anatidae. Jedná se o nazální, neurotropní druh.

Miracidia se začínají líhnout při izoosmotickém tlaku přímo v nazální sliznici definitivního hostitele (Horák et al. 1998a). Následně ve vodním prostředí vyhledají mezihostitelského plže rodu *Radix* a aktivně penetrují jeho svalnatou nohu. V blízkosti místa průniku se vyvíjejí v primární sporocysty, uvnitř kterých vznikají z totipotentních zárodečných buněk další vývojová stadia, sekundární sporocysty. Ty aktivně migrují do místa definitivní lokalizace, kterým je hepatopankreas. Uvnitř sekundárních sporocyst se zde vyvíjejí cercárie, vývojová stadia, která se cyklicky uvolňují z infikovaného plže. Cercárie aktivně penetrují skrz kůži definitivního hostitele, vodního ptáka. Při penetraci odhazují vidličnatý ocásek a odvrhují glykokalyx a vytvářejí na svém povrchu dvojistou membránu. Přecházejí tak v další vývojové stadium nazývané schistosomulum (Horák et al. 2002). Po penetraci kůži vyhledávají schistosomula periferní nervy. V dalším průběhu infekce migrují přes míchu a mozek až do místa své definitivní lokalizace, do sliznice nazální dutiny. Schistosomula migrující nervovou tkání mají schopnost neurofagie, jak potvrdila Lichtenbergová et al. (2011) nálezem oligodendrocytů, myelinu, neurofilamentů a β -amyloid precursor proteinu (β -APP) ve střevě červa.

Celý průběh infekce je velmi rychlý; z periferních nervů, kde byl zaznamenán výskyt schistosomul již 1,5 dne po infekci, juvenilní červi domigrovali do nosní sliznice již 13. den po nákaze (Hrádková and Horák 2002). Délka vývoje parazita v definitivním hostiteli je odhadována na pouhých 23 – 25 dní od počátku infekce (Horák et al. 1999; Kolářová et al. 2001).

Některé druhy ptačích schistosom, jako jsou *T. regenti* a *T. szidati* (níže), jsou schopny proniknout do těla savců a nějaký čas zde přežívat, i když se jedná o nespecifické hostitele. Při penetraci cercárií ptačích schistosom do nespecifického hostitele jich přežije jen minoritní množství, většina zahyne v průběhu několika dní po penetraci (Haas and Pietsch 1991; Kouřilová et al. 2004). Experimentální primoinfekce myši cercáriemi *T. regenti* ukázaly, že cercárie jsou schopny transformovat se ve schistosomula, migrovat nervovou soustavou, ale nedokáží dospět a dokončit vývoj v tomto nespecifickém hostiteli. Během migrace mohou způsobovat hostiteli různé neuromotorické poruchy, například ochrnutí končetin (Horák et al. 1999).

3.1.2 *Trichobilharzia szidati*

Trichobilharzia szidati Neuhaus, 1952, je stejně jako předchozí druh ptačí schistosoma. Jedná se však o druh viscerální; dospělí červi jsou lokalizováni v cévách mezenteria a stěně střeva. Celý životní cyklus probíhá velmi podobně jako u předchozího druhu. Jako mezihostitel slouží obyčejně vodní plž *Lymnea stagnalis*. Cercárie uvolňované z hostitelského plže aktivně penetrují do definitivního hostitele. Po penetraci schistosomula, na rozdíl od druhu *T. regenti*, opouštějí kůži a vstupují do krevního řečiště. Krví jsou zaneseny do plic, kde zůstanou několik dnů, poté opět vstoupí do krevního řečiště a nechají se zanést na místo konečné lokalizace. V minulosti byl tento druh určován jako *Trichobilharzia ocellata* La Valette, 1855. Laboratorně udržované izoláty, které nesly toto označení, byly však na základě molekulární analýzy určeny jako *T. szidati* (Rudolfová et al. 2005).

Hlavním cílem této diplomové práce byl monitoring humorální imunitní odpovědi přirozených definitivních hostitelů, kachen, proti dvěma výše popsaným druhům ptačích schistosom. Imunitní odpověď vyšších obratlovců, mezi které patří i kachny, může být vedena dvěma typy mechanismů.

3.2 Adaptivní a neadaptivní imunitní odpověď

Neadaptivní imunitní odpověď (nespecifická imunita) je vývojově původnější než odpověď adaptivní. Složky této imunity jsou v organismu přítomny už před začátkem infekce. Obrannou reakci proti patogenu tak mohou zahájit během velmi krátkého časového úseku, řádově v desítkách minut. Rozpoznávají funkční či strukturní podobnosti cizorodých struktur. Reagují zvláště na ty, které jsou společné velkým skupinám patogenů.

Neadaptivní imunitní odpověď pod sebe zahrnuje především fagocytující a cytotoxické buňky (buněčné složky), komplement, lektiny a interferony (humorální složky).

Adaptivní imunitní odpověď (specifická imunita) se během evoluce vyvinula později, neboť tento její typ nalézáme až u obratlovců. Vzájemně kooperuje se složkami nespecifické imunity a celkově zefektivňuje obranyschopnost. V těle organismu můžeme nalézt velké množství imunitních složek, které jsou schopny vysoce specificky reagovat na struktury, které nejsou tělu vlastní. Humorální složky adaptivní imunitní odpovědi jsou reprezentovány imunoglobuliny a antigenně specifickými receptory T a B-lymfocytů, TCR (T-cell receptor) a BCR (B-cell receptor). Buněčné složky jsou zastoupeny hlavně různými druhy lymfocytů (Hořejší a Bartůňková 2009).

Tyto imunitní mechanismy jsou společné jak savcům, tak ptákům. Přesto, že většina prvků imunitní odpovědi je oběma skupinám společná, v některých ohledech, které budou vysvětleny dále, se od sebe odlišují.

3.3 Orgány imunitního systému ptáků

Obecně můžeme rozdělit orgány imunitního systému ptáků na dvě skupiny, na orgány primární a sekundární.

Mezi primární orgány řadíme Fabriciovu burzu a thymus. V těchto orgánech dochází k vývoji lymfocytů a dochází k přeskupování genů pro BCR (B-cell receptor) a TCR (T-cell receptor). Tyto lymfocyty migrují do sekundárních lymfatických orgánů, mezi které patří slezina, kostní dřeň, CALT (conjunctival-associated lymphoid tissue), BALT (bronchial-associated lymphoid tissue), GALT (gut-associated lymphoid tissue), Harderianova žláza a lymfatické uzliny (Ciriaco et al. 2003; Spillner et al. 2012).

Význam Fabriciovy burzy jako vysoce důležitého orgánu pro vývoj ptačí imunitní odpovědi byl odhalen díky pozorování, že kuřata, u kterých byla provedena burzektomie (chirurgické odstranění Fabriciovy burzy), nejsou schopna odolávat infekci salmonel (Glick 1954 dle Ribbati et al. 2006). Fabriciova burza je dutý lymfatický orgán, který je přítomen u všech zástupců ptáků. Tento orgán vzniká jako váčkovitá vychlípenina kloaky, se kterou je spojena dukty. Je uložena mezi páteří a dorzální stěnou kloaky. Stěna burzy se skládá ze tří vrstev. Vnější vrstva je tvořena serózou, střední vrstva svalovinou. Vnitřní slizniční vrstva je členěna na 12-15 podélně probíhajících řas. Po obou stranách každé řasy se nalézají ve dvou řadách umístěné folikuly, *folliculi lymphatici*, v nichž dochází k dozrávání B-lymfocytů (Černý 2005).

Mezi další orgány podílející se na imunitní odpovědi patří i thymus, ve kterém dochází k dozrávání a diferenciaci T- lymfocytů, stejně jako je tomu u savců. V ptačím thymu nalzáme T-lymfocyty v různém stupni vývoje. Jsou zde zastoupeny všechny subpopulace T-lymfocytů, Th (pomocné T-lymfocyty), Ts (supresorové T-lymfocyty) a Tc (cytotoxické T-lymfocyty) (Ciriaco et al. 2003).

Thymus je přesně rozdělen na kůru a dřeň. U mladých ptáků je patrný ve ventrální krajině krku. Jedná se o orgán lalůčkovité stavby, u kura ho tvoří 3-8 nepravidelných lalůček. Svoji funkci začne plnit kolem 11. dne života. U kura byl největší rozvoj thymu pozorován mezi 14. a 17. týdnem, u kachen dosahuje největší hmotnosti v 11. týdnu. S přibývajícím věkem ptáků začíná thymus involovat. Projevuje se to mizícími hranicemi mezi kůrou a dřeň. Involuce nemusí být vždy úplná, v některých případech můžeme u dospělých ptáků nalézt zbytky tkáně brzlíku (Černý 2005).

U savců probíhá granulopoéza a lymfopoéza ve slezině, u ptáků funkci lymfopoézy zastává kostní dřeň. Lymfopoéza je lokalizovaná v extravaskulárním prostoru kostní dřene v tzv. germinálních centrech. Granulocytopoéza, která probíhá ve slezině, začíná v červené dřeni 12.-13. den inkubace kuřecího vejce (Černý 2005).

3.4 Th1/Th2 polarizace imunitní odpovědi u ptáků

Ptačí organismus se stejně jako organismus savců setkává jak s intracelulárními, tak s extracelulárními patogeny. Ze studia savčího a lidského imunitního systému známe mechanismus Th1 a Th2 polarizace. Tato polarizace je z velké části řízena pomocí antigen specifických Th lymfocytů.

Naivní CD4⁺ Th lymfocyt se může po setkání s makrofágem, který prezentuje na svém MHC II (major histokompatibility complex II) antigen, který rozpozná svým TCR přeměnit na Th1- lymfocyt. Th1 polarizace imunitní odpovědi je spojena se vznikem zánětu, zabíjením buněk infikovaných viry a s eliminací dalších intracelulárních parazitů. Th₁-lymfocyty produkují do okolí vysoké hladiny IFN- γ (interferon γ), který slouží k aktivaci makrofágů. Dále je tento typ odpovědi spojen s vysokými hladinami IL-12 (interleukin 12) a IL-2.

Th2 polarizace imunitní odpovědi se projevuje zvýšením hladin IL-4, IL-5 a IL-13. Dochází k ní po setkání naivního CD4⁺ Th lymfocytu s APC (antigen-presenting cell), na jejímž MHC II je navázán cizorodý fragment, který T buňka rozezná. Th₂-lymfocyty mají za úkol stimulovat rozvoj humorální imunitní odpovědi tím, že pomocí volných či membránově

vázaných cytokinů stimulují klony B-lymfocytů, které rozpoznávají parazitární antigen (Degen et al. 2005; Hořejší a Bartůňková 2009).

Dlouho nebylo zřejmé, jestli tento typ polarizace imunitní odpovědi využívají i ptáci. Degen et al. (2005) v pokusu infikovali dvě skupiny kuřat, jednu virem NDV (Newcastle disease virus) a druhou škrkavkami *Ascaridia galli*, a sledovali pomocí RT-PCR (real time PCR), jestli se objeví interleukiny typické pro jednotlivé polarizace. U skupiny nakažené NDV byla během 24 hodin po infekci zvýšena exprese IFN- γ ve slezině a v lymfatické tkáni v oblasti ilea. Zároveň bylo zaznamenáno snížení produkce IL-13. Jednalo se o klasický průběh Th1 polarizované reakce, jak je znám u savčích modelů. Čtrnáct dní po perorální infekci vajíčky škrkavky *A. galli* vykazovala nakažená skupina kuřat klasické Th2 složení cytokinů. Byla zaznamenána exprese IL-4 a zvláště vysoká exprese IL-13 v lymfatické tkáni v oblasti ilea, v menší míře ve slezině. Exprese IFN- γ v obou tkáních byla snižena. Na základě těchto výsledků se zdá, že mechanismy Th1/Th2 polarizace u ptáků fungují na obdobném principu jako u savčích modelů.

3.5 Ptačí protilátková odpověď

K oddělení ptačí a savčí linie došlo v evoluci před více než 300 miliony let (Tizard 2002). Obě linie prošly za tuto dobu rozdílným vývojem, který se promítl také do vývoje adaptivní imunitní odpovědi. V mnoha ohledech jsou savčí a ptačí humorální imunitní odpověď podobné, je ovšem důležité uvědomit si, že při výzkumu na ptačím modelu můžeme narazit na některá specifika, která budou přiblížena v této kapitole.

3.5.1 Vznik a vývoj B-lymfocytů

Stejně jako u savců vznikají B-lymfocyty z kmenových buněk a jsou součástí lymfoidní vývojové řady právě jako T-lymfocyty a NK buňky (Natural Killer). Prekursori B-lymfocytů, se vyvíjejí nejprve v žloutkovém vaku a následně v kostní dřeni ptáků. Odtud putují do pro ptáky charakteristického ústředního imunitního orgánu, Fabriciovy burzy (Ratcliffe 2006).

K migraci prekurzorových buněk do Fabriciovy burzy dochází u kuřat většinou mezi 8. a 14. dnem embryonálního vývoje (Benatar et. al 1991). Zde se diferencují v imunitně kompetentní B-lymfocyty, které začínají Fabriciovu burzu opouštět po 15. dni embryonálního vývoje. V tomto období (14. den embryogeneze) již mají lymfocyty membránově vázané IgM (Tizard 2002). Lymfocyty s povrchovým IgY se vyvíjejí kolem 21. dne, většinou v době

líhnutí. Následně migrují do sekundárních lymfatických tkání a orgánů jako je slezina, kostní dřeň a lymfatická tkáň v oblasti střeva. Tato migrace pokračuje ještě několik týdnů po vylíhnutí, poté Fabriciova burza ukončí svou činnost a začne atrofovat. Začátek involuce Fabriciovy burzy se liší podle druhu a někdy je podmíněn spíše začátkem kladení vajec, než věkem samotného ptáka (Butcher et al. 1989).

Svá specifika má i načasování vývoje imunoglobulinové diverzifikace. U savců probíhá po celý život. Na rozdíl od toho diverzita ptačích progenitorových B-buněk u kuřat vzniká pouze mezi 10. a 15. dnem embryonálního vývoje a je stejná po celý zbytek života ptáka. V tomto období vznikne až 10^6 různých variant imunoglobulinů; v porovnání s repertoárem savčích Ig je to o řád méně než např. u myši (McCormack et al. 1991).

3.5.2 Obecná struktura imunoglobulinu

Proteiny známé jako imunoglobuliny, spojené se specifickou protilátkovou odpovědí, jsou charakteristicky přítomny pouze u obratlovců (Higgins a Warr 1993). Vyskytují se volně v tělních tekutinách jako je krevní sérum nebo žluč, ale také membránově vázané na povrch B a T lymfocytů, kde tvoří jednu ze součástí lymfocytárních receptorů BCR a TCR.

Imunoglobuliny jsou tvořeny vždy dvěma těžkými řetězci H (dle angl. **heavy**), které jsou navzájem spojeny pomocí disulfidických můstků, a dvěma lehkými řetězci L (dle angl. **light**). Ke každému těžkému řetězci je připojen jeden lehký řetězec. Těžké řetězce jsou tvořeny několika (většinou 4, někdy 5) konstantními doménami. Lehké řetězce sestávají ze dvou imunoglobulinových domén. Variabilní domény lehkých a těžkých řetězců dohromady tvoří vazebné místo pro antigen. Obecná struktura imunoglobulinu je zobrazena na obrázku 1.

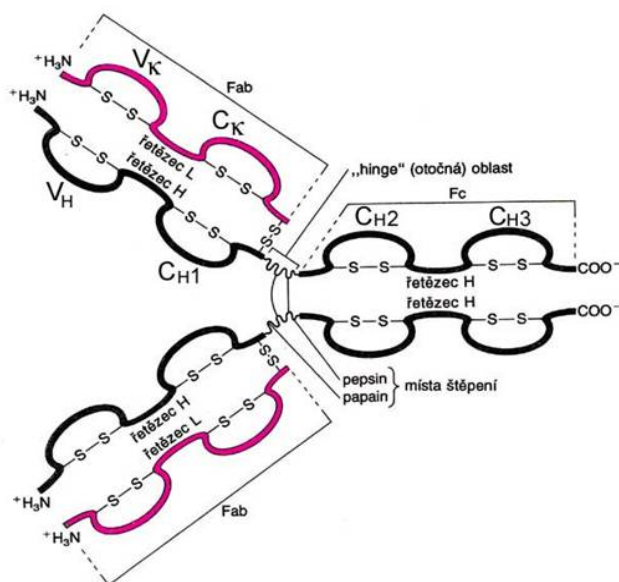
Různorodost vazebných míst pro antigen je zaručena tzv. V(D)J kombinací. Těžký řetězec i lehký řetězec imunoglobulinů se skládají z několika druhů genových segmentů. Vazebná oblast se vytváří postupným přeskupením a výběrem variabilních (V_H), diverzifikačních (D_H), spojovacích (J_H) a konstantních úseků (C). V procesu přeskupování dochází k vyštěpování nejprve mezi náhodnými úseky D-J, následně mezi některým segmentem V a segmentem DJ. Celou konstantní část imunoglobulinového řetězce kódují C segmenty.

Struktura genových komplexů, které kódují lehký řetězec, je jednodušší. Neobsahuje D segmenty a skládá se z menšího počtu V_L a J_L segmentů. (Hořejší a Bartůňková 2009, Nei et al. 1997)

3.5.3 Ptačí imunoglobuliny

Primární repertoár ptačích protilátek (zkoumáno na kuřatech) je generován procesem somatické genové konverze. Na lehkém řetězci je jedinečný V_L segment, který prošel procesem přeskupení, a k němu přidružený J_L segment. Pro tvorbu všech lehkých řetězců B-lymfocytů jsou použity ty samé V_L a J_L segmenty (Reynaud et al. 1987). Variabilita lehkých řetězců vzniklá procesem genového přeskupení je tak velmi nízká. Navíc, na rozdíl od primátů a hlodavců, kteří mají dva typy lehkých řetězců κ a λ , u kuřat nalézáme pouze jeden lokus pro lehký řetězec homologní s genem pro lidský lehký řetězec λ . Nachází se na chromozomu 15 (Ratcliffe 2006).

Podobně vzniká variabilita na těžkém řetězci, kde jsou jedny unikátní V_H a J_H genové segmenty, které jsou použity u všech B-lymfocytů, a kolem 15 funkčních D_H segmentů (Reynaud et al. 1989), které se však ve variabilitě příliš neliší (Reynaud et al. 1991).

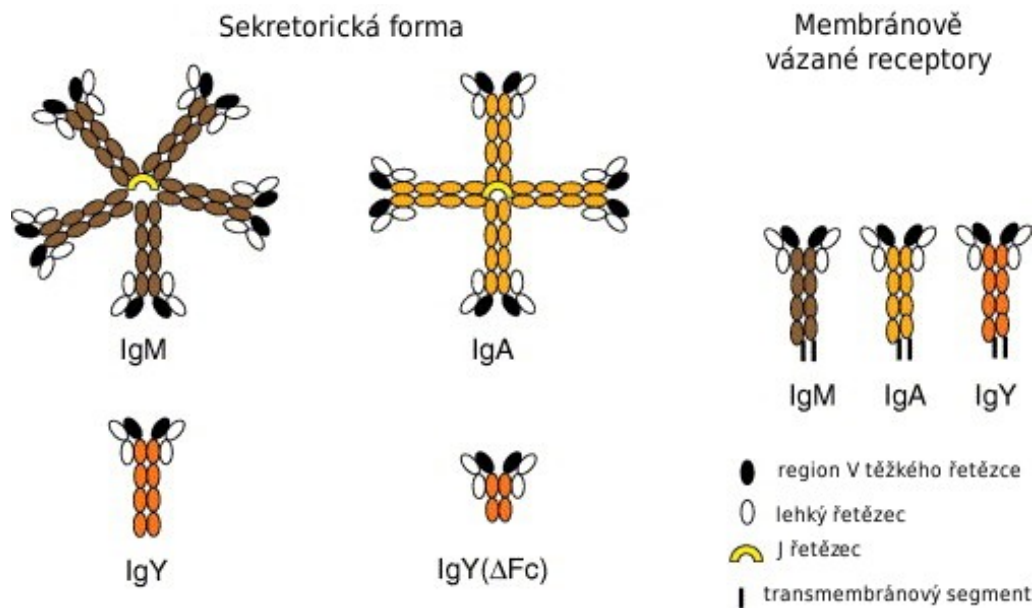


Obrázek 1: Obecná struktura imunoglobulinu; V_H – variabilní doména těžkého řetězce; V_K – variabilní doména lehkého řetězce κ ; C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} – konstantní domény 1,2,3 těžkého řetězce; C_K – konstantní doména lehkého řetězce κ ; **Fab** – Fab fragment obsahující vazebné místo pro antigen; **Fc** – Fc fragment (převzato z <http://oldweb.izip.cz/ds3/hypertext/JVAJR.htm>).

3.5.4 Typy ptačích imunoglobulinů

U ptáků se můžeme setkat s 3 třídami imunoglobulinů. Jsou to IgA, IgM a IgY. Existují jak v solubilní formě, tak jako membránově vázané na povrchu B-lymfocytů. Jednotlivé typy imunoglobulinů jsou vyobrazeny na obrázku 2.

Většina informací týkající se jednotlivých tříd protilátek byla zjištěna na modelovém organismu kur domácí (*Gallus gallus f. domestica*).



Obrázek 2: Typy ptačích imunoglobulinů (upraveno dle Lundquist et al. 2006).

3.5.4.1 IgA

Ptačí IgA má obdobnou funkci i strukturu jakou nalézáme u této třídy imunoglobulinů u savců. Jeho evoluční prekurzor není znám. Je produkován hlavně v difúzní lymfatické tkáni žlučníku a horní oblasti tenkého střeva, proto ho nalézáme ve vysoké koncentraci ve žluči a trávicích sekretech (střevních šťávách) (Tizard 2002). Je asociován se sekretorickou komponentou (SC) (Watanabe et al 1975), se kterou tvoří dohromady komplex sekretorického IgA (SIgA). SC je tvořena extracelulárním fragmentem polymerického imunoglobulinového receptoru (pIgR), který na svém povrchu syntetizují epiteliálních buňky mukózy. Díky němu jsou IgA transportovány skrz epiteliální buňky a sekretovány do lumen orgánů (Solarí a Kraehenbuhl 1985). Na apikálním povrchu je pIgR proteolyticky rozštěpen a společně s ligandem se uvolní velký fragment, známý jako SC.

Tato třída imunoglobulinu se vyskytuje v séru kuřat v koncentraci 0,3 mg/ml a ve žluči v koncentraci 2-3 mg/ml (Ratcliffe 2006). Není známa přesná struktura tohoto Ig polymeru, ale podle výzkumu provedených Magor et. al (1998) se zdá, že s největší pravděpodobností tvoří tetramer. To potvrzuje i sekvence genu pro pIgR, která ukazuje, že, na rozdíl od savců, obsahuje jen 4 Ig-like domény (Wieland et al. 2004). Polymerní formy IgA jsou spojeny pomocí J řetězce, který identifikovali u kuřat Kobayashi et al. (1973). Produkce IgA je opožděná až o 30 dnů oproti produkci IgY (Ng a Higgins 1986).

V minulosti byl u kachen popsán imunoglobulin IgX, který byl detekován ve žluči. Jak ale zjistili Magor et al. (1998), jedná se o kachní homolog ke kuřecímu IgA.

3.5.4.2 IgM

Jedná se o třídu imunoglobulinů, která se objevuje během ontogenetického vývoje ptáků jako první. IgM je strukturně a funkčně homologický k savčímu IgM. Většinou existuje ve formě sestávající z pěti podjednotek spojených J řetězcem, tedy jako pentamer. Objevila se domněnka, že u kachen se tento imunoglobulin vyskytuje ve formě tetramerů, jak podle molekulové hmotnosti usoudili Ng and Higgins (1986) (800 kDa oproti 890 kDa ve žluči). Při porovnání molekulové velikosti kuřecích a kachních IgM s tetramerní strukturou IgM u kostnatých ryb se však zdá být pravděpodobné, že jsou oba pentamerní (Lundqvist et al. 2006).

Výjimečně můžeme IgM nalézt i ve formě monomerů. Ve velmi malém množství je obsažen ve vaječném žloutku a v séru čerstvě vylíhnutých kuřat (Higgins 1975 dle Tizard 2002). V porovnání s dalším, níže popsaným typem imunoglobulinu IgY, je IgM multivalentní. Má až 10 vazebných míst pro antigen a při porovnání v aglutinačním testu vychází jako více účinný (Tizard 2002). Tento imunoglobulin je přítomen v séru kuřat v koncentraci 1,3 mg/ml (Leslie and Clem 1970) a jedná se první imunoglobulin objevující se v počáteční fázi protilátkové odpovědi (Ratcliffe 2006).

3.5.4.3 IgY

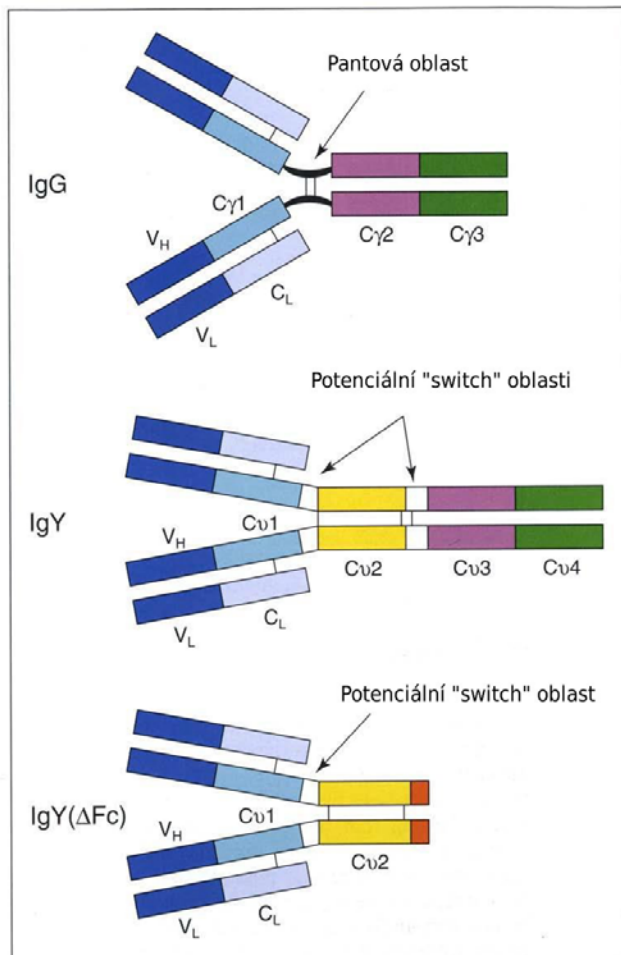
Tento imunoglobulin byl dlouhá léta vědeckou veřejností označován jako IgG. Posléze byla zjištěna strukturní odlišnost mezi savčím IgG a tímto typem protilátky, a proto byl pro tento ptačí imunoglobulin zvolen název IgY (Leslie a Clem 1969). IgY můžeme krom ptáků nalézt i u dalších evolučně starších skupin obratlovců jako jsou ryby, obojživelníci a plazi (Tizard 2002).

U některých ptačích druhů (kachny a husy) se vyskytuje ve dvou izoformách, které byly dříve označovány jako 7,8S IgG (dnes IgY) a 5,7S IgG (dnes IgY Δ Fc). Isoforma IgY Δ Fc nemá C3 a C4 konstantní doménu a chybí jí funkční Fc oblast (Higgins a Warr 1993). Jedná se o evoluční prekurzor savčích imunoglobulinů třídy IgG a IgE, jak podle strukturální analýzy potvrzují Taylor et al. (2009).

Porovnání strukturních odlišností savčího IgG a ptačího IgY a IgY Δ Fc je vidět na obrázku 3. Hlavní rozdíl spočívá v rozdílném počtu konstantních domén těžkého řetězce. IgY obsahuje 4, oproti 3 doménám savčího IgG (Leslie and Clem 1969).

V séru kuřat se IgY obvykle vyskytuje v koncentraci 5,0 - 15 mg/ml (Ratcliffe 2006), izoformu IgY Δ Fc nacházíme v séru kachen v koncentraci 1-3 mg/ml (Lundqvist et al. 2006). Bylo zjištěno, že v porovnání se savčími IgG, které plní obdobnou funkci jako IgY, dokáží

kuří IgY reagovat s více epitopy na antigeních strukturách, než savčí imunoglobuliny (Svendsen et al. 1996), proto se začínají využívat v imunodiagnostice a imunoterapii (Dias da Silva a Tambourgi 2010). Gallagher a Voss (1970) učinili pozorování, že vysoká koncentrace soli a nízké pH (<5,0) má vliv na sterické uspořádání Fab ramen ptačího IgY. Přizpůsobuje jejich tvar a napomáhá tvořit funkční bivalenty (dle Tizzard 2002).



Obrázek 3: Srovnání strukturálních odlišností savčího IgG, ptačího IgY a kachního IgY Δ Fc; V_H – variabilní doména těžkého řetězce; V_L – variabilní doména lehkého řetězce; C_L – konstantní doména lehkého řetězce; $C\gamma_1$, $C\gamma_2$, $C\gamma_3$ – konstantní domény 1,2,3 těžkého řetězce γ ; $C\gamma_1$, $C\gamma_2$, $C\gamma_3$, $C\gamma_4$ – konstantní domény 1,2,3,4 těžkého řetězce γ (upraveno dle Warr et al. 1995).

3.5.5 Průběh ptačí humorální odpovědi

Základní rysy ptačí protilátkové odpovědi jsou shodné s mechanismy, které známe od savců. Během primární imunitní reakce se jako první objevují imunoglobuliny IgM. Jak zaznamenal Higgins (1975), IgM jsou detekovatelné již 72 hodin po inokulaci antigenu (citace dle Tizzard et al. 2002). Jedná se však o protilátky s krátkou životností (1,7 dne) (Leslie a Clem 1970), a proto nejvyšší hladiny IgM byly zaznamenány mezi 4. a 8. dnem po inokulaci antigenu, následně hladina opět klesla (Higgins 1975 dle Tizzard et al. 2002). Produkce IgM je vystřídána IgY. Životnost IgY změřená Leslie a Clem (1970) činí 4,1 dne.

IgA je obsažen v různých sekretech (např. žluč) a je produkován i povrchy sliznic, kde tvoří významnou ochranu proti patogenům. Jeho hladina vzrůstá, pokud se pták setká s patogenem invadujícím tyto tkáně. Střevní reakce se může projevit i zvýšením koncentrace sérového IgA (Tizzard et al. 2002).

Mast a Goddeeris 1999 popsali odlišnosti humorální imunitní odpovědi kuřat podle věku, kdy se setkala s antigenem. Kuřata imunizovali pomocí BSA před vylíhnutím, dále v 1, 7 a 12 dnech věku a sledovali tvorbu specifických IgM a IgY. Odpověď byla hodnocena 10 dnů po imunizaci. Kuřata imunizovaná ve věku 12 dnů vykazovala normální průběh IgM a IgY odpovědi, u kuřat imunizovaných 7. den byla právě detekovatelná a u kuřat imunizovaných před vylíhnutím a první den po vylíhnutí nebyla vůbec zaznamenána.

3.6 Imunitní odpověď kachen

Stejně jako existují rozdíly v protilátkové odpovědi mezi jednotlivými druhy savců, můžeme je pozorovat i u ptáků. Nejčastěji volí výzkumníci jako modelové organismy hospodářsky významné druhy jako kur, dále pak křepelky, bažanty, krocany, různá plemena holubů, méně často vrubozobé ptáky jako husy a kachny. Přesto lze najít v literárních pramenech několik specifík vztahujících se výhradně k rozvoji protilátkové imunity právě u kachen, ať už domácích či divokých.

Mezi specifika odlišující kachny od ostatních ptačích druhů patří přítomnost lymfatických uzlin, které například u kura domácího úplně chybějí (Fajnik et al. 2003 dle Lundqvist et al. 2006).

Další odlišností je také přítomnost dvou izoform sekreterického IgY (Higgins and Warr 1993). Zkrácená izoforma IgY Δ Fc je produkována na základě alternativního splicingu mRNA těžkého řetězce (Magor et al. 1994). V séru se vyskytují v poměru 3:5 (IgY : IgY Δ Fc), ale zkrácená izoforma IgY Δ Fc se obvykle objeví až později v průběhu imunitní odpovědi (Liu a Higgins 1990).

Této zkrácené izoformě chybí funkční Fc region, není tudíž zřejmé, z jakého důvodu je produkována (Tizzard et al. 2002). Jak uvedl Grey (1967), forma IgY Δ Fc nebyla schopna vázat komplement. Také na rozdíl od IgY nebyla schopna vyvolat pasivní kožní anafylaxi. Role této izoformy zatím nebyla systematicky zkoumána, je možné, že kachní imunitní odpověď je větší měrou závislá na neadaptivních imunitních složkách (Lundquist et al. 2006). Další vysvětlení nabízejí Warr et al. (1995), podle nichž byla zkrácená forma během

evolučního vývoje tolerována, protože na rozdíl od kompletní IgY nezpůsobuje anafylaxi a s ní poškození citlivých tkání samotného hostitele.

Liu a Higgins v roce 1990 provedli výzkum, v kterém sledovali u kachňat změny hladiny protilátek IgY, IgY Δ Fc a IgM. U čerstvě vylíhnutých kachňat byla nalézána pouze izoforma IgY, která je přítomna už ve žloutkovém vajíčku a je původem z mateřského organismu. Již po 5 dnech začala hladina mateřských IgY v séru klesat, na minimální úroveň se dostala kolem 14. dne věku. Kolem 20. dne od vylíhnutí je možné sledovat postupné zvyšování hladiny obou izoform IgY i IgM. Hodnot typických pro dospělé kachny dosáhla zkoumaná kachňata ve věku 71 dnů. Podobné výsledky uvádí i Ng a Higgins (1986), kteří zjistili, že koncentrace IgM je u čerstvě vylíhnutých kachen velmi nízká, ale už kolem 40. dne věku dosahuje hodnot nalézáných v séru dospělých kachen.

I u kachen nalézáme třídu imunoglobulinu IgA spjatou se slizniční imunitou. Ve srovnání s jinými druhy ptáků je ale exprese této třídy opožděna. Ještě 25. den po vylíhnutí není IgA detekovatelné, hodnot charakteristických pro adultní kachny dosahuje 55. - 60. den věku (Ng a Higgins 1986). mRNA pro podjednotku α protilátek (sledováno na genu pro C4 konstantní doménu) se prvně objevuje kolem 14. dne. Nejvyšší hladiny exprese je dosaženo v období mezi 35. – 50. dnem. IgA se vyskytuje v lymfatických orgánech a nejvíce abundantní je v dýchací, rozmnožovací a trávicí soustavě (Magor et al. 1998).

V životním cyklu námi studovaných ptačích schistosom *T. regenti* a *T. szidati* figurují právě kachny jako definitivní hostitelé. Zatím byla imunitní odpověď proti těmto parazitům zkoumána pouze u nespecifických hostitelů.

3.7 Imunitní odpověď proti *T. regenti* a *T. szidati* u nespecifických hostitelů

Imunitní odpověď myší, která se rozvíjí po infekci ptačími schistosomami, se nejprve projevuje na kůži vznikem cercáriové dermatitidy. Tato Th2 asociovaná hypersenzitivní kožní reakce (časná reakce I. typu) (Kouřilová et al. 2004) se objevuje po opakovaném průniku cercárií ptačích schistosom kůží nespecifického hostitele. V případě lidské cercáriové dermatitidy jsou za ni nejčastěji zodpovědné schistosomy rodu *Trichobilharzia* (Horák et al. 2002), které opakovaně penetrují do kůže koupajících se lidí. U některých senzitivních jedinců může dojít nejen k vzniku svědivé vyrážky, ale i k otoku lymfatických uzlin a vzniku horečky (Chamot et al. 1998).

Kolem místa průniku cercárií můžeme pozorovat otok (Horák et al. 2002). Ten je způsoben histaminem, který produkují mastocyty a makrofágy (van Loveren et al. 1997 citace dle Kouřilová et al. 2004). V reakci na průnik cercárií jsou do místa penetrace atrahovány i neutrofilny, eozinofily, makrofágy, CD4+ T lymfocyty a mastocyty (Kouřilová et al. 2004).

Imunitní reakce se liší podle toho, zda se jedná o primoinfekci, nebo zda se jedná o opakované setkání s penetrujícími ptačími schistosomami.

Při primoinfekcích mívá imunitní odpověď lehčí průběh. Jak popsala Kouřilová et al. (2004), při první infekci cercáriemi *T. regenti* dochází v prvních hodinách po penetraci k zánětlivým reakcím, které jsou provázeny uvolňováním IL-1 β , IL-6 a IL-12p40. Byla pozorována smíšená Th1/Th2 cytokinová odpověď.

Při opakovaných infekcích myší cercáriemi *T. regenti*, 4x v intervalu 10 dní, se objevila jasná Th2 polarizovaná cytokinová odpověď s dominantní sekrecí IL-4 a IL-5. Dále se v reakci na několikanásobné infekce zvýšila i tvorba antigeně specifických sérových protilátek IgM, IgG1 a IgE (Lichtenbergová et al. 2008)

Imunitní reakce je vedena bezpochyby i proti dalším stádiím, se kterými se dostává do styku definitivní hostitel. K zacílení významných antigenů byly použity metody imunofluorescence a ultrastrukturální imunocytochemie. Jako primární protilátky autoři použili séra z opakovaně infikovaných myší *T. regenti*. Antigeny, s nimiž séra reagovala, se necházely v penetračních žlázách, glykokalyxu a tegumentu cercárií, v tegumentu dospělců a schistosomul. Velmi výrazně byla rozpoznávána subtegumentální tělíska. Poté, co cercárie odvrhly glykokalyx, se značně snížila jejich povrchová reaktivita. Ta se dále snižovala i v průběhu dalšího vývoje v schistosomula.

Na základě zjištění, že se antigenní reaktivita schistosomul získaných pitvou ze specifických hostitelů (kachny) a *in vitro* kultivovaných schistosomul se séry myší opakovaně exponovaných cercáriím *T. regenti* výrazně neliší, autoři odvozují, že schopnost *T. regenti* snížit během ontogenetického vývoje povrchovou imunoreaktivitu je nezávislá na typu definitivního hostitele (Chanová et al. 2012).

3.8 Nejvýznamnější antigeny schistosom

Jako antigeny jsou obecně označovány látky (molekuly), které jsou při setkání se složkami imunitního systému rozpoznány, a na které zareaguje imunitní systém tvorbou specifických protilátek, nebo specifické buněčné odpovědi. Tělo parazitů obsahuje řadu proteinů a sacharidů, na které dokáže imunitní systém s různou silou a specifitou zareagovat.

V životním cyklu parazitů se objevují různá vývojová stadia, která se mohou lišit nejen morfologicky a strukturně, ale také spektrem antigenů, které jsou daným stadiem parazita exprimovány.

Antigeny parazitů můžeme obecně rozdělit na dva typy, sekreční a membránově vázané. Sekreční antigeny jsou uvolňovány z parazita do prostředí. Naproti tomu vázané antigeny jsou zakotveny na jeho povrchu. Dále můžeme vyčlenit antigeny somatické, které tvoří strukturní a cytoplazmatickou složku v těle parazita.

Některé struktury, jako bakteriální peptidoglykan, jsou rozeznávány imunitními systémy napříč spektrem hostitelů. Jak se ukazuje na příkladu lidských schistosom, existují některé antigeny objevující se opakovaně u většiny zkoumaných druhů. Jedná se nejspíše o konzervované struktury, které by mohly působit jako imunogeny i v případě ptačích schistosom. V následující kapitole se zaměřím na nejvýznamnější z nich.

3.8.1 Antigeny lidských schistosom

Antigenům lidských schistosom je věnována velká pozornost z důvodu hledání účinné vakcíny a markerů spolehlivě indikujících přítomnost onemocnění. Praktickým důvodem tohoto výzkumu je snižující se citlivost a možný vznik rezistence na nejčastěji používané léčivo, praziquantel (PZQ) (Doenhoff a Pica-Mattocchia 2006). Požadavky kladené na komerčně vyráběnou vakcínu shrnují Loukas et al. (2006). Vakcína by měla navozovat tvorbu neutralizujících protilátek, které by blokovaly klíčové parazitární proteiny, podílející se např. na trávení krve nebo na migraci tkáněmi hostitele. Během historie hledání bylo nalezeno velké množství antigenů, které byly s větším či menším úspěchem testovány.

Antigeny schistosom cirkulující v séru a moči pacientů se využívají při imunologické diagnostice schistosomózy. V případě *schistosomiasis mansoni* protilátky pacienta reagující s antigenem Sm22,3 obsaženým ve frakci dospělých červů detekují s 89% citlivostí akutní fázi schistosomózy (Makarova et al. 2003). Stejně tak přítomnost protilátek proti Sm31 (cathepsin B) s 98% úspěšností odhalí jedince, u kterých lze koprologickou analýzou detekovat ve stolici vejce parazita (Ruppel et al. 1990).

Carvalho et al. (2011) uvádí 6 antigenů, které jsou vhodnými kandidáty při diagnostice schistosomózy způsobené druhem *S. mansoni*. Jedná se o Sm200; Sm12,8; Sm43,5; Sm127,9; Sm18,9 (cytochrom oxidáza) a Sm16,5 (cytochrom oxidáza). Byly vybrány pro svou malou podobnost s lidskými proteiny a proteiny jiných obvyklých druhů lidských helmintů. Podrobně jsem se problematikou antigenů schistosom a imunitní odpovědi vedenou proti nim zabývala ve své bakalářské práci (Turjanicová 2009).

Nejvýznamnější antigeny, u kterých se předpokládá jejich možné využití při výrobě vakcín proti lidské schistosomóze, jsou uvedeny v tabulce 1. Podrobněji se zde věnují glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáze a trioso-fosfát-izomeráze tedy antigenům, které jsou rozpoznávány i protilátkami experimentálně nakažených myši a také lidí, kteří prodělali cercáriovou dermatitidu po expozici cercáriím ptačích schistosom. Dalšími antigeny, kterým věnují více prostoru jsou cathepsiny B1 a B2, které jsme měli k dispozici v rekombinantní formě a byly tak vhodnými kandidáty k otestování jejich imunoreaktivity.

Tabulka 1: Významné kandidátní antigeny pro produkci vakcín proti lidské *schistosomiasis mansoni* (informace převzaty z El Ridi et al. 1998, McManus a Loukas 2008, McWilliam et al. 2012)

	Antigen	Zkratka	Stadium	Funkce Lokalizace
1	Tetraspanin-2	SmTSP-2	Schistosomula, dospělci	Integrální membránový protein
2	Gutathion S-transferáza	Sm28GST	Všechna stadia krom nedozrálých vajec	Detoxifikační enzym, lokalizovaný v tegumentu, v parenchymu, v epitelu jícnu a genitáliích
3	Irradiation asociated vaccine antigen-5	IrV-5	Všechna stadia	Tegumentální protein, v penetračních žlázách
4	Paramyosin	Sm97/Sj97	Cerkárie, schistosomula, dospělci	Svalový protein, v tegumentu a pod ním ležící svalovině
5	Tetraspaninový membránový protein	Sm23/Sj23	Všechna stadia	Membránový a střevní protein
6	Calpain	Sm-p80	Všechna stadia	Ca ²⁺ dependentní cysteinová peptidáza, tegument a pod ním ležící svalovina
7	Cytolytická super oxid dismutáza	CT-SOD(Sm)	Schistosomula, dospělci	Tegument a střevní epitel
8	Tegumentální antigen (29 kDa)	Sm29	Schistosomula, dospělci	Tegumentální membránový protein
9	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	GAPDH	Všechna stadia	Metabolický enzym, povrchový protein
10	Trioso-fosfát izomeráza	TPI	Všechna stadia	Glykolytický enzym, u všech stadií na povrchu, u dospělců navíc ve svalech a střevě

3.8.1.1 GAPDH (glyceraldehyd-3 fosfát dehydrogenáza)

Dessein et al. (1988) zjistili, že séra získaná z přirozeně rezistentních pacientů (brazílské děti), kteří žijí v endemických oblastech s výskytem schistosomózy, rozpoznávají 6 larválních povrchových antigenů, mezi nimi i 37 kDa velký protein, který byl později na základě 73% shody v aminokyselinové sekvenci s lidskou GAPDH charakterizován jako glykolytický enzym glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (Goudot - Crozel et al. 1989). V séru přirozeně rezistentních pacientů byla tato molekula rozpoznávána IgG1, IgG3 a IgA protilátkami. Také vyvolává sekreci IL-4 a IFN- γ a proliferaci lymfocytů u jedinců se silnou produkcí vajec (El Ridi et al. 2001).

Na základě publikované sekvence GAPDH bylo vybráno 6 peptidů, A, B1, B, C, D a E, které měly nejnižší homologie k lidskému GAPDH. Tyto peptidy navázané na D-MAP (dipeptidic multiple antigen peptide) byly použity k imunizaci myši BALB/c. Imunizace pomocí D-MAP s peptidy A a B vyvolala silnou humorální odpověď a byla spojena se snížením zátěže způsobené kladením vajec. Tento účinek byl vyvolán převážně díky peptidu B. Naproti tomu imunizace pomocí D-MAP B1-C a MAP D-E nevyvolala statisticky významnou ochranu proti infekci (El Ridi et al. 2004).

Dle naznačených výsledků experimentů se jedná o možného kandidáta na výrobu vakcíny proti schistosomóze.

3.8.1.2 Trioso – fosfát – izomeráza (TPI)

Jedná se o enzym, který se podílí na glykolýze. Jeho velkou předností jako kandidáta na vakcínu je, že je obsažen ve všech buňkách všech vývojových stadií schistosom, proto bylo zvažováno jeho použití při tvorbě vakcíny proti *S. japonicum* a *S. mansoni* (McManus a Loukas 2008). TPI byla lokalizována na povrchu nově transformovaných schistosomul a dále ve střevě, svalech a tegumentu dospělých červů ve studii Harn et al. (1992).

Jedná se o 28 kDa velký antigen, který je vysoce homologní k jiným eukaryotickým TPI. Na základě cDNA byla připravena jeho rekombinantní forma, která byla rozpoznávána specifickou monoklonální protilátkou M1. Aktivita této rekombinantní TPI byla srovnatelná se specifickou aktivitou TPI kvasinek i králíků (Shoemaker et al 1992).

V případě TPI *S. mansoni* byla u myši zaznamenána polarizace k Th1 imunitní odpovědi, založená na zvýšení IL-2 a IFN- γ (Reynolds et al. 1994). Při imunizaci naivních prasat S_JCTPI DNA (DNA plazmidem obsahujícím S_JTPI), a S_JCTPI DNA s přidáním IL-12 (3 \times v intervalu 21 dní), který byl injekčně vpraven do svalů pokusných zvířat, byla

zaznamenána o 48% nižší zátěž vyplývající z kladení vajec a velikost granulomů byla snížena o 42% (Zhu et al. 2006).

3.8.1.3 Cathepsin B1 (CB1)

Antigen Sm31 nalezený u *S. mansoni* byl charakterizován jako cathepsin B (Klinkert et al. 1989). Jedná se o střevní proteázu, která se účastní trávení krevních proteinů (Caffrey et al. 2004). Vyskytuje se u červů ve stadiu schistosomula, dospělce (Dalton et al. 1996), ale také byl na základě imunolokalizace pozorován v postacetabulárních žlázách (Dalton et al. 1997), v slepém střevě a protonefridiích cercárií (Skelly and Shoemaker 2001).

Na imunoblotu byla testována séra pacientů s laboratorně potvrzenou schistosomózou (*S. mansoni*) a s podezřením na prodělanou schistosomózu. Byla testována imunoreaktivita homogenátu dospělých červů. Všechna séra pacientů se schistosomózou a několik sér ze skupiny v podezření na schistosomózu reagovala s 31 kDa antigenem. Jako kontrola byla použita séra z pacientů s jinými parazitárními chorobami, z nichž ani jedno tento antigen nerozpoznávalo (Ruppel et al. 1985). Byla zvažována možnost použít SmCB1 jako antigen, na základě kterého by mohla být vytvořena vakcína (Abdulla et al. 2007) či jako součást diagnostického kitu pro laboratorní diagnostiku schistosomóz (de Oliveira et al. 2008).

Došlo již i k přípravě rekombinantní formy tohoto antigenu. Cathepsin B1 rekombinantně připravený v expresním systému *Pichia pastoris* byl ale nespecificky glykosylován a docházelo k falešně pozitivním reakcím s IgG jak na imunoblotu, tak při ELISA testech. Tento problém vyřešili Stack et al. (2005) enzymatickou deglykosylací rekombinantního proteinu, séra zdravých pacientů poté s rSmCB1 nereagovala.

Cathepsin B2 nalezený u *S. mansoni* se vyskytuje v parenchymu dospělců u obou pohlaví a v tegumentálních tuberkulech dospělých samců. Caffrey et al. (2002) se domnívají, že zastává ochrannou funkci proti imunitnímu systému, podílí se na trávení endocytózou přijatých proteinů a účastní se přeměny tegumentu. Imunitní reakce proti tomuto antigenu zatím nebyla testována.

Při zkoumání přítomnosti těchto peptidáz u *T. regenti* bylo zjištěno, že se cathepsin B1 vyskytuje u tohoto druhu v 6 izoformách. Pomocí polyklonálních protilátek byl lokalizován ve střevě schistosomul. Předpokládá se, že se podílí na hydrolýze přijatých proteinů. Připravené rekombinantní izoformy TrCB1.1 a TrCB1.4 byly schopny štěpit krom jiných substrátů i myelin basic protein. Autoři se domnívají, že se tato schopnost vyvinula jako adaptace na unikátní migrační cestu schistosomul nervovou soustavou do nazální dutiny, do místa definitivní lokalizace (Dvořák et al. 2005).

Dolečková et al. (2009) identifikovali u *T. regenti* další cathepsin, tentokrát v penetračních žlázách cercárií. Na základě téměř 80% podobnosti aminokyselinové sekvence s CB2 u *S. mansoni* a *S. japonicum* byl označen jako TrCB2. Dle místa lokalizace CB2 a také díky jeho schopnosti štěpit složky obsažené v kůži, v séru a v nervové tkáni, se soudí, že má velký podíl na penetraci cercárií do definitivního hostitele. Rekombinantní protein měl velikost 32 kDa.

Během ontogeneze *T. regenti* dochází k odlišné expresi CB1 a CB2. Dolečková et al. 2010 provedli real-time PCR analýzu cDNA izolované z různých vývojových stadií *T. regenti* (vajíčka, miracidia, sporocysty, cercárie, schistosomula, dospělci) a zmapovali odlišnosti v expresních profilech obou cathepsinů. Zvýšená exprese TrCB1.1 byla pozorována ve stadiích schistosomul a dospělců. Exprese TrCB2 byla v porovnání s TrCB1.1 vyšší u všech vývojových stadií. Nejvyšší byla opět ve stadiu schistosomula a dospěléce. Podle autorů se zdá, že relativně vysoká exprese CB2 u sporocyst, v nichž se vyvíjejí cercárie, naznačuje důležitou roli CB2 při průniku cercárií do hostitele. Jak vyplývá z výše uvedených údajů, s cathepsiny CB1 a CB2 se setkávají všichni infikovaní hostitelé. Tudíž by se proti nim mohla vyvinout antigeně specifická protilátková odpověď.

3.8.2 Antigeny *T. regenti*

Lichtenbergová et al. (2008) zjistili pomocí ELISA testů, že séra získaná z pacientů, u kterých byla potvrzena cercáriová dermatitida, obsahovala specifické imunoglobuliny IgG proti TrH_C (homogenát z cercárií *T. regenti*) i proti TrE/S (cercáriální exkrečně/sekreční produkty) antigenům. Podobně reagovala i séra z experimentálně reinfikovaných myší. U nich se vytvořily antigen specifické IgM a IgG1 protilátky a zvýšila se celková produkce IgE .

Lidské i myší protilátky (IgE a IgG1) specificky rozpoznávaly 34 kDa velkou molekulu na Western blotech (Lichtenbergová et al. 2008). Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že se jedná o glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenázu. Dále byla zaznamenána silná reakce IgG1 a IgE proti proteinu o molekulové hmotnosti 25kDa, který byl identifikován jako trioso-fosfát izomeráza (Kašný et al. 2009).

Velmi imunogenní a tudíž rozpoznávaný protilátkami je i povrch cercárií a schistosomul *T. regenti*. Glykokalyx cercárií byl rozpoznáván jak protilátkami lidských pacientů, tak i protilátkami ze sér myší experimentálně nakažených druhů *S. mansoni*, *T. regenti* a *T. szidati* (Kouřilová et al. 2002).

Imunogenicitu glykokalyxu cercárií a tegumentu schistosomul *T. szidati* zkoumali Horák et al. 1998b. V experimentu byla použita séra myší opakovaně (4×) experimentálně

infikovaných *T. szidati* a séra pacientů s cercáriovou dermatitidou. IgG a totální Ig obsažené v sérech infikovaných myší silně rozpoznávaly povrch cercárií a *in vitro* transformovaných schistosomul. IgM a IgA se téměř nevázaly, byla zaznamenána pouze slabá reakce IgM z odběru po 2. nákaze s povrchem cercárií a *in vitro* schistosomul. Také u lidských sér nebyla zaznamenána téměř žádná odpověď IgA, IgM a IgE, na rozdíl od toho totální Ig a IgG se specificky vázaly na povrch cercárií a *in vitro* transformovaných schistosomul.

4 Materiál a metodika:

4.1 Složení použitých pufrů:

PBS pH 7,2 - (Používán při imunoblotu a ELISA)

0,1 M fosfátový pufr pH 7,2 s obsahem 116 mM NaCl (izotonický)

PBS-T

- 0,1M PBS pH 7,2
- 0,05% Tween (Tween 20, Bio-Rad)
- 0,5% BSA (albumin z bovinního séra, Sigma)

Blokovací pufr na imunoblot a ELISA

- 0,1M PBS – T plus jedna z následujících substancí, dle potřeby
- 0,5% BSA (albumin z bovinního séra, Sigma)
- 5% sušené mléko (Blotting Grade Blocker Non-fat dry milk, Bio-Rad) - imunoblot
- 2% casein (Sigma) - imunoblot
- 3% kozí sérum (Sigma) - ELISA

4.2 Infekce kachen

Při nákaze kachen *Anas platyrhynchos* f. *domestica* bylo postupováno dle metodiky popsané Meuleman et al. (1983). Neopeřená část kachní končetiny byla vystavena po dobu jedné hodiny infekční dávce 2000 cercárií při nákaze druhem *T. regenti* a 3000 cercárií při nákaze druhem *T. szidati*. Kachny byly nakaženy ve věku 7-10 dnů. Při nákaze divokých kachen jsme z důvodu vyššího věku pokusných zvířat (21 dnů a 40 dnů) upravili metodiku. Infekční dávka byla zvýšena na 2500 cercárií - *T. regenti* a 4000 cercárií - *T. szidati*. Po nákaze byly kachny označeny různobarevnými kroužky a umístěny do klecí s dvanáctihodinovým cyklem. Po ukončení pokusu byla pokusná zvířata usmrcena dekapitací.

Do pokusu bylo použito 28 kachen domácích, které byly rozděleny do 4 skupin (A-D), a 15 kachen divokých, které byly opatřeny v líhni Klatovského rybářství (skupiny E a F). Byly získány ve věku 21 dní, do tohoto věku byly drženy v krytých voliérách bez kontaktu s vodou a jinými ptáky. Po celou dobu experimentu byly chovány a dokrmovány v uzavřeném zvěřinci. V každé experimentální skupině byly kachny, které nebyly infikovány a sloužily jako kontrola. K zachycení změny protilátkového profilu byly zvoleny intervaly odběru 7 a 10

dní. Divoké kachny byly zapojeny do experimentů opakované reinfekce (4× po 10 dnech) a infekce ve věku zralosti imunitního systému (≥ 40 dní), kvůli jejich nižší rychlosti růstu a celkově menší dosahované velikosti. Klasické masné plameno domácích kachen roste příliš rychle a nebyly k dispozici dostatečné prostorové kapacity k jejich chovu do věku imunitní zralosti.

4.2.1 Odběry krve, její zpracování a uchování sér

Odběry kachní krve probíhaly z *aa. metatarsales dorsales* bez celkové narkózy pouze při fixaci zvířete. Místo vpichu bylo nejprve dezinfikováno lihem, poté byla céva nabodnuta injekční jehlou a vytékající krev odchyťována do připravené mikrozkušavky. Krvácení bylo zastaveno za použití želatinové houby Gelaspon (Chauvin) a rána byla ošetřena tekutým obvazem ve spreji (Urgo). Bylo odebíráno kolem 1 ml krve od každé z pokusných kachen. Intervaly a četnosti odběrů jsou podrobně popsány v tabulkách 2 a 3. Byla získána i séra z volně žijících divokých kachen při mysliveckém odstřelu v obci Zbiroh na Dvorském rybníce. Nosní sliznice a střeva ulovených kachen byla mikroskopicky vyšetřena na přítomnost ptačích schistosom.

Získaná krev byla inkubována půl hodiny při laboratorní teplotě, aby proběhl proces srážení a následně byla stáčena 5 minut při 7000×g na centrifuze 5415R (Eppendorf). Získané sérum bylo odebráno do čisté označené mikrozkušavky a uchováno před dalším použitím při teplotě -20°C.

Tabulka 2: Přehled experimentálních nákaz domácích kachen

Anas platyrhynchos f. domestica	Infekční dávka (cerkárie)	Počet kachen	Interval odběru	Počet odběrů
T. regenti	2000	2	7 dní	5
		4	7 dní	4
		4	10 dní	4
T. szidati	3000	2	7 dní	5
		2	7 dní	4
		6	10 dní	4
Kontrola (neinfikovaná)	-----	2	7 dní	5
		2	7 dní	4
		4	7 dní	4
	Celkem kachen	28	Celkem odběrů	118

Tabulka 3: Přehled experimentálních nákaz divokých kachen

<i>Anas platyrhynchos</i>	Infekční dávka (cerkárie)	Počet jedinců	Interval odběru	Počet odběrů
Opakované infekce <i>T. regenti</i>	2500	6	10 dní	4
Infekce kachen s plně zralým imunitním systémem <i>T. regenti</i> (≥40 dní)	2500	4	10 dní	5
<i>T. szidati</i>	4000	2	10 dní	4
Kontrola	-----	3	10 dní	4
	Celkem kachen	15	Celkem odběrů	64

4.2.2 Systém značení kachen a odběrů krve

Pro lepší orientaci byl zvolen jednoduchý systém značení kachen zapojených do experimentu. První dvě písmena označují druh trichobilharzie, jímž byla dotyčná kachna infikována. Kachny infikované *T. regenti* jsou označeny písmeny Tr, kachny infikované *T. szidati* nesou označení Ts, neinfikované kontroly jsou označeny jako Ko. Následuje písmeno experimentální skupiny. Ve skupině A a B byla domácím kachnám odebírána séra v 7 denních intervalech, ve skupině C a D byla domácím kachnám odebírána séra v 10 denních intervalech. Skupina E zahrnovala opakovaně infikované divoké kachny, skupina F divoké kachny infikované v době plné imunokompetence. Oběma skupinám E i F byla séra odebírána v 10 denních intervalech. Číslice za označením skupiny slouží k rozlišení jedinců v dané skupině. V případě sér získaných při mysliveckém odstřelu bylo zvoleno označení KD, jako zkratka názvu kachna divoká, číslo odlišuje jednotlivé odstřelené jedince.

4.3 Sběr parazitů na antigen a homogenizace

Nakažení vodní plži (*Lymnea stagnalis* - *T. szidati*; *Radix lagotis* – *T. regenti*) byli vystaveni po dobu několika hodin umělému studenému diodovému osvětlení. Vyloučené cercárie byly slity do koncentračních baněk zakrytých hliníkovou fólií a dalším osvětlením hrdla baňky byly koncentrovány a sebrány do 50 ml centrifugačních zkumavek s víčkem, které byly uloženy na ledu. Poté, co cercárie klesly na dno zkumavky, byly centrifugovány při 4100×g na centrifuze 5804 R (Eppendorf). Celý objem vody byl vyměněn a postup 2× zopakován. Zkoncentrované cercárie s přidaným inhibitorem proteáz Complete Mini EDTA-free (Roche)

(1 tableta na 10 ml), byly přeneseny do čisté 1,5 ml mikrokumavky a uloženy v mrazáku při -20°C.

Po usmrcení kachny dekapitací byla z těla vyjmuta páteř, z které byla vypreparována mícha. Ta byla vložena do čisté Petriho misky s roztokem PBS a byla opatrně roztrhána preparačními jehlami. Uvolněná schistosomula byla sbírána do čisté Petriho misky s PBS. Schistosomula byla podle potřeby 4× až 5× promyta v čistém roztoku PBS, aby byly odstraněny zbytky míchy. Následně byla přemístěna do čisté mikrokumavky a byl k nim přidán inhibitor proteáz Complete Mini EDTA-free (Roche). Takto ošetřená schistosomula byla uchována při teplotě -20°C.

Schistosomula nebo cercárie byly homogenizovány pomocí sonikátoru Vibra Cell™ 72405 (Bioblock Scientific) (4×10s, 10W). Poté byl výsledný homogenát centrifugován (20 min, 13 000g, 1°C). K získanému supernatantu byl přidán inhibitor proteáz Complete Mini EDTA-free (Roche) a následně byl vzorek uchován při teplotě -20°C.

4.4 Měření koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích byla měřena pomocí fluorometru Infinite M200 (TECAN). Měření bylo prováděno pomocí kitu Quant-IT™ Protein Assay Kit (Invitrogen) v 96 jamkových černých mikrotitračních destičkách s plochým dnem (Nunc). K vynesení kalibrační křivky byly použity proteinové standardy v rozmezí 0 – 400 ng/μl, které jsou součástí kitu.

4.5 Deglykosylace

Pro deglykosylaci rekombinantních cathepsinů B1.1 a B2 z *T. regenti* byl použit Native Protein Deglycosylation Kit (Sigma). K 10 μl reakčního pufru byl přidán rekombinantní protein (37,5 μl) a endoglykosidáza F1 z *Elisabethkingia miricola* (2 μl). Deglykosylace probíhala v termobloku 1 hodinu při 37°C. Přečištěné rekombinantní cathepsiny, TrB1.1 ve formě proenzymu a autoaktivovaný TrB2, poskytla Mgr. Hana Dvořáková.

4.6 Biochemické a separační analytické metody

4.6.1 SDS-PAGE Elektroforéza

K separaci homogenátů cercárií a schistosomul *T. regenti* (TrH_C a TrH_S) a *T. szidati* (TsH_C) a cathepsinu CB1.1 a CB2 byla použita elektroforetická cela X Cell Sure Lock™

Mini-Cell (Invitrogen). Dělení proteinů a peptidů probíhalo vertikálně při konstantním napětí 150V (1 gel), nebo 200 V (2 gely).

Pro separaci byly použity 12% dvoujamkové NuPAGE® Bis-Tris Precast gely o tloušťce 1mm (Invitrogen). Vzorčky homogenátu (200-250 µg), TrCB1.1 (10 µg) a TrCB2 (10 µg) byly nanášeny na gel smíchané se vzorkovým pufrům NuPAGE® LSF Sample Buffer (4×) a s redukčním agens NuPAGE® Sample Reducing Agent. Separace probíhala za denaturujících podmínek v elektrodovém pufru NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (for Bis-Tris Gels), ve vnitřní komoře byl přidán do pufru antioxidant NuPAGE® Antioxidant (0,04%), vše dle návodu výrobce. Jako ukazatele molekulové velikosti byly použity markery Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard (Invitrogen), nebo Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad).

4.6.2 Western blot

Proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE byly z gelu přeneseny na PVDF membránu a následně detekovány specifickými protilátkami.

Homogenáty cercárií a schistosomul *T. regenti* (TrH_c a TrH_s) a cercárií *T. szidati* (TsH_c) a TrCB1.1 a TrCB2 byly nejprve separovány pomocí 1D elektroforézy, poté byly proteiny z gelů elektrotransferovány na PVDF membránu Invitrolon™ PVDF Filter Paper Sandwich 0,45µm pore Size (Invitrogen) pomocí Trans – Blot Turbo Transfer system (Bio-Rad), při konstantním proudu 2,5 A po dobu 12 min.

Z PVDF membrány byly odstřiženy proteinové standardy a následně byla membrána reverzibilně obarvena pomocí 0,01% Ponceau S. Po obarvení byla membrána rozměřena na jednotlivé stripy (šíře 3 mm), které byly vloženy do 12 jamkových blotovacích misek. Blokování membrány bylo prováděno pomocí blokačního roztoku po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Následně byly membránové stripy inkubovány za stálého míchání při laboratorní teplotě 1,5 hodiny s kachními séry.

Séra byla ředěna v poměru 1:40 nebo 1:100 v 0,1M PBS - T s 0,5% BSA. Po inkubaci byly membránové stripy promyty 3× po 5 minutách PBS-T. Dále probíhala inkubace se sekundárními protilátkami značenými peroxidázou.

Pro detekci kachních IgY (IgG) byla použita protilátka:

- Peroxidase – Labeled Affinity Purified Antibody To Duck IgG (H+L) (fa. KPL)

Pro detekci kachních IgM byly použity protilátky:

- Polyclonal Antibody to duck IgM (Fc specific) – HRP (fa. Acris Antibodies)

nebo

- GADu/IgM(Fc)/PO immunoconjugate (fa. Nordic Immunology)

Sekundární protilátky byly ředěny v roztoku PBS-T a 0,5% BSA v poměru 1:1000 (anti-IgY) a 1:1000, 1:2000, 1:3000 či 1:4000 (anti-IgM). Inkubace probíhala 1 hodinu za stálého míchání při laboratorní teplotě. Následně byly membránové stripy znovu promyty v PBS-T (3×, 5 min), vyvinuty pomocí substrátového kitu Opti – 4CN™ (Bio-Rad) a skenovány na skeneru GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

Vyhodnocování imunoblotů bylo prováděno v programu Quantity One (Bio-Rad). Data získaná tímto programem byla dále zpracována pomocí statistické metody kontingenčních tabulek a kontingenčních grafů. Byla sledována molekulová velikost antigenů rozpoznávaných v průběhu infekce. Získané výsledky byly porovnávány mezi jednotlivými skupinami navzájem a mezi odběry jednotlivých individuálních kachen. Dále byl mapován trend vývoje produkce jednotlivých tříd protilátek (IgY a IgM).

4.6.3 ELISA

V tomto případě se jednalo o nepřímý sendvičový ELISA test. Antigenicita byla zkoumána u homogenátu cerkárií *T. regenti* (TrH_C) a *T. szidati* (TsH_C). Antigen byl rozředěn v uhličitanovém pufru o pH 9,6 (v koncentraci 6,25 µg na 1ml), napipetován do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky (MaxiSorb, Nunc) a inkubován přes noc při 4°C ve vlhké komůrce. Následně byla destička promyta 3x 150µl, 1 min v PBS-T. Na zablokování nespecifických vazeb byl použit roztok PBS-T s 3% kozím sérem (Sigma). Blokování probíhalo 1 hodinu ve vlhké komůrce za stálého míchání při laboratorní teplotě. Kachní séra (primární protilátky) byla rozředěna v PBS-T v poměru 1:160. Inkubace s primárními protilátkami probíhala 2 hodiny. Sekundární protilátky ((Peroxidase – Labeled Affinity Purified Antibody to Duck IgG (H+L) a Polyclonal Antibody to duck IgM (Fc-specific)) byly rozředěny v PBS-T v poměru 1:500 (anti-IgY) a 1:5000 (anti-IgM). Inkubace se sekundárními protilátkami probíhala 1,5 hodiny. Vizualizace reakce byla provedena pomocí 3,3' 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system for ELISA (Sigma). Reakce byla zastavena přidáním 100µl 1M HCl. Absorbance byla měřena na fluorometru Infinite M 200 (Tecan) při 450 nm. Při každém ELISA experimentu byly všechny reakce prováděny v dubletech, v grafech jsou uvedeny průměry hodnot.

4.7 Klonování a exprese trioso - fosfát izomerázy *T. szidati* (TsTPI)

Lichtenbergová et al. (2008) uvedli, že protilátky IgG1 a IgE z sér myši opakovaně reinfikovaných *T. regenti* a sér pacientů s prodělanou cerkáriovou dermatitidou silně

rozpoznávají dva antigeny o velikosti 34kDa a 25 kDa. Bylo zjištěno, že se jedná o glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu a o trioso-fosfát izomerázu (Kašný et al. 2009). Na základě těchto poznatků bylo rozhodnuto vytvořit rekombinantní formu TPI. Sekvenci genu pro TPI se podařilo získat pro druh *T. szidati* (Kašný, nepublikováno), což je druh velmi blízký *T. regenti*, počítá se proto se zkříženou reaktivitou.

4.7.1 Izolace celkové RNA a syntéza cDNA

K izolaci celkové RNA z cercárií *T. szidati*, z hepatopankreatu infikovaného plže *L. stagnalis* a z hepatopankreatu zdravého plže *L. stagnalis* (kontrola) byl použit TRIZOL reagent (Invitrogen), 1ml na 50 – 100 mg tkáně. Při izolaci bylo postupováno dle manuálu kitu. Z izolované RNA byla následně nasyntetizována jednořetězcová cDNA pomocí kitu Super Script III RT (Invitrogen) podle návodu výrobce. Získaná cDNA sloužila jako templát pro další PCR.

4.7.2 PCR s degenerovanými primery pro TsTPI

Degenerované primery pro TsTPI byly navrženy podle sekvence TsTPI laskavě poskytnuté dr. Martinem Kašným. Tato sekvence byla v programu BioEdit porovnána s dostupnými sekvencemi TPI jiných motolic a na základě tohoto srovnání byly navrženy uvedené degenerované primery:

- FWD 5' ATG TCT RGA TCT CGC AMA TT 3'
- REV 5' RTT RTY TRG CTT WAC ATA T 3'

PCR reakce probíhala v thermocyleru C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Do reakce (25µl) byly přidány chemikálie popsané v tabulce 4. Tabulka 5 ukazuje nastavení termocyleru pro amplifikaci TsTPI pomocí PCR.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR

	Reagencie	Množství/ µl
1.	PPP mastermix	12,5 µl
2.	MgCl ₂	2,5 µl
3.	H ₂ O	7 µl
4.	Primery F	1 µl
5.	Primery R	1 µl
6.	Templátová cDNA	1 µl
7.	Celkový objem	25 µl

Tabulka 5: Nastavení thermocycleru pro PCR reakci s degenerovanými primery pro TsTPI

	Reakce	Čas	Teplota	Opakování
1.	Denaturace	5 min	94 °C	1x
2.	Denaturace	1 min	94 °C	35x
	Anealling	1 min	Gradient 55 - 45	
	Polymerace	1 min	72 °C	
3.	Poslední cyklus	10 min	72 °C	1x
4.	Konečné chlazení		4 °C	

Separace amplifikované DNA byla prováděna pomocí horizontální DNA elektroforézy v 1% agarózovém gelu společně s markery Gene Ruler 100bp plus (Fermentas). Jako elektrodový pufr byl použit TAE pufr (Invitrogen). Gel byl následně dokumentován a pod UV byl vyříznut band požadované velikosti. DNA z gelu byla izolována pomocí kitu MinElute® PCR Purification Kit (250) (Qiagen). Koncentrace a čistota DNA byla ověřena na spektrometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

4.7.3 Ligace, transformace a výsev buněk *E. coli*

Získaná DNA byla ligována do plazmidového vektoru pCR2.1 – TOPO pomocí klonovacího kitu TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) dle pokynů výrobce. Ligační reakce probíhala v thermocycleru C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) 12 hodin při 14°C.

Takto připravený produkt byl pomocí teplotního šoku (30s, 42°C) transformován do kompetentních buněk TOP0 10 *E. coli* (25µl). Poté bylo přidáno S.O.C medium (Invitrogen) a buňky byly inkubovány 1 hodinu při 37°C při horizontálním třepání.

Buňky *E. coli* (150µl) byly vysety na předem připravené plotny s Low salt LB médiem, s přídatkem kanamycinu (25µl, 25µg/ml) a uloženy přes noc v inkubátoru (37°C). Z narostlých kolonií bylo vybráno 20, které byly přeočkovány na novou plotnu a ponechány za stejných podmínek. Narostlé kolonie byly následně uchovávány při 4°C.

4.7.4 Kontrola transformace buněk

Kontrola transformace buněk se provádí ještě před odesláním na sekvenaci. Narostlé kolonie buněk by měly v plazmidu obsahovat námi požadovaný inzert. Byl proveden CRACK buněk. Špička s plakem z kolonie *E. coli* byla vložena do 0,2 ml mikrozkušavky s 8 µl dH₂O a inkubována v thermocycleru C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) podle protokolu uvedeném v tabulce 6. Takto upravené buňky slouží jako templátová DNA.

Tabulka 6: Nastavení termocycleru pro CRACK buněk

	Teplota (°C)	Čas (min)	Cyklus
1.	96	5:00	1
2.	50	1:50	
3.	96	1:50	
4.	45	1:00	
5.	96	1:00	
6.	40	1:00	
7.	4	2:00	

Po skončení cyklu byly do mikrozkušavek přidány reagenty uvedené v tabulce 3, lišilo se pouze množství použitého PPP mastermixu (13,5 µl) a do reakce byly přidány primery pro pCR4 TOPO M13 (0,5 µl Fwd; 0,5 µl Rev). Nastavení termocycleru je shodné s nastavením uvedeným v tabulce 4, liší se jen anealingová teplota (55°C) a počet opakování (30x). Po PCR byla amplifikovaná DNA separována pomocí elektroforézy a na sekvenaci byly vybrány vzorky, jejichž inzert byl v rozmezí námi požadované velikosti (kolem 800bp).

4.7.5 Příprava vzorků na sekvenaci

Buňky, u kterých bylo pomocí CRACKu potvrzeno, že obsahují v plazmidu zaligovaný produkt o požadované velikosti, byly přeočkovány do tekutého Low Salt LB media (2ml) s kanamycinem (50µg/ml) a byly nechány 16 hodin na třepačce při 37°C. Z kultury narostlých buněk *E. coli* byly pomocí izolačního kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) izolovány plazmidy a sekvenovány pomocí primerů M13 v laboratoři sekvenace DNA (Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta). Získané sekvence byly vyhodnoceny v programu Seqman.

4.7.6 PCR se specifickými primery pro TsTPI

Specifické expresní primery pro TsTPI byly navrženy na základě sekvencí získaných pomocí degenerovaných primerů, jak bylo popsáno výše. V programu Rebase byly vybrány vhodné restriční endonukleázy, které nemají restriční místa uvnitř sekvence TPI. Byly zvoleny restriční endonukleázy *Sall* a *BamHI*, restriční místa jsou v sekvencích primerů naznačeny malým písmem. Sekvence specifických expresních primerů jsou uvedeny zde:

- FWD 5' CATAg/tcgacATG TCT GGA TCT CGC ACA TTT TTT 3' (*Sall*)
- REV 5' GATAg/gatccATT GTC TGG CTT TAC ATA TGT CAA 3' (*BamHI*)

PCR reakce s navrženými expresními primery probíhala v thermocyleru C 1000 Thermal Cyler (Bio-Rad). Jako templátová DNA byly použity izolované přečištěné plazmidy získané z kolonií *E. coli*, u kterých byla sekvenací potvrzena přítomnost TPI v plazmidu. Všechny ostatní reagenty byly shodné jako v reakci popsané v tabulce 4. Stejně tak nastavení termocyleru, až na anealingovou teplotu (gradient 65 - 50°C) bylo shodné s hodnotami uvedenými v tabulce 5.

Separace amplifikované DNA byla provedena pomocí elektroforézy a byl vyříznut proužek požadované velikosti. DNA z gelu byla izolována pomocí kitu MinElute® PCR Purification Kit (250) (Qiagen). Koncentrace získané DNA byla změřena na spektrometru Nanodrop 1000 (ThermoScientific).

Byla provedena ligace do plazmidového vektoru pCR2.1 – TOPO a transformace do kompetentních buněk *E. coli*. Následně byly vybrány kolonie, z kterých byly izolovány plazmidy obsahující inzert s místy pro restrikční endonukleázy *Sall* a *BamHI* a ty byly zaslány na sekvenaci.

4.7.7 Transformace do expresního systému

Z kolonií *E. coli*, u nichž byla potvrzena přítomnost plazmidu s vloženým inzertem TPI, byl plazmid izolován podle manuálu kitu a pomocí restrikčních endonukleáz *Sall* a *BamHI* (Fermentas) byl specifický oštipán. Reakce probíhala 4 hodiny v thermocyleru při 37°C.

Jako vektor byl zvolen plazmid pET-28a(+). Tento vektor byl linearizován před reakcí pomocí stejných restrikčních endonukleáz. Použité reagenty jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Složení reakční směsi při specifickém oštipání pomocí restrikčních endonukleáz *BamHI* a *Sall*

	Reagenty	Plazmid pCR2.1-TOPO	Plazmid pET28a
1.	dH ₂ O	12 µl	12 µl
2.	Pufř pro restrikční enzymy, 1× Buffer O	4 µl	4 µl
3.	Vzorek DNA (100-200 ng/µl)	20 µl	20 µl
4.	Restrikční endonukleáza <i>BamHI</i>	2 µl	2 µl
5.	Restrikční endonukleáza <i>Sall</i>	2 µl	2 µl
6.	Celkový objem	40 µl	40 µl

Byla provedena elektroforéza na 1,5 % agarovém gelu a proužky v požadované velikosti, linearizovaný plazmid pET-28a a oštípaný produkt, byly vyříznuty a přečištěny. Ligace probíhala pomocí T4 DNA ligázy (Promega) přes noc v thermocycleru nastaveném na 14°C. Transformace připraveného konstruktů byla provedena pomocí teplotního šoku (30s, 42 °C) do kompetentních BL21 *E.coli*. Ty byly vysety na agarové plotny s přídavkem kanamycinu. Z kultury narostlých buněk BL21 *E. coli*, byly pomocí izolačního kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) vyizolovány plazmidy a sekvenovány v laboratoři sekvenace DNA.

5 Výsledky

5.1 ELISA IgY – séra kachen experimentálně nakažených *T. regenti* a *T. szidati*

Metodou ELISA, neboli Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, byla otestována všechna séra získaná odběrem z kachen experimentálně nakažených *T. regenti* a *T. szidati*. Výsledky jsou vždy uvedeny v grafu pro danou skupinu kachen nakaženou stejnou infekční dávkou, u které probíhaly odběry ve stejnou dobu se stejnými časovými intervaly (7 nebo 10 dnů). Skupina E a F byla složena z divokých kachen *A. platyrhynchos*. Tyto kachny byly použity při opakované experimentální nákaze jak druhem *T. regenti* (4×), tak *T. szidati* (2×) (skupina E) a při experimentu, v kterém se infikovaly kachny s již dozrálou imunitou (skupina F). Nákazy kachen, pokud není uvedeno jinak, proběhly v čase, kterému na ose x odpovídá 0. Opakované nákazy, či nákazy po prvním odběru sér, jsou v grafu označeny červenou šipkou.

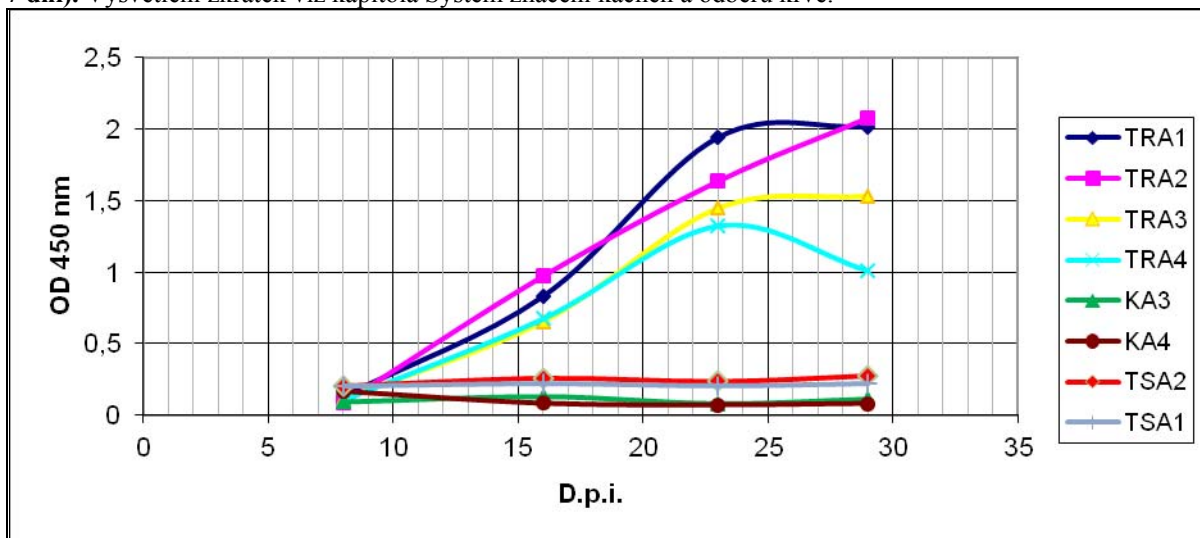
Změny hladiny protilátek anti TrH_C IgY, závisující na čase uplynulém od infekce vyjádřené pomocí OD můžeme sledovat na grafu 1 pro skupinu A, na grafu 2 pro skupinu B, na grafu 3 pro skupinu C, na grafu 4 pro skupinu D, na grafu 5 pro skupinu E a na grafu 6 pro skupinu F. Na grafu 7 můžeme sledovat hladinu anti TrH_C IgY protilátek skupiny divokých kachen nakažených opakovaně (2×) *T. szidati*.

OD₄₅₀ se pohybuje u prvních odběrů většinou v rozmezí od 0 do 0,5 jak u infikovaných kachen, tak u kontrol. V případě infekcí druhem *T. regenti* lze zaznamenat jasné zvýšení anti TrH_C IgY v době odpovídající 20. d.p.i. Jedná se o třetí odběry u skupin A a B (sedmidenní intervaly odběru) a o druhé odběry u skupin C, D, E a F (desetidenní intervaly odběru). OD₄₅₀ kontrol zůstává na stejné úrovni jako v případě prvního odběru, ale OD₄₅₀ sér získaných z infikovaných kachen začíná vzrůstat a pohybuje se v intervalu od 1 do 2,5. Séra infikovaných kachen získaná v následujících odběrech oscilují stále kolem stejné úrovně OD, případně se OD ještě mírně zvyšuje a ustaluje se na stejné úrovni v období odpovídajícím 30 d.p.i. U opakovaně infikovaných kachen (skupina E) bylo zaznamenáno zvýšení anti TrH_C IgY kolem 20. d.p.i., tedy po druhé expozici infekční dávce cercárií *T. regenti*. Následně po dalších expozicích se anti TrH_C IgY již výrazně neměnila.

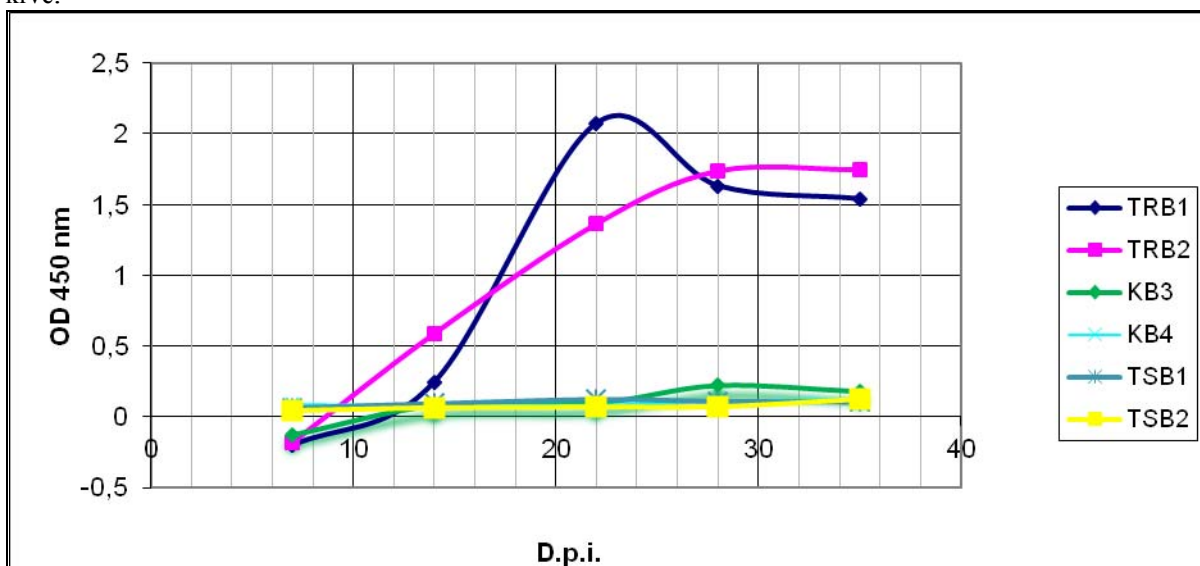
U sér nakažených druhem *T. szidati* tuto tendenci nepozorujeme. Naměřená OD₄₅₀ se pohybuje v rozmezí od 0 - 0,5, tedy na stejné úrovni jakou lze pozorovat u naivních kachen. Výjimku tvořily pouze opakovaně infikované (2×) divoké kachny. Protože se jednalo pouze o

2 případy, a hladina anti TsH_C IgY se vyvíjela i u těchto dvou jedinců velmi odlišně, nelze v tomto případě vyvodit žádný obecně popsatelný trend.

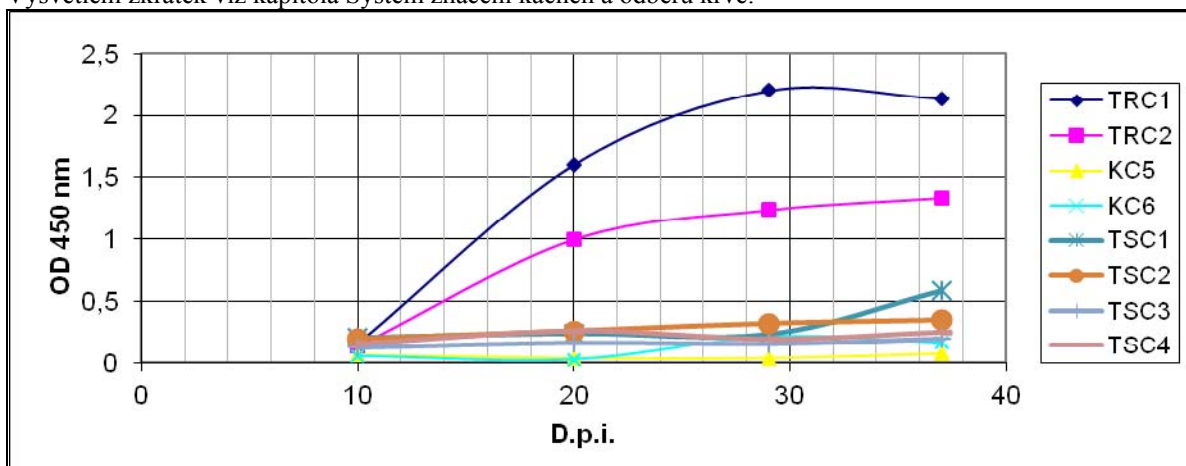
Graf 1: Závislost hladiny anti TrH_C a anti TsH_C IgY na době od infekce (skupina A – intervaly odběru 7 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



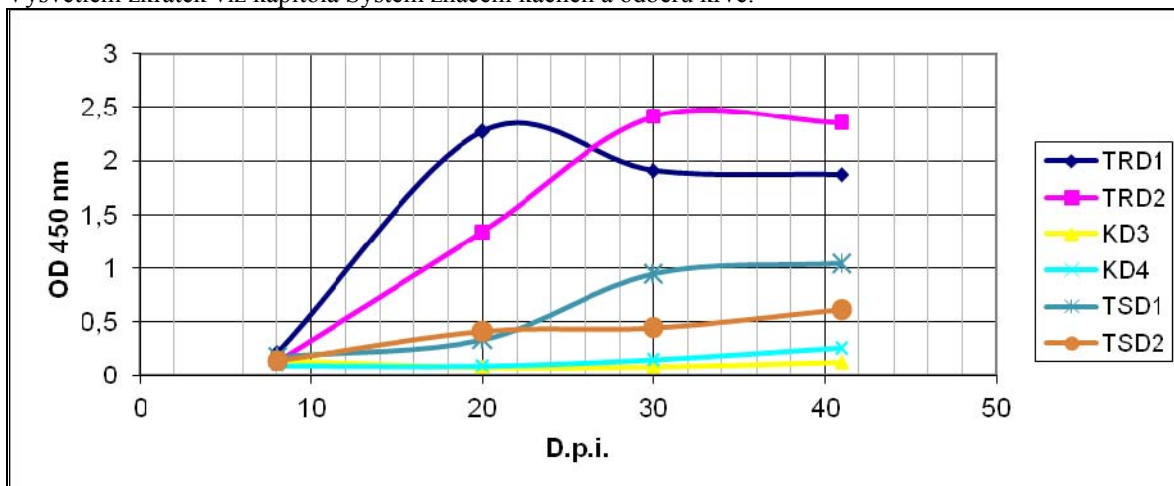
Graf 2: Závislost hladiny anti TrH_C a TsH_C IgY na době od infekce (skupina B – intervaly odběru 7 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



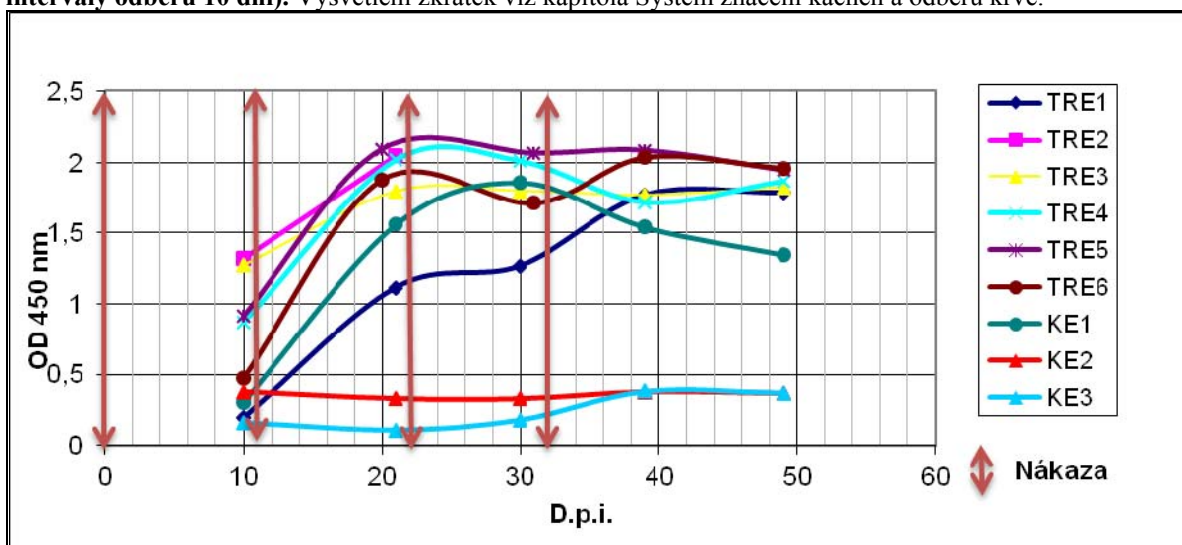
Graf 3: Závislost hladiny anti TrH_C a TsH_C IgY na době od infekce (skupina C – intervaly odběru 10 dní)
 Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



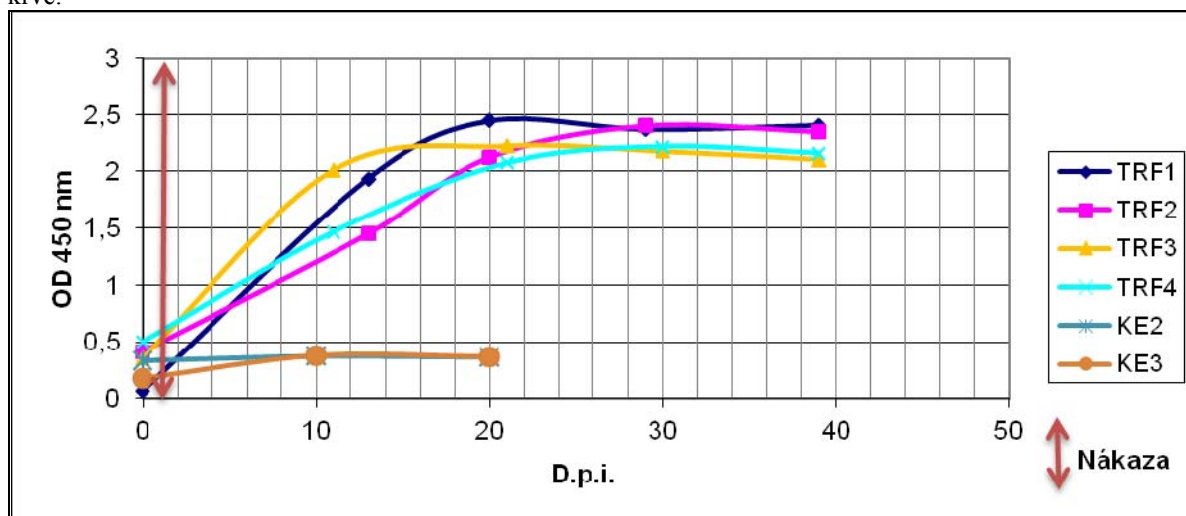
Graf 4: Závislost hladiny anti TrH_C a TsH_C IgY na době od infekce (skupina D – intervaly odběru 10 dní).
 Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



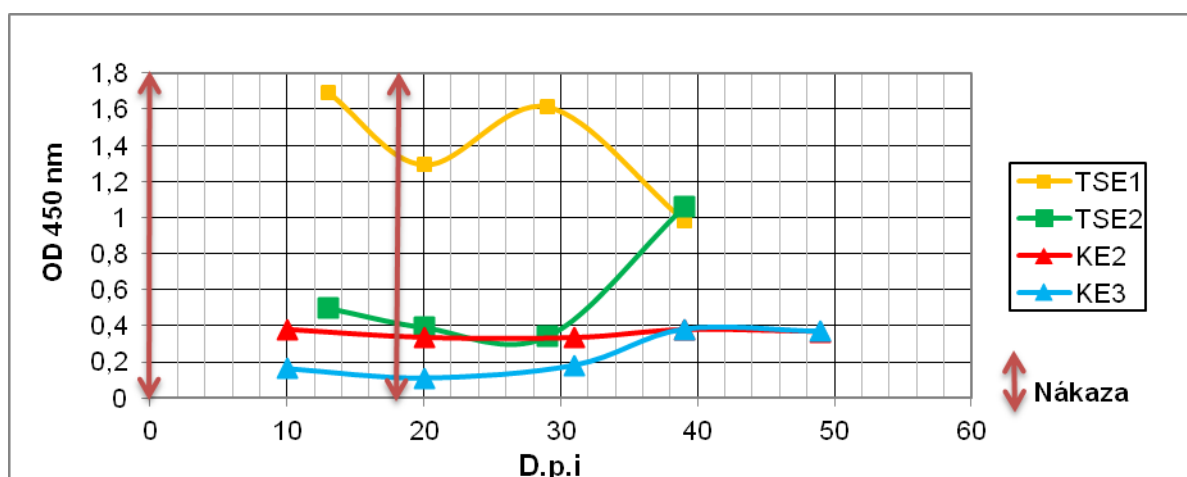
Graf 5: Závislost hladiny anti TrH_C a IgY na době od infekce (skupina E – 4× reinfikované kachny, intervaly odběru 10 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



Graf 6: Závislosti hladiny anti TrH_C IgY na době od infekce (skupina F – kachny infikované v době plné imunokompetence, intervaly odběru 10 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



Graf 7: Závislost hladiny anti TsH_C IgY na době od infekce (skupina E – 2× reinfikované kachny; intervaly odběru 10 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



5.2 ELISA IgM – séra kachen experimentálně nakažených *T. regenti* a *T. szidati*

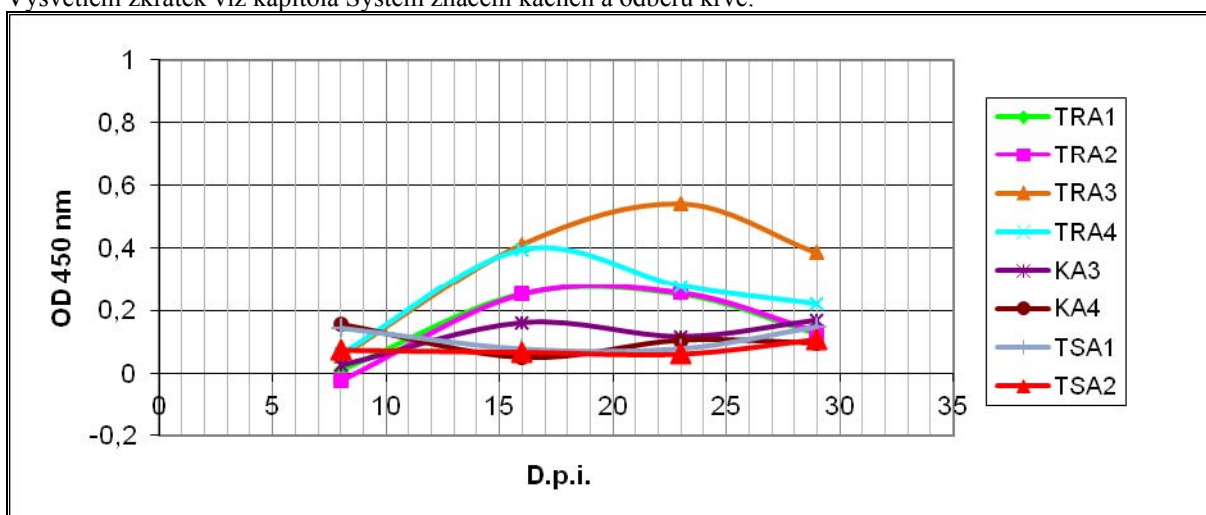
Metoda ELISA testu byla použita i k otestování změny hladiny protilátek anti TsH_C a anti TrH_C IgM. Změny hladin protilátek IgM závisející na čase uplynulém od infekce vyjádřené pomocí OD můžeme sledovat na grafu 8 pro skupinu A, na grafu 9 pro skupinu B, na grafu 10 pro skupinu C, na grafu 11 pro skupinu D, na grafu 12 pro skupinu E a na grafu 13 pro skupinu F. Graf 14 monitoruje vývoj anti TsH_C IgM protilátek skupiny divokých kachen nakažených opakovaně (2×) *T. szidati*.

OD₄₅₀ sér experimentálně nakažených kachen se ve většině případů pohybuje v rozmezí od 0 do 0,5, tedy ve stejném rozmezí OD jako se pohybují i hodnoty sér naivních

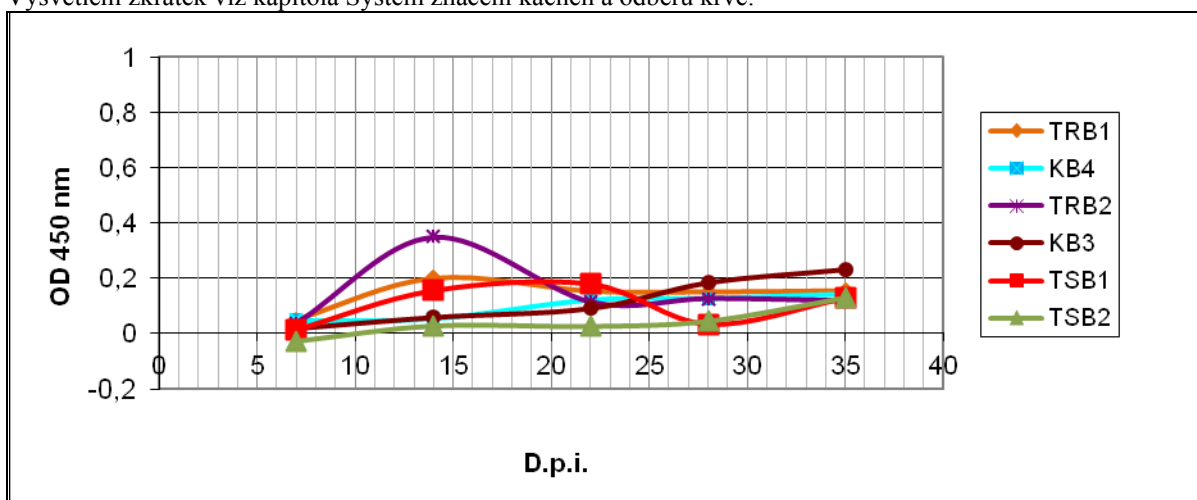
kachen. U opakovaně reinfikovaných divokých kachen (skupina E) jsme sledovali ve většině případů trend snižování anti TrH_C IgM mezi 10. a 20. d.p.i. Opakované infekce nemají na hladinu anti TrH_C IgM žádný vliv. Po infekci divokých kachen s plně zralým imunitním systémem (skupina F) došlo 10. d.p.i. ve většině případů k mírnému zvýšení hladiny anti TsH_C IgM, která začala kolem 20.d.p.i. opět klesat.

V případě kachen infikovaných *T. szidati* opět nebyl pozorovatelný žádný výrazný trend. Hodnoty OD sér se pohybují mezi 0 a 0,4. OD sér kachen reinfikovaných *T. szidati* se pohybuje v rozmezí 0,5 - 0,7.

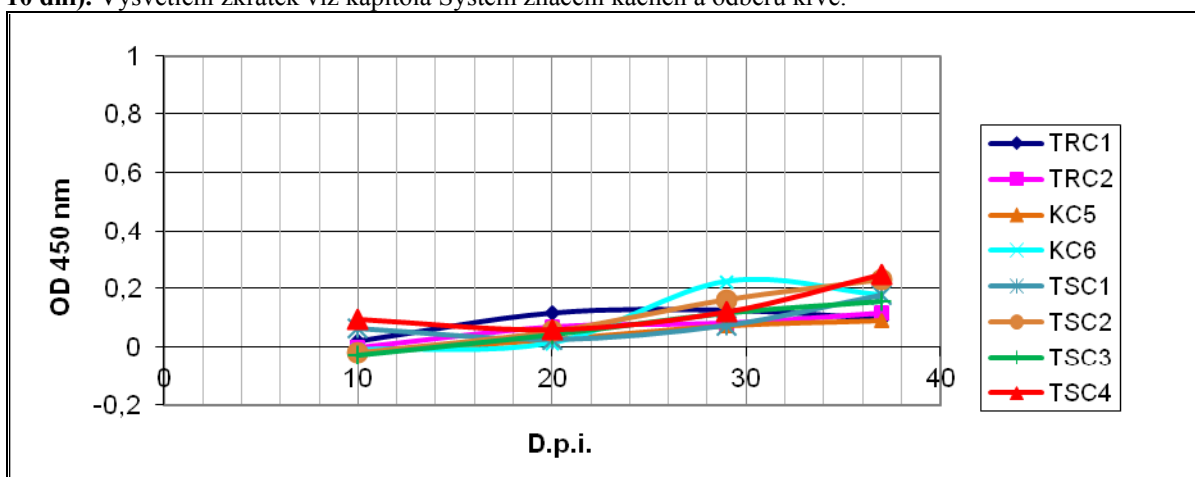
Graf 8: Závislost hladiny anti TrH_C a TsH_C IgM na době od infekce (skupina A – intervaly odběru 7 dní).
Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



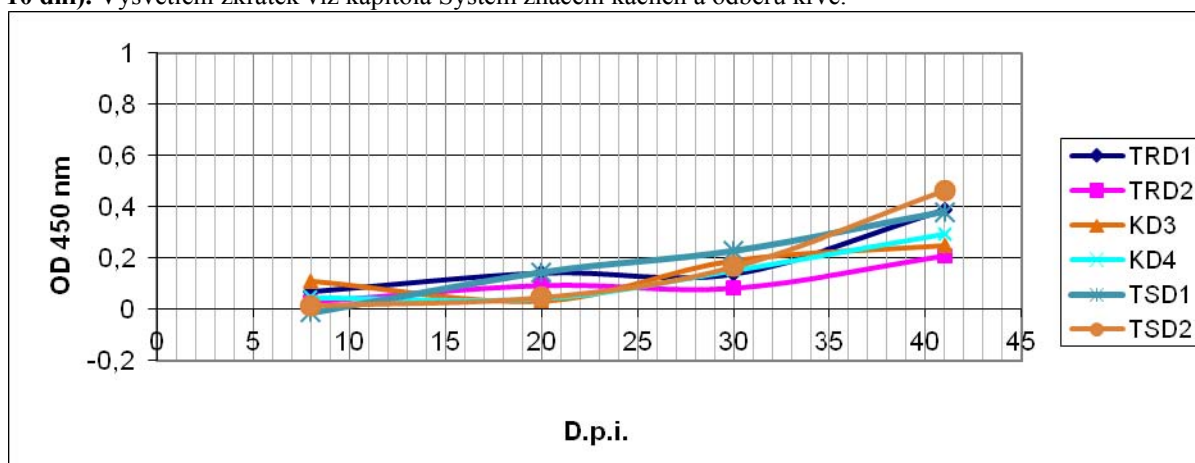
Graf 9: Závislost hladiny anti TrH_C a TsH_C IgM na době od infekce (skupina B – intervaly odběru 7 dní).
Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



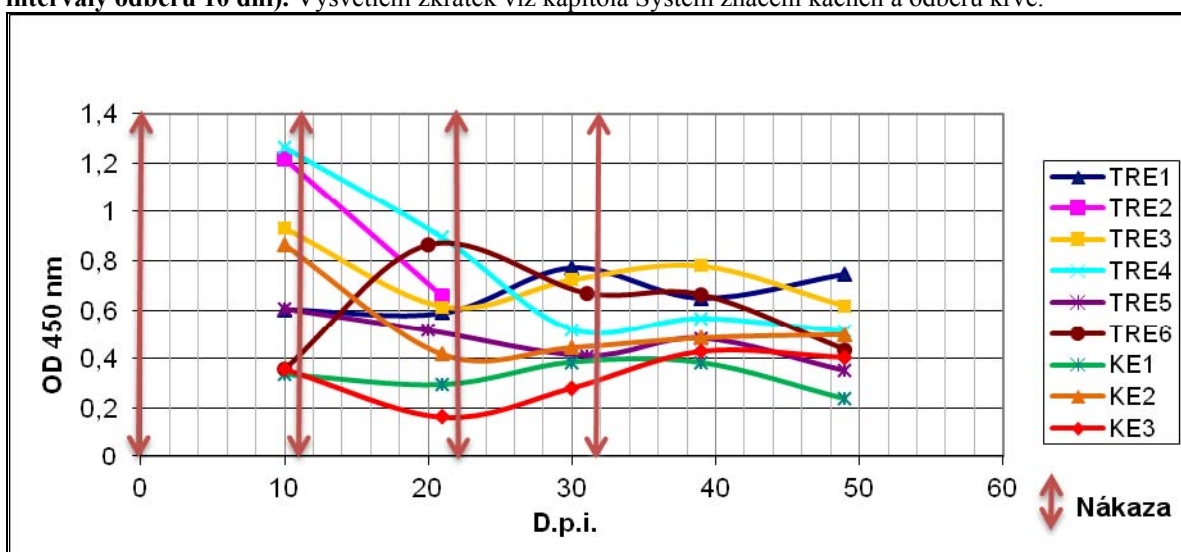
Graf 10: Závislost hladiny anti TrH_C a TsH_C IgM na době od infekce (skupina C – intervaly odběru 10 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



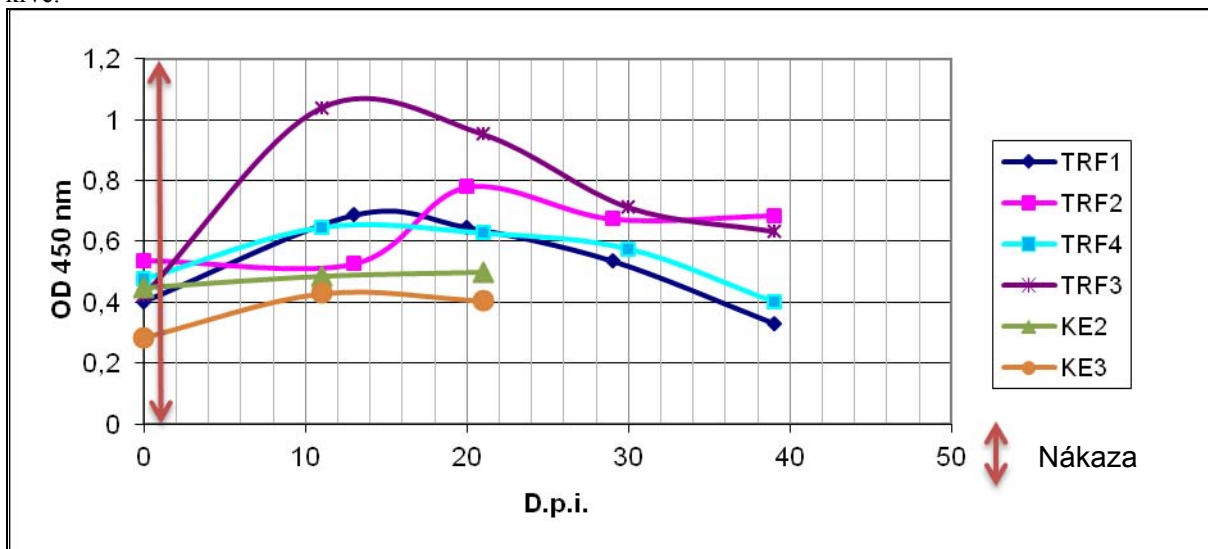
Graf 11: Závislost hladiny anti TrH_C a TsH_C IgM na době od infekce (skupina D – intervaly odběru 10 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



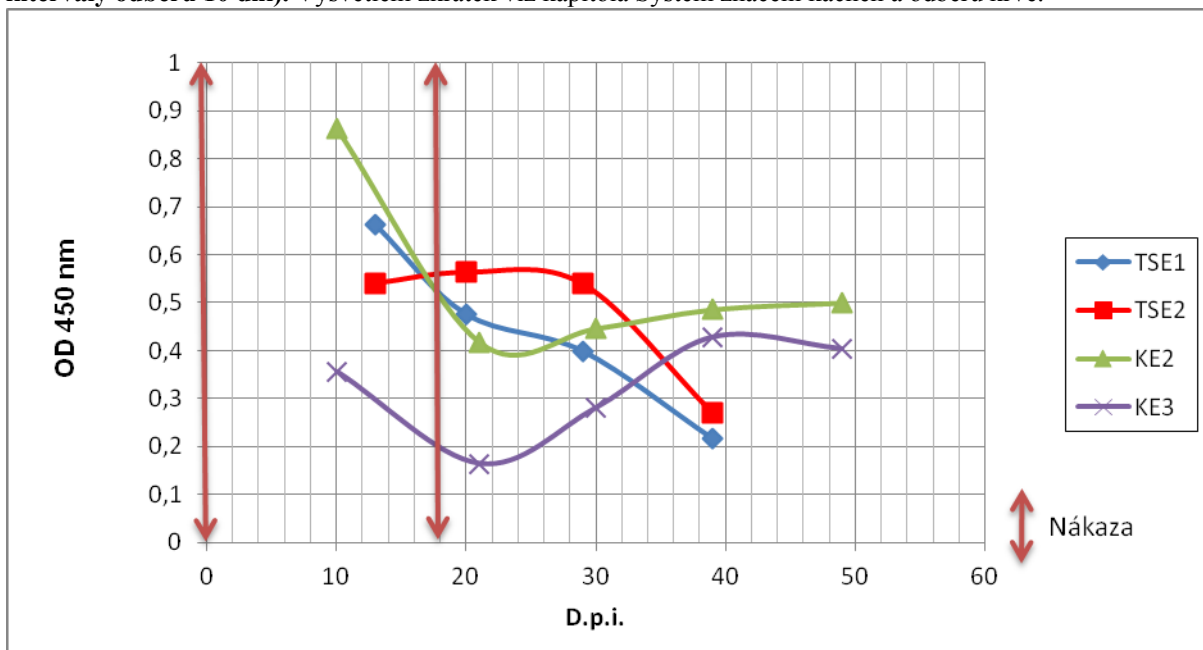
Graf 12: Závislost hladiny anti TrH_C IgM na době od infekce (skupina E – 4× reinfikované kachny, intervaly odběru 10 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



Graf 13: Závislost hladiny anti TrH_C IgM na době od infekce (skupina F – kachny infikované v době plné imunokompetence, intervaly odběru 10 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



Graf 14: Závislost hladiny anti TsH_C IgM na době od infekce (skupina E – 2× reinfikované kachny, intervaly odběru 10 dní). Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



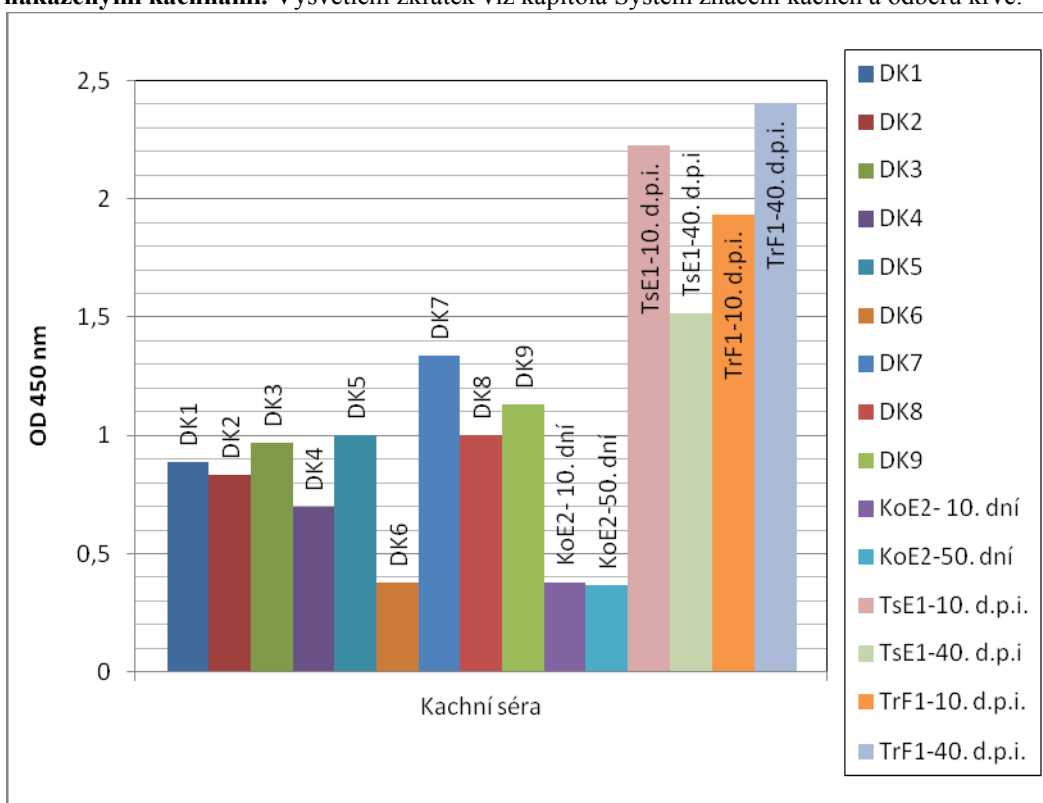
5.3 ELISA IgY a IgM – Séra kachen získaných při myslivecké naháňce

Při dvou mysliveckých naháňkách v obci Zbiroh na Dvorském rybníce byla získána séra z ulovených divokých kachen. Byly provedeny stěry střev a vyšetřeny cévy mezenteria a nosní sliznice. Přítomnost ptačích schistosom nebyla u ulovených kachen potvrzena. U kachny DKE byla nalezena v nosní dutině vajíčka *Capillaria* sp. a pijavka *Theromyzon* sp., ve střevě kachny DKC byla nalezena tasemnice z čeledi Hymenolepididae.

Séra jsme otestovali metodou ELISA, detekovali jsme hladinu protilátek třídy IgY. Graf 15 ukazuje hodnoty OD při 450 nm všech testovaných sér. Pro lepší orientaci jsou do grafu přidána data získaná z ELISA testu experimentálně infikovaných kachen, vždy první a poslední odběr od nákazy (KoE2, TsE1, TrF1).

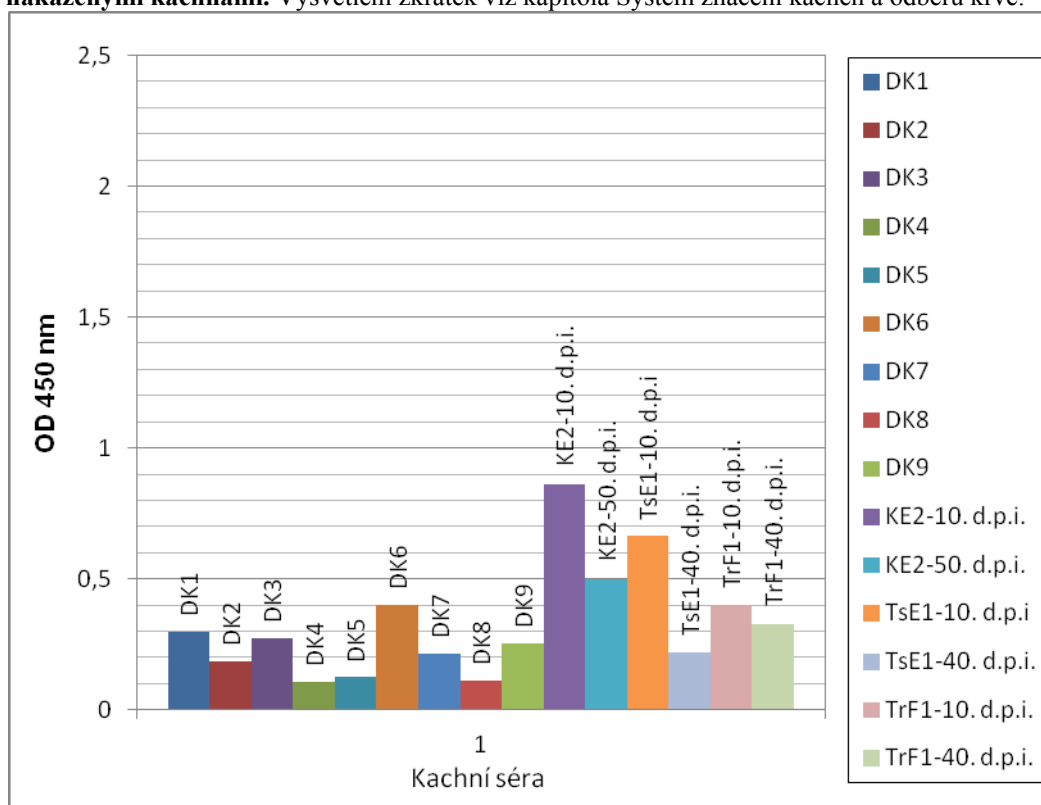
Naměřená OD vzorků se pohybovala v rozmezí 0,4 – 1,5. Většina sér byla v rozmezí OD 0,7 – 1. Žádné z testovaných sér nedosáhlo podobné hladiny protilátek, jako byla naměřena u experimentálně nakažených kachen. OD sér naivních kachen se pohyboval většinou kolem hodnoty 0,4. V porovnání s OD kontrol byly u všech sér vyjma DK6 naměřeny vyšší hodnoty.

Graf 15: Hladiny protilátek anti TrH_C IgY u ulovených divokých kachen ve srovnání s experimentálně nakaženými kachnami. Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.



Na Grafu 16 jsou zobrazeny výsledky ELISA testu pro třídu imunoglobulinů IgM. Byla opět testována séra ulovených divokých kachen. OD vzorků se pohybovala v rozmezí 0,1 – 0,4. Tyto hodnoty OD byly dokonce nižší než u naivních kachen z našeho experimentu.

Graf 16: Hladiny protilátek anti TrH_C IgM u ulovených divokých kachen ve srovnání s experimentálně nakaženými kachnami. Vysvětlení zkratk viz kapitola Systém značení kachen a odběrů krve.

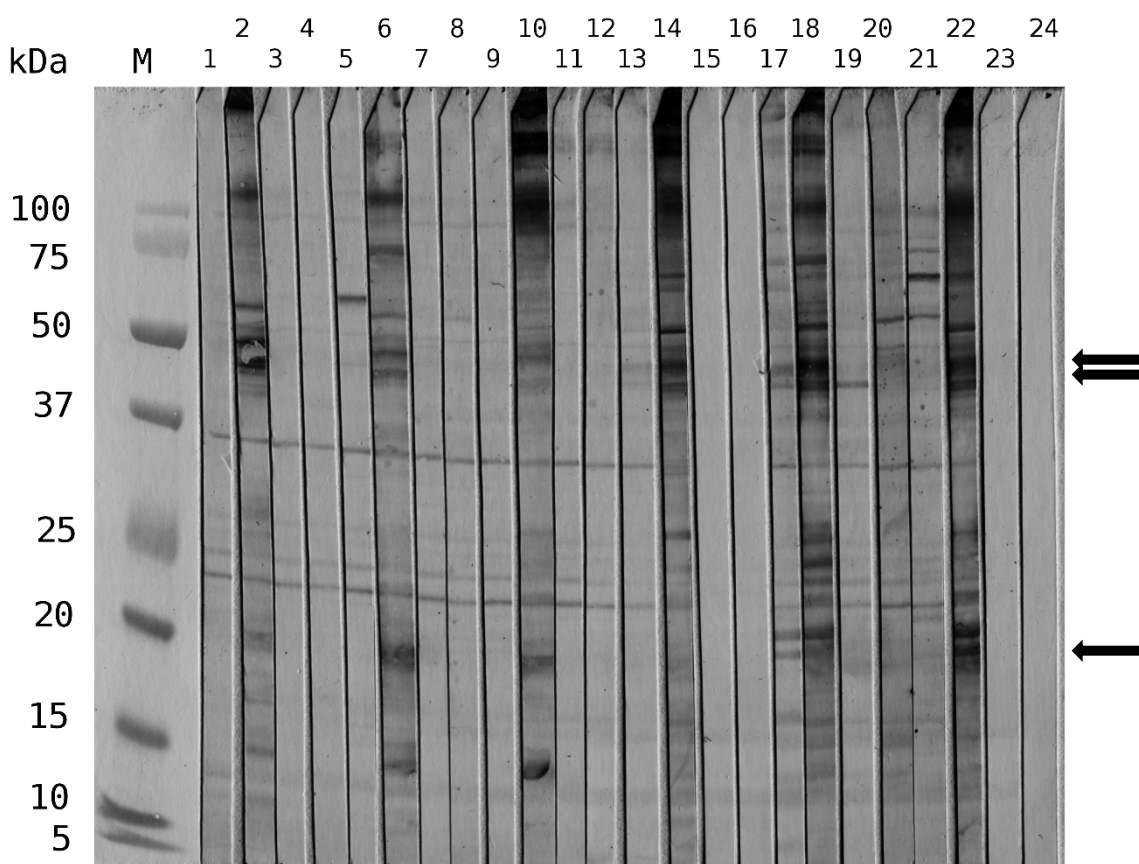


5.4 Western blot IgY – homogenáty *T. regenti*

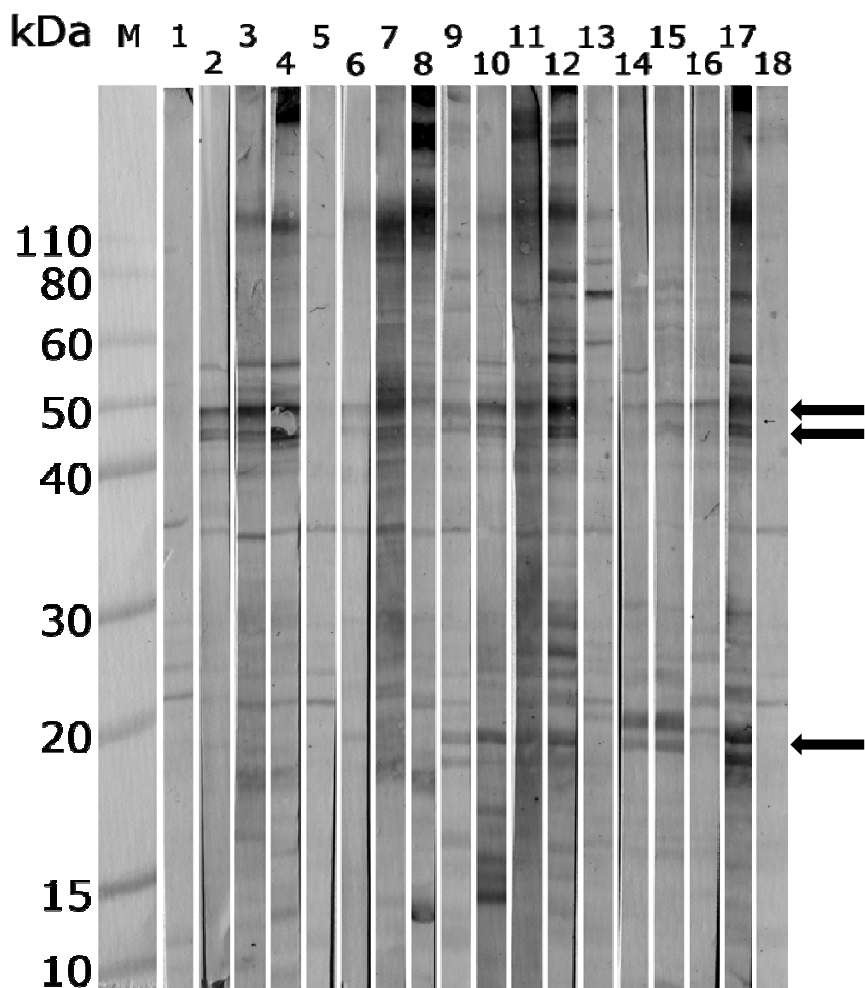
Všechna séra získaná z experimentálních nálezů kachen druhem *T. regenti* jsme otestovali pomocí imunoblotu. Séra byla testována ve skupinách podle odběrů, tzn. všechna séra získaná při prvních odběrech byla testována na jedné membráně atd. První odběry odpovídají 7. a 10. d.p.i. (dny po infekci), druhé 14. a 20.d.p.i., třetí 21. a 30.d.p.i., čtvrté 28. a 40. d.p.i. a v případě, že byl uskutečněn i 5. odběr se jedná o 35. a 50. d.p.i., v závislosti na pokusné skupině.

Séra kachen, které byly vystaveny infekční dávce cercárií *T. regenti*, rozpoznávala již v době odpovídající 7. a 10. d.p.i. dva antigeny z TrH_C v oblasti mezi 40 a 50 kDa. Reakce na tyto antigeny byla zaznamenána u všech infikovaných kachen a objevovala se po celou dobu sledování (až 50 .d.p.i.), jak je patrné z grafů počtu sér kachen infikovaných *T. regenti* vázajících se na antigeny TrH_C o určité molekulové velikosti (grafy 17,18,19, 20, 21, 22, 23 a 24). Na grafech 17 až 22 můžeme sledovat reakci sér domácích kachen po jednotlivých odběrech. Graf 22 zobrazuje souhrně reakci sér kachen opakovaně reinfikovaných *T. regenti*, graf 23 zobrazuje souhrně reakci sér divokých kachen infikovaných v době plné zralosti imunitního systému. Souhrnná reakce všech odebraných sér je zobrazena na grafu 24. Reakce

na imunoblotu je ukázána na obrázcích 4 a 5, antigeny v oblastech mezi 40 a 50 kDa jsou označeny šipkou. Dále se objevila u většiny sér infikovaných kachen 20. d.p.i. reakce v oblasti kolem 55 kDa a v oblasti kolem 20 kDa (označena šipkou na obrázcích 4 a 5). U divokých kachen jsme zaznamenali 10. a 20. d.p.i. reakci v oblasti kolem 75 kDa, která posléze vymizela. Séra rozpoznávala i další antigeny, jednalo se však o ojedinělé reakce, které se objevovaly pouze u jednotlivých kachen. V oblasti kolem 25 kDa se vážaly i protilátky z sér naivních kachen, což svědčí o nespecifické reakci. Stejně tak tomu bylo i u další rozpoznávané oblasti ve velikosti 35-37 kDa. Séra divokých kachen obecně reagovala s antigeny silněji než séra domácích kachen. Tuto skutečnost, která se projevuje větší denzitou rozpoznávaných bandů, můžeme pozorovat na obrázku 4.



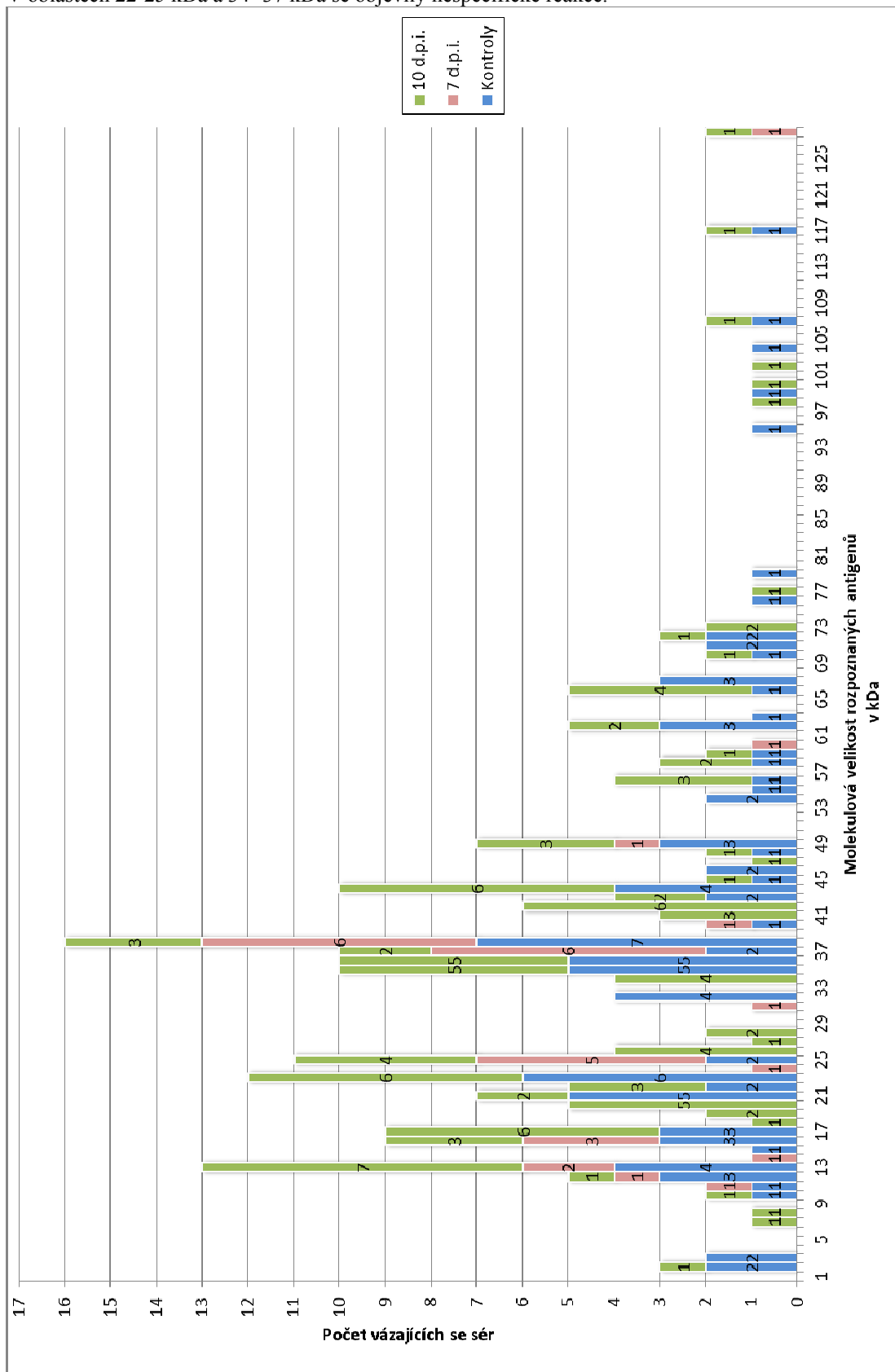
Obrázek 4: Reakce sér kachen infikovaných *T. regenti* na imunoblotu s antigeny TrH_CI.; M – markery; 1 a 2 – domácí kachna (dále jen K) 7. a 28. d.p.i.; 3 a 4 - naivní kachna (dále jen NK) 7 a 28 dní; 5 a 6 – K 7. a 35. d.p.i.; 7 a 8 – NK 7 a 35 dní; 9 a 10 – K 10. a 40. d.p.i.; 11 a 12 – NK 10 a 40 dní; 13 a 14 – K 10. a 40. d.p.i.; 15 a 16 – NK 10 a 40 dní; 17 a 18 – divoká kachna (dále jen DK) 10. d.p.i. po 1. infekci a 20. d.p.i. po 4. infekci; 19 a 20 - NK 10 a 50 dní; 21a 22 - DK s plně vyvinutou imunitou před nákazou a 40. d.p.i.; 23- sekundární protilátka; 24- PBS -T



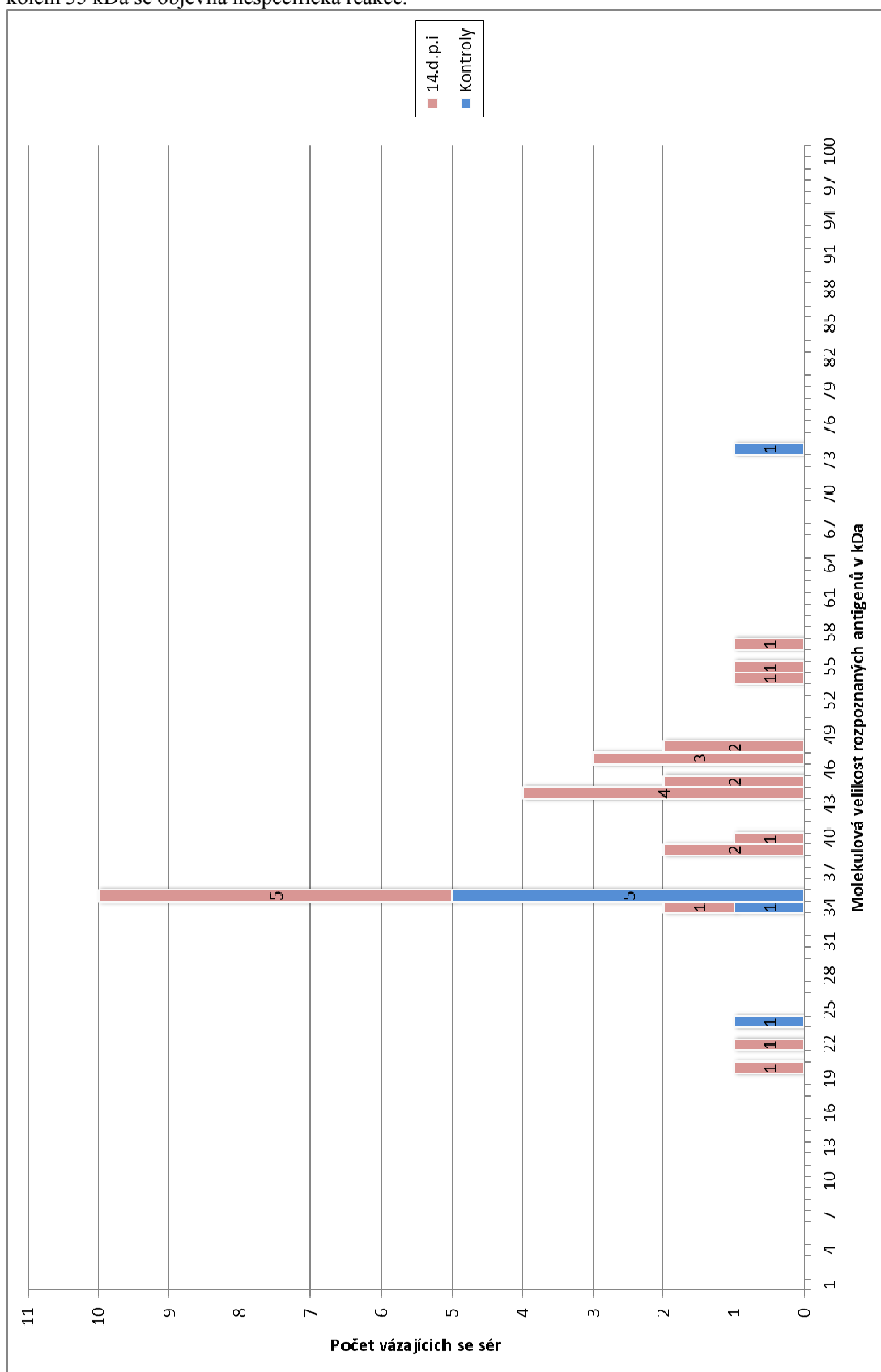
Obrázek 5: Reakce sér kachen infikovaných *T. regenti* na imunoblotu s antigeny TrH_c II.; M – markery; 1 – domácí kachna (dále jen K) 7. d.p.i.; 2 – K 14. d.p.i., 3 – K 21. d.p.i.; 4 – K 28. d.p.i.; 5 – K 10. d.p.i.; 6 – K 20. d.p.i.; 7 – K 30. d.p.i.; 8 – K 40. d.p.i.; 9 – divoká kachna (dále jen DK) 10. d.p.i. po 1. infekci; 10 – DK 10. d.p.i. po 2. infekci; 11 – DK 10. d.p.i. po 3. infekci; 12 – DK 10. d.p.i. po 4. infekci; 13 – DK s plně vyvinutou imunitou před infekcí; 14 – DK s plně vyvinutou imunitou 10. d.p.i.; 15 – DK s plně vyvinutou imunitou 20. d.p.i.; 16 – DK s plně vyvinutou imunitou 30. d.p.i.; 17 – DK s plně vyvinutou imunitou 40. d.p.i.; 18 – naivní kachna 40. den.

***) Vysvětlivky ke grafům 17-27:** Barevně odlišené sloupce znázorňují počet reakcí určité skupiny sér s danou molekulovou velikostí antigenu. Sloupce jsou pro lepší orientaci opatřeny popisky dat.

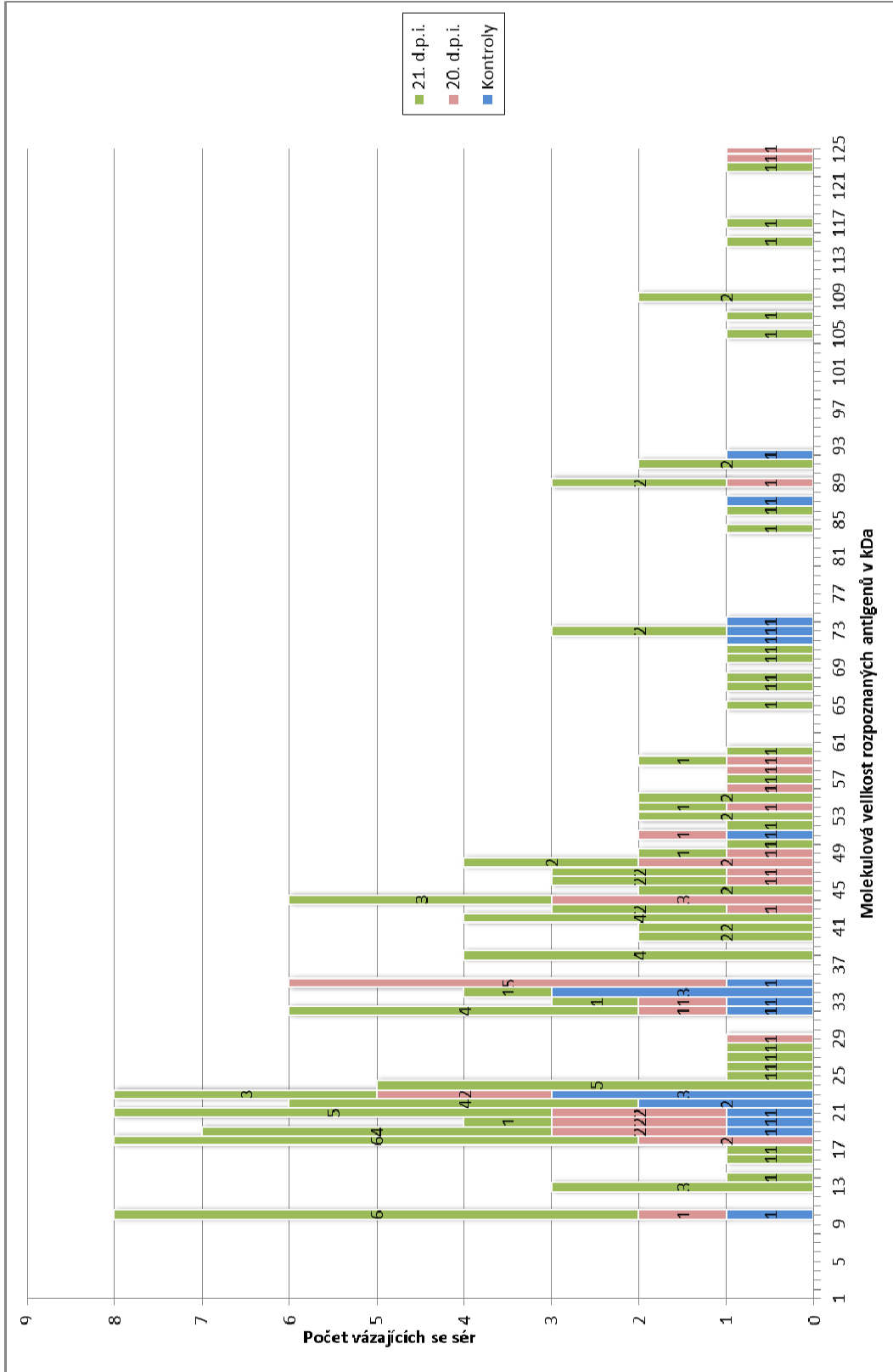
Graf 17 *): Počet vázajících se sér na antigeny TrH_C o určité molekulové velikosti - kachny infikované *T. regenti* 7. a 10. d.p.i. V experimentu bylo testováno celkem 30 sér, 16 od infikovaných kachen a 14 od naivních kachen. Protilátky 7. a 10. d.p.i. nejčastěji reagovaly s antigeny v oblasti kolem 19 a 40 kDa. V oblastech 22-25 kDa a 34- 37 kDa se objevily nespecifické reakce.



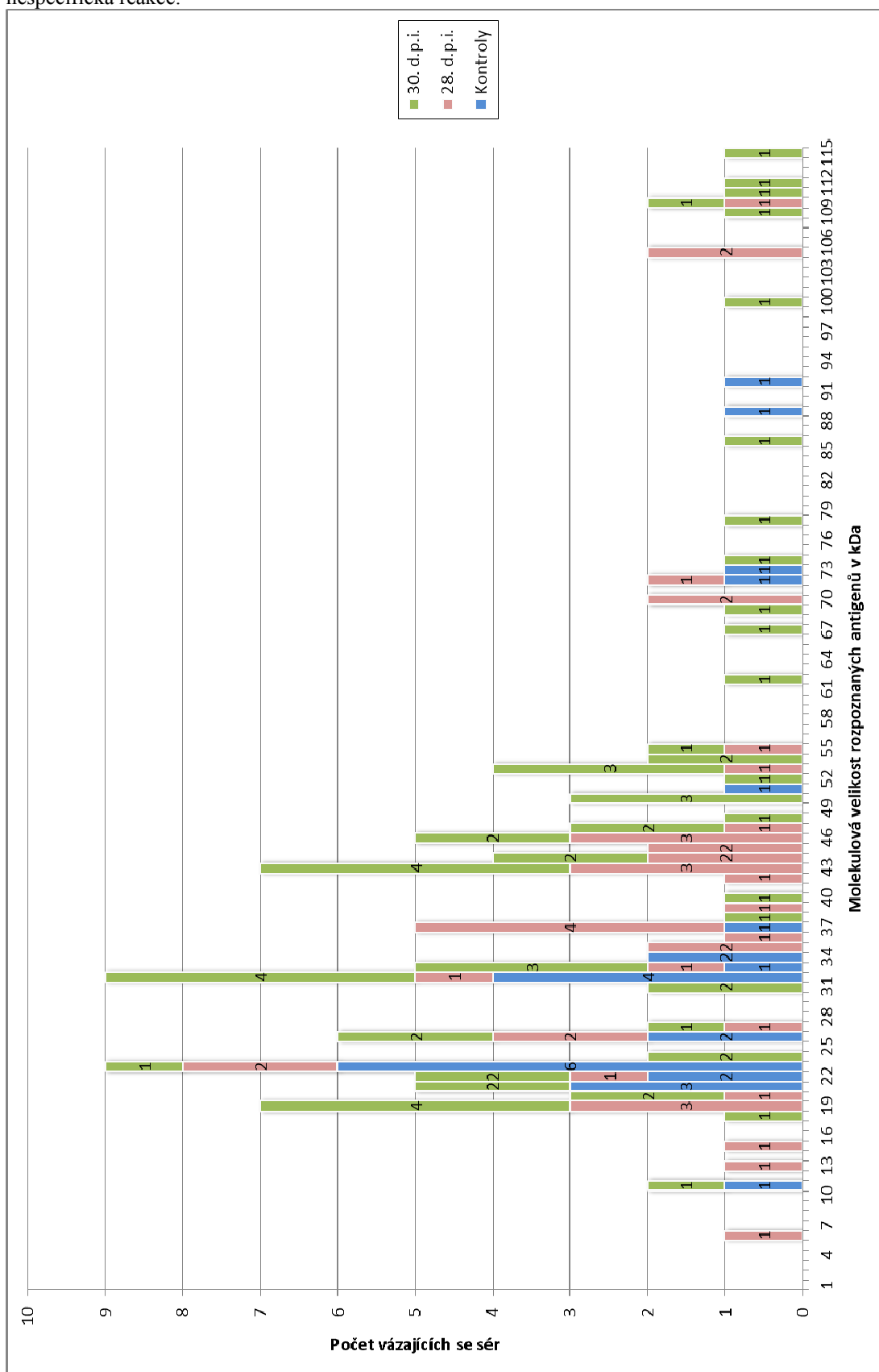
Graf 18*): Počet vázajících se sér na antigeny TrH_C o určité molekulové velikosti - kachny infikované *T. regenti* 14. d.p.i. V experimentu bylo testováno celkem 10 sér, 6 od kachen nakažených *T. regenti* a 4 od nainfikovaných kachen. Protilátky 14. d.p.i. nejčastěji reagovaly s antigeny v oblasti kolem 45 a 49 kDa. V oblasti kolem 35 kDa se objevila nespecifická reakce.



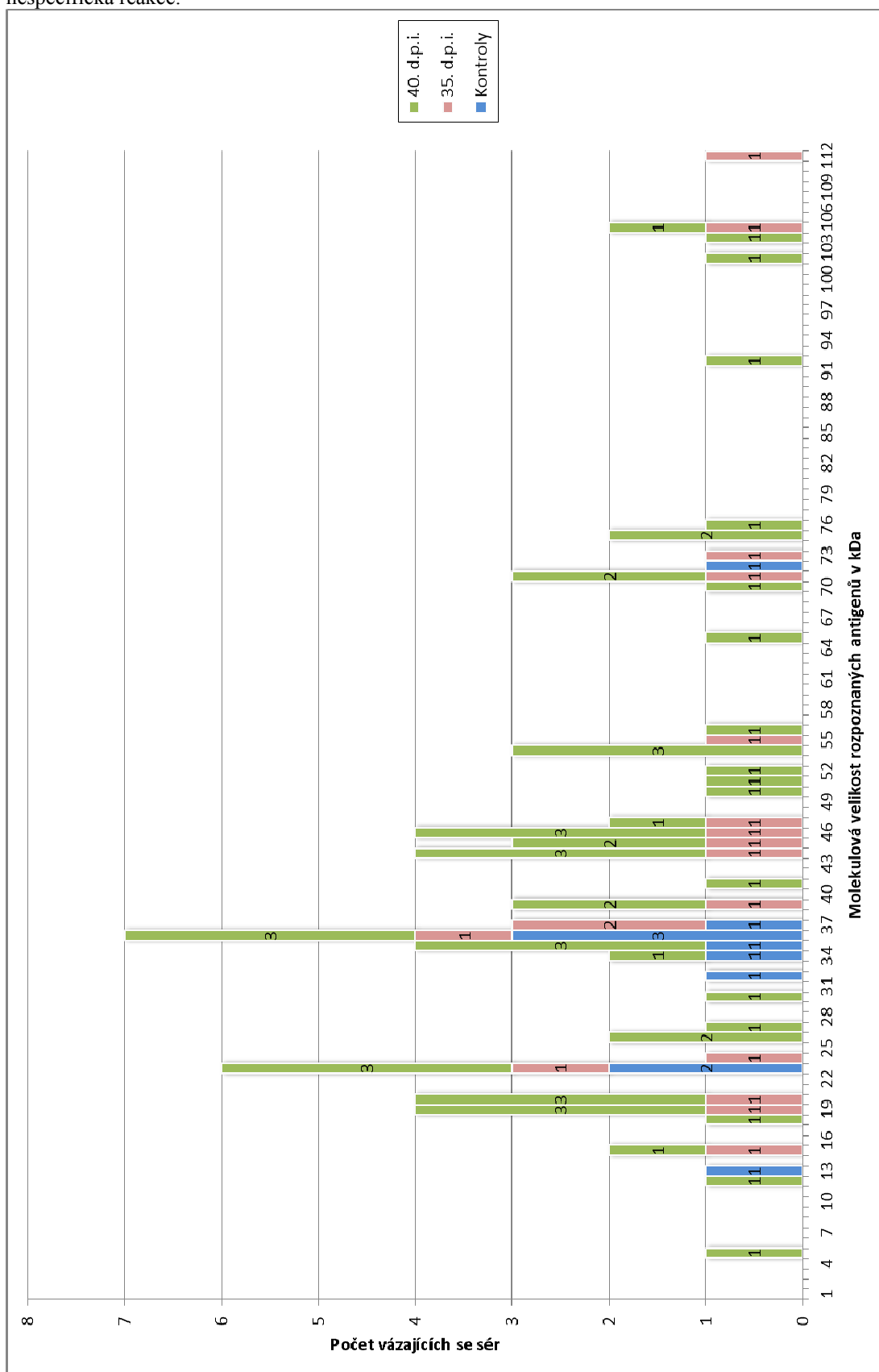
Graf 19*): Počet vázajících se sér na antigeny TrH_C o určité molekulové velikosti - kachny infikované *T. regenti* 20. a 21. d.p.i. V experimentu bylo testováno celkem 19 sér, 11 od kachen nakažených *T. regenti* a 8 od naivních kachen. Protilátky 20. a 21. d.p.i. reagovaly s antigeny v oblasti 40 až 50 kDa, nejčastěji kolem 45 kDa. Reakce se objevila i v oblasti kolem 18 kDa. V oblasti kolem 25 kDa je pozorovatelná nespecifická reakce.



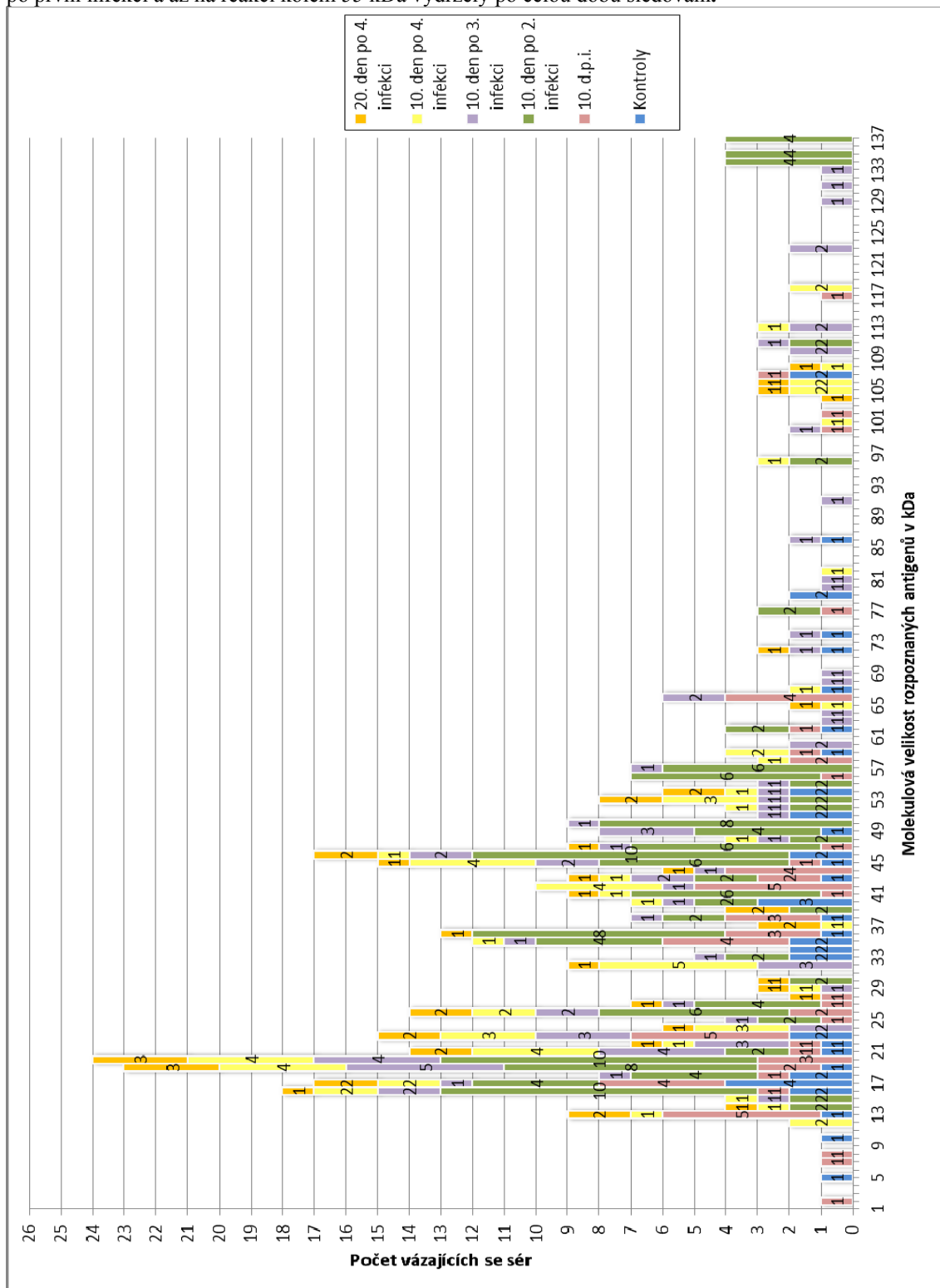
Graf 20*): Počet vázajících se sér na antigeny TrH_C o určité molekulové velikosti - kachny infikované *T. regenti* 28. a 30. d.p.i. V experimentu bylo testováno celkem 19 sér, 11 od kachen nakažených *T. regenti* a 8 od naivních kachen. Protilátky 28. a 30. d.p.i. reagovaly s antigeny v oblasti 40 a 50 kDa, nejčastěji kolem 44 a 47 kDa. Reakce se objevila i v oblasti kolem 18 kDa. V oblastech kolem 25 a 35 kDa je pozorovatelná nespecifická reakce.



Graf 21 *): Počet vázajících se sér na antigeny TrH_C o určité molekulové velikosti - kachny infikované *T. regenti* 35. a 40. d.p.i. V experimentu bylo testováno celkem 13 sér, 7 od kachen nakažených *T. regenti* a 6 od naivních kachen. Protilátky 35. a 40. d.p.i. reagovaly s antigeny v oblasti mezi 40 a 50 kDa, nejčastěji kolem 42 a 45 kDa. Zůstává reakce i v oblasti kolem 19 kDa. V oblasti kolem 23 a 35 kDa je pozorovatelná nespecifická reakce.

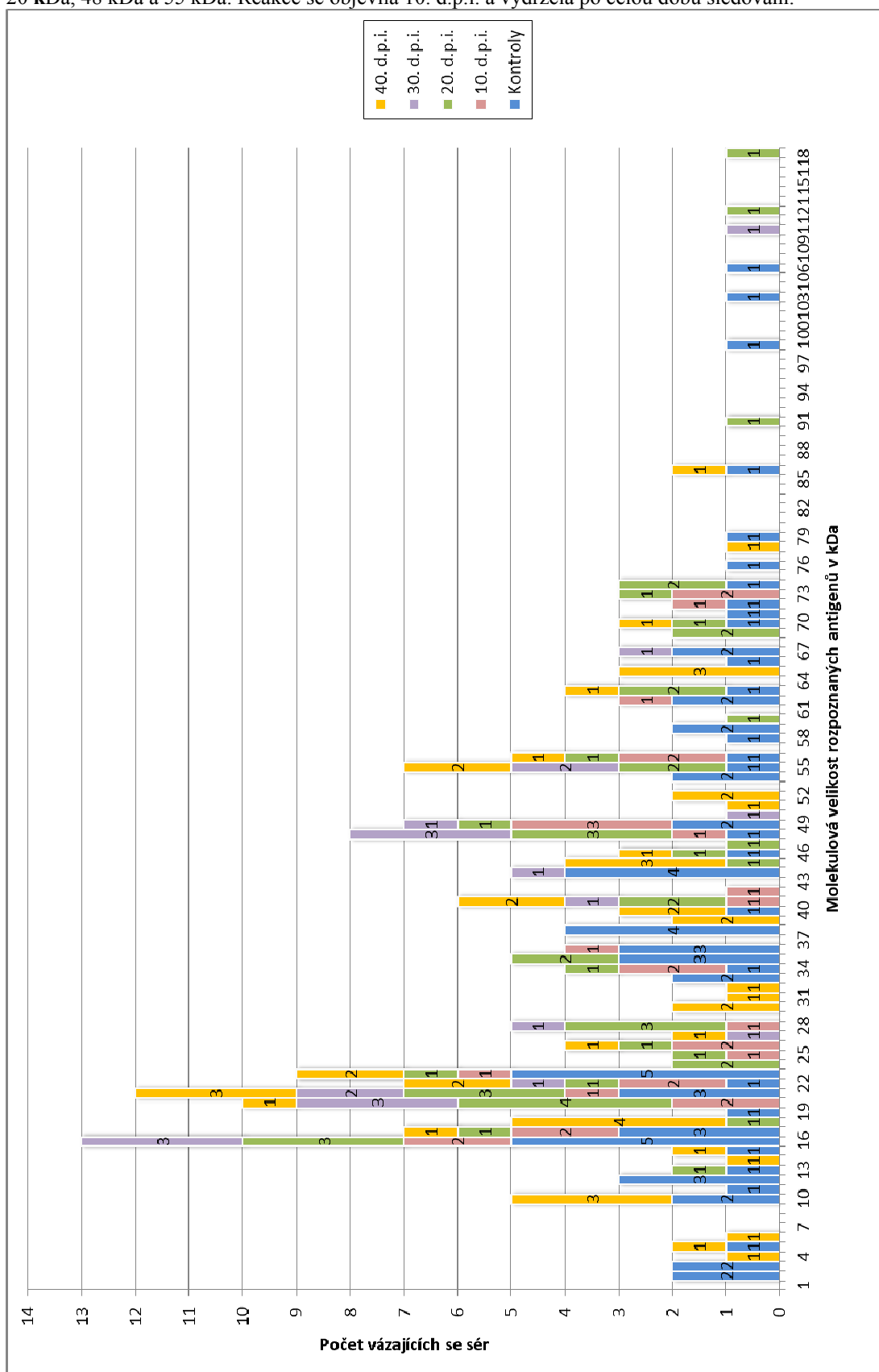


Graf 22 *): Počet vázajících se sér na antigeny TrH_C o určité molekulové velikosti – divoké kachny opakovaně reinfikované *T. regenti*¹ V experimentu bylo testováno celkem 37 odebraných sér od 6 kachen nakažených *T. regenti* a 2 naivních kachen; 20. d.p.i. po 4. infekci - 5 sér; 10. d.p.i. po 4. infekci - 5 sér; 10. d.p.i. po 3. infekci - 5 sér, 10. d.p.i. po 2. infekci - 6 sér, 10. d.p.i. - 6 sér, kontroly - 10 sér. Protilátky nejčastěji reagovaly s antigeny v oblastech kolem 19 kDa, 42 kDa, 48 kDa a 55 kDa. Tyto reakce se objevily již 10 d.p.i. po první infekci a až na reakci kolem 55 kDa vydržely po celou dobu sledování.

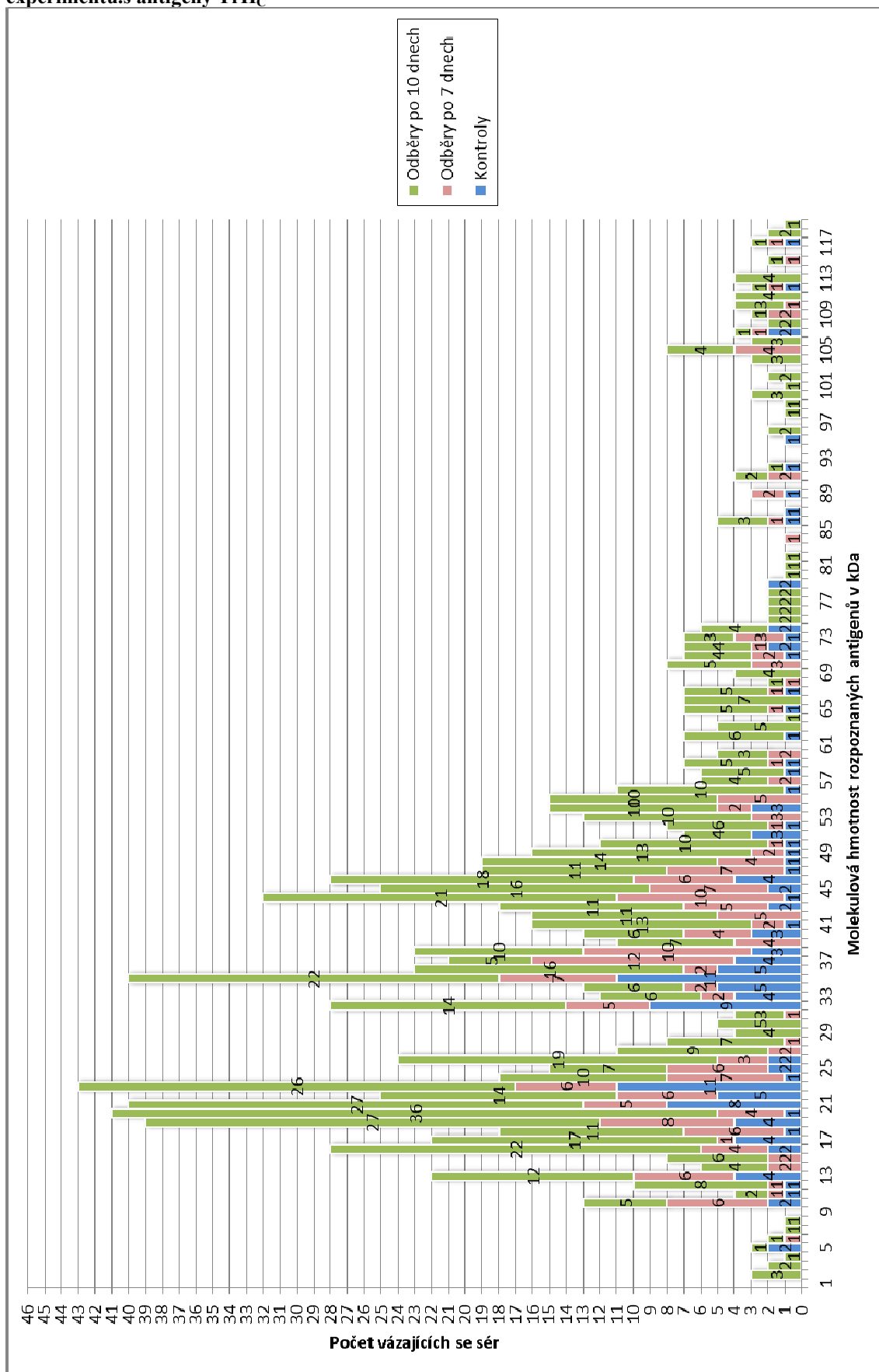


¹ V Grafu se u odběru 10. den po 2. reinfekci objevuje reakce s danou velikostí antigenu častěji, než odpovídá počtu experimentálních kachen. Je to způsobeno tím, že při zaokrouhlování na celé kDa byly k této hodnotě přiřazeny 2 antigeny těsně pod sebou

Graf 23 *): Počet vzájemných se sér na antigeny TrH_C o určité molekulové velikosti – plně imunokompetentní divoké kachny infikované *T. regenti*. V experimentu bylo testováno celkem 26 odebraných sér od 4 kachen nakažených *T. regenti* a 2 naivních kachen; 40. d.p.i. - 4 séra; 30. d.p.i. - 4 séra; 20. d.p.i. - 4 sér; 10. d.p.i. - 4 sér, kontroly – 10 sér. Protilátky nejčastěji reagovaly s antigeny v oblastech kolem 20 kDa, 48 kDa a 55 kDa. Reakce se objevila 10. d.p.i. a vydržela po celou dobu sledování.

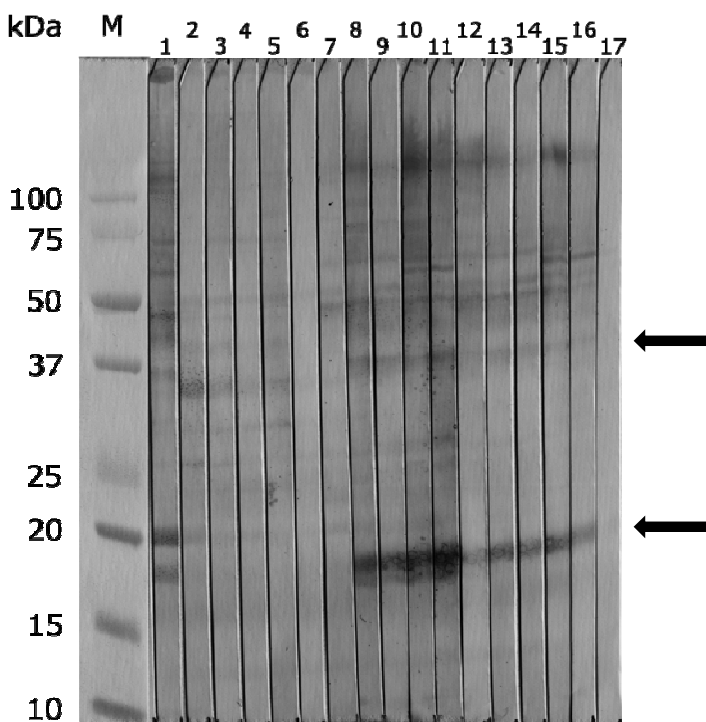


Graf 24 *): Souhrnná reakce všech sér kachen infikovaných *T. regenti* získaných v průběhu celého experimentu.s antigeny TrH_C



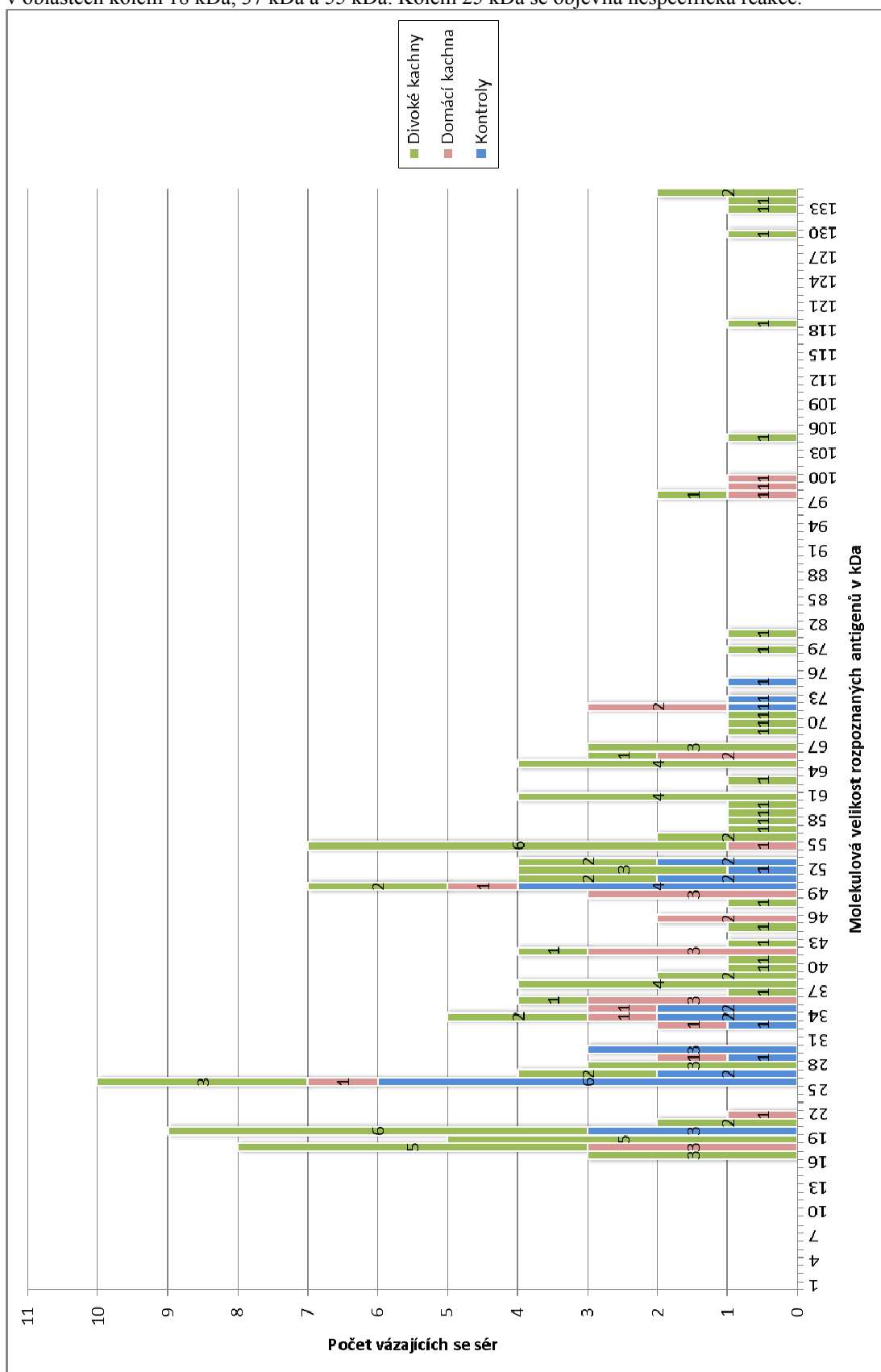
5.5 Western blot s homogenátem schistosomul *T. regenti* - IgY

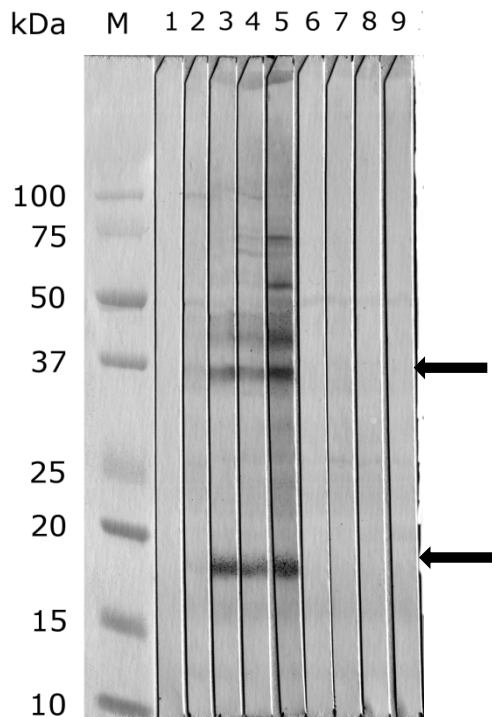
Z důvodu obtížného získávání materiálu a omezení počtu usmrcených kachen, z jejichž míchy byla schistosomula získávána, jsme v tomto experimentu vyzkoušeli pouze reakce vybraných sér z jednotlivých skupin infikovaných kachen. Použili jsem séra domácích kachen, u kterých byly uskutečněny odběry v intervalu 10 dní od infekce (obrázek 7) a séra ze skupiny opakovaně reinfikovaných divokých kachen (obrázek 6). Séra testovaných kachen rozpoznávala antigeny již 10. d.p.i., ale silnější reakci bylo možné pozorovat teprve 20. d.p.i. Všechny infikované kachny od 20. d.p.i. rozpoznávaly antigeny v oblasti kolem 37 kDa a 18 kDa, séra naivních kachen s těmito antigeny nereagovala. V oblasti 26 kDa docházelo k nespecifické vazbě na antigen. U skupiny reinfikovaných divokých kachen byla od 40. d.p.i. zaznamenána reakce s antigeny v oblasti odpovídající 55 kDa a 61 kDa. Počet sér kachen infikovaných *T. regenti* reagujících s antigeny TrH_S o určité molekulové velikosti je zobrazen v grafu 25. Na obrázku 8 je provedeno srovnání reakcí vybrané kachny jak s antigeny z homogenátu cercárií *T. regenti*, tak s antigeny z homogenátu ze schistosomul *T. regenti*. Můžeme zde sledovat, že ačkoli v případě antigenů z TrH_C byla v oblasti kolem 37 kDa zaznamenána nespecifická reakce, totéž sérum se váže v případě TrH_S specificky.



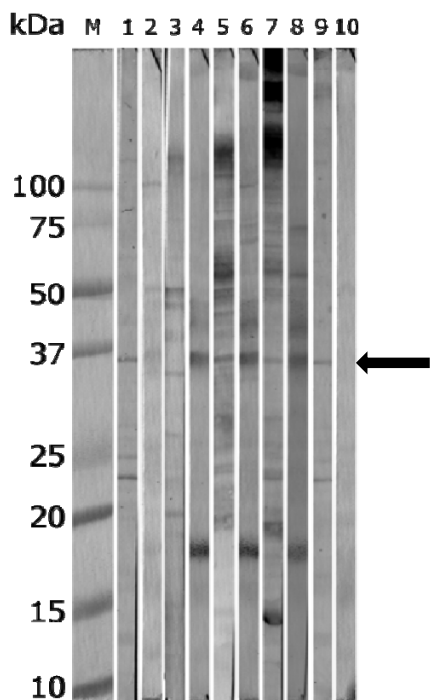
Obrázek 6: Reakce sér kachen opakovaně reinfikovaných *T. regenti* na imunoblotu s antigeny TrH_S; M – Markery; 1- divoká kachna (dále jen DK) 10. d.p.i. po 2. infekci; 2-6 naivní DK 10., 20., 30., 40., 50. den; 7-11 DK 10. den po 1. infekci, 10. den po 2. infekci, 10. den po 3. infekci, 10. den po 4. infekci a 20. den po 4. infekci; 12-16 - DK 10. den po 1. infekci, 10. den po 2. infekci, 10. den po 3. infekci, 10. den po 4. infekci a 20. den po 4. infekci; 17 – sekundární protilátka

Graf 25*): Počet vázajících se sér na antigeny TrH₅ o určité molekulové velikosti – výběr několika jedinců ze skupiny reinfikovaných kachen a domácích kachen infikovaných *T. regenti*. V experimentu bylo testováno celkem 26 odebraných sér od 4 kachen nakažených *T. regenti* a 2 naivních kachen; reinfikované divoké kachny – 11 sér, domácí kachny - 4 séra, kontroly – 9 sér. Protilátky nejčastěji reagovaly s antigeny v oblastech kolem 18 kDa, 37 kDa a 55 kDa. Kolem 25 kDa se objevila nespecifická reakce.





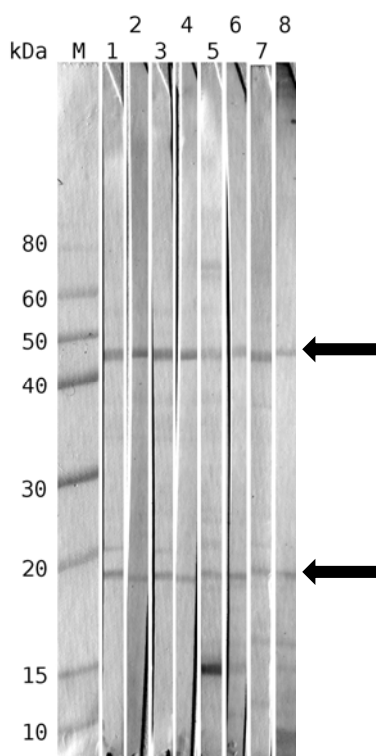
Obrázek 7: Reakce sér domácích kachen infikovaných *T. regenti* na imunoblotu s antigeny TrH_S; M – markery, 1 – sekundární protilátka; 2-5 domácí kachna 10., 20., 30., 40. d.p.i., 6-9 naivní kachna 10., 20., 30., 40. den



Obrázek 8: Srovnání reakce vybrané kachny proti antigenům z cercárií (TrH_C) a proti antigenům ze schistosomul (TrH_S); M – markery; 1 – domácí kachna (dále jen K) 10. d.p.i. s TrH_C; 2 – K 10. d.p.i. s TrH_S, 3 – K 20. d.p.i. s TrH_C; 4 – K 20. d.p.i. s TrH_S; 5 – K 30. d.p.i. s TrH_C; 6 – K 30. d.p.i. s TrH_S; 7 – K 40. d.p.i. s TrH_C; 8 – K 40. d.p.i. s TrH_S; 9 - naivní kachna 40. den s TrH_C, 10 - naivní kachna 40. den s TrH_S.

5.6 Western blot IgY – homogenáty *T. szidati*

Séra kachen nakažených *T. szidati* rozpoznávala již při testování prvního odběru po infekci dva antigeny, v oblasti kolem 19 kDa a v oblasti 45-47 kDa, jak je ukázáno na grafu 26, který ukazuje četnost opakovaně rozpoznaných antigenů v závislosti na jejich molekulové hmotnosti. Na tyto antigeny se vázaly i IgY ze sér kontrol, jedná se tak o nespecifickou reakci. Tato tendence zůstávala shodná i u všech dalších odběrů. Reakci s těmito antigeny ukazuje obrázek 9, antigeny jsou označeny šipkou. Zaznamenali jsme reakce i s několika dalšími antigeny, například sérum na stripu 5 rozpoznávalo navíc dva antigeny kolem molekulové velikosti 70 kDa a 15 kDa. Séra na stripu 7 a 8 rozpoznávala 2 antigeny v oblasti mezi 20 a 15 kDa. Tyto reakce se však objevovaly pouze u jednotlivců. V jejich rozpoznávání jsme nezaznamenali žádnou pravidelnost.



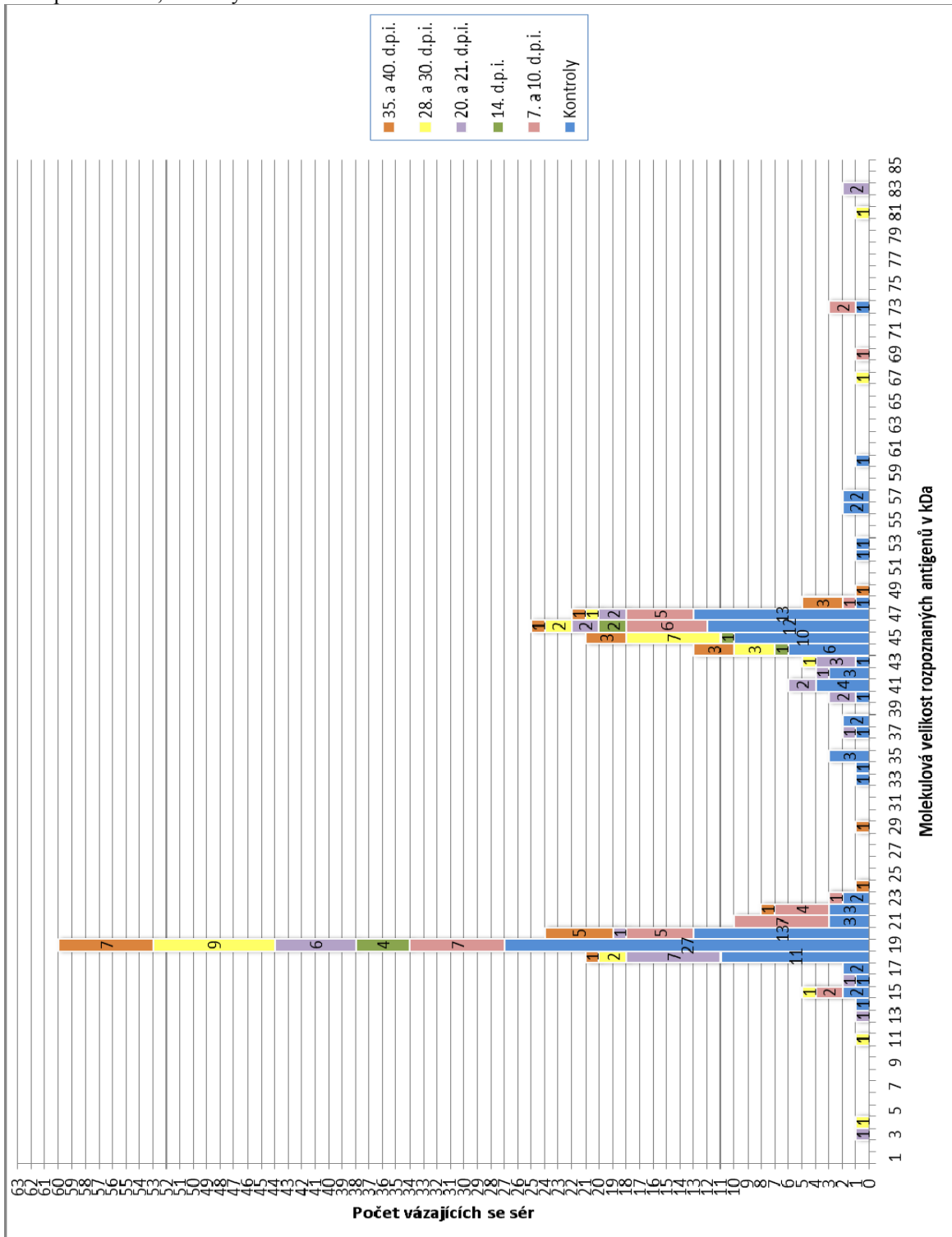
Obrázek 9: Reakce sér kachen infikovaných *T. szidati* na imunoblotu s antigeny TsH_C. M – markery; 1- domácí kachna (dále jen K) 7. d.p.i., 2 – K 35. d.p.i., 3 - naivní domácí kachna (dále jen NK) odběr 7. den, 4 – NK odběr 35. den, 5 – divoká kachna (dále jen DK) 10. d.p.i., 6 –DK 40. d.p.i., 7 – naivní divoká kachna (dále jen NDK) 10. den, 8 – NDK 40. den

5.7 Ověření zkřížené reaktivity pomocí Western blotu IgY - séra kachen s *T. regenti* proti homogenátu cercárií *T. szidati*

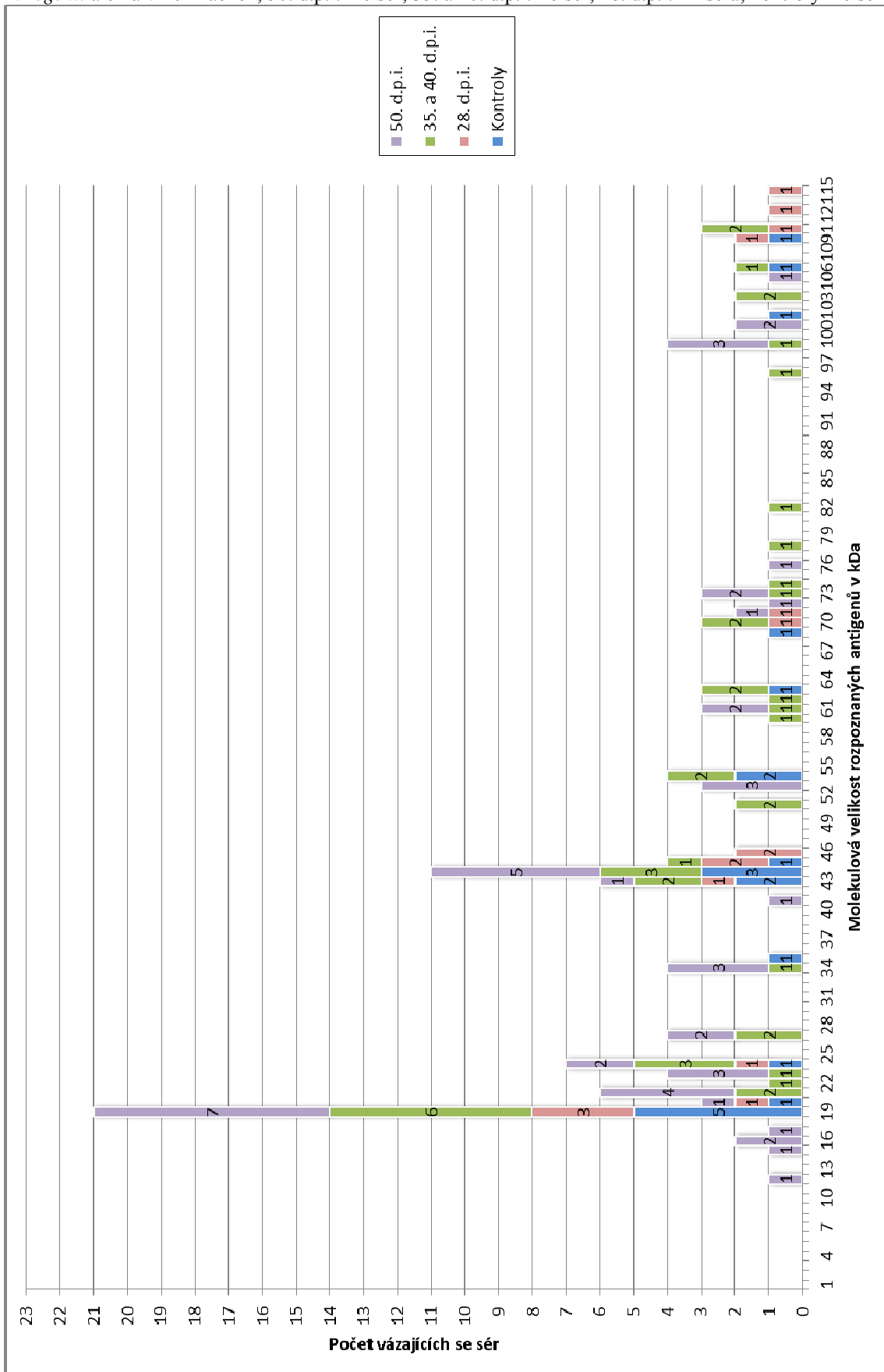
Pomocí imunoblotu jsme testovali také zkříženou reaktivitu mezi druhy *T. regenti* a *T. szidati*. PVDF membránu s antigenem z TsH_C jsme otestovali se séry kachen infikovanými *T. regenti* z odběrů odpovídajících 40. a 50. d.p.i. Na grafu 27 je patrné, že se objevila reakce

v oblastech odpovídající 19 kDa a 44 kDa. Tyto oblasti rozpoznávala i séra kontrol. Podobnou reakci bylo možné pozorovat i na imunoblotech, kde byla testována reakce anti TsH_C IgY u *T. szidati* (graf 26).

Graf 26*): Počet vázajících se sér na antigeny TsH_C o určité molekulové velikosti - kachny infikované *T. szidati*. V experimentu bylo testováno celkem 94 odebraných sér od 12 kachen nakažených *T. szidati* a 10 nainvních kachen; 35. a 40. d.p.i. - 10 sér; 28. a 30 d.p.i. -12 sér; 20. a 21. d.p.i. – 12 sér, 14. d.p.i. – 4 séra, 7. a 10. d.p.i. – 12 sér, kontroly – 44 sér



Graf 27*): Počet sér z kachen infikovaných *T. regenti* zkříženě se vázajících na antigeny TsH_C o určité molekulové velikosti. V experimentu bylo testováno celkem 22 odebraných sér od 16 kachen nakažených *T. regenti* a 6 naivních kachen; 50. d.p.i. – 6 sér; 35. a 40. d.p.i. – 6 sér; 28. d.p.i. – 4 séra; kontroly – 6 sér



5.8 Western blot TrCB1.1 a TrCB2 – IgY

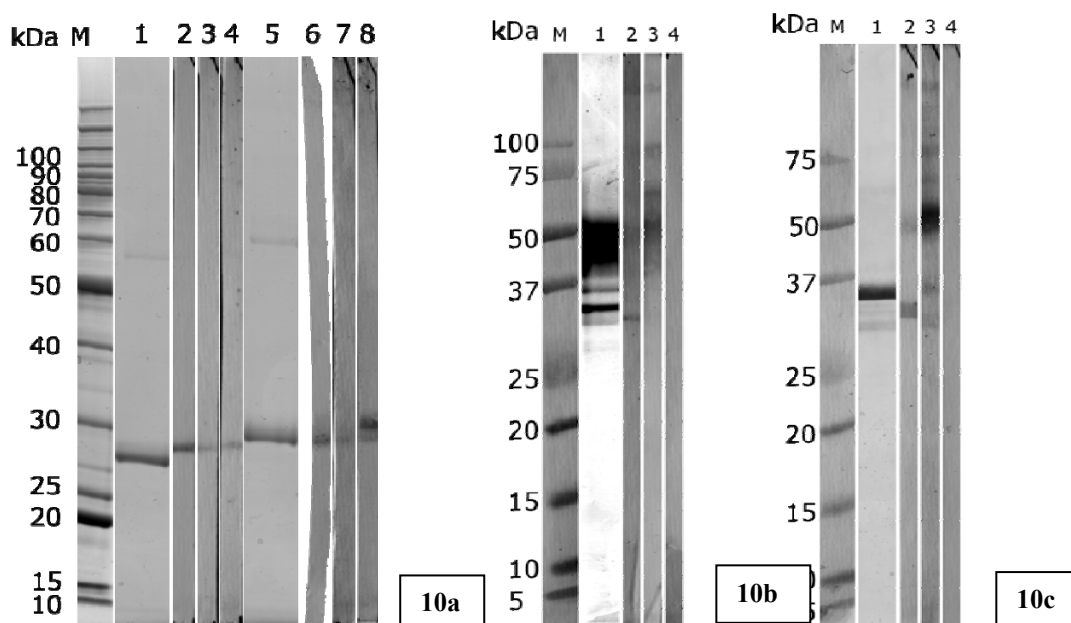
Pomocí imunoblotu jsme testovali reakci sér získaných při posledních odběrech (odpovídají době mezi 30. a 50. d.p.i. v závislosti na testované skupině) s rekombinantními cathepsiny TrCB1.1 a TrCB2. Použili jsme jak intaktní (glykosylovanou) formu obou cathepsinů, tak i TrCB1.1 a TrCB2 po deglykosylaci. Při elektroforéze a přeměření v programu Quantity One se molekulová velikost deglykosylovaného CB1.1 pohybovala v rozmezí 33 až 35 kDa. Velikost CB2 v intaktní formě se pohybovala v rozmezí 28 - 30 kDa. Výsledky experimentu jsou shrnuty v tabulce 8.

Všechna séra včetně kontrolních rozpoznávala glykosylovaný i deglykosylovaný TrCB2. Jednalo se o výběr sér ze skupin nákazy po 7 dnech, po 10 dnech, s opakovanou infekcí (*T. regenti* i *T. szidati*) a skupiny nakažené v době zralosti imunitního systému. U několika sér jsme zaznamenali silnější vazbu, objevovala se však napříč všemi experimentálními skupinami a vyskytla se i u naivních kachen. Dále bylo možné vysledovat, že séra divokých kachen se vážou na 2 proužky na rozdíl od sér kachen domácích, ta se vážala pouze na jeden proužek. Obrázek 10a dokumentuje reakci vybraných sér s nativním i deglykosylovaným TrCB2.

Deglykosylovaný TrCB1.1 byl rozpoznáván jen některými séry. Pro zobecnění můžeme konstatovat, že častěji byl rozpoznáván séry získanými z divokých kachen. Kontroly s deglykosylovaným TrCB1.1 nereagovaly. S intaktním TrCB1.1 byla testována séra, u kterých byla zaznamenána pozitivní reakce při imunoblotu s jeho deglykosylovanou formou. Ve většině případů byl TrCB1.1 opět rozpoznán. Na obrázku 10b jsou uvedeny příklady reakce vybraných sér s intaktním TrCB1.1 a na obrázku 10c s deglykosylovaným TrCB1.1.

Tabulka 8: Reakce kachních sér s cathepsiny CB1.1 a CB2, **Tr** - pokusné kachny byly nakaženy *T. regenti*, **Ts** - pokusné kachny byly nakaženy *T. szidati*, **Ko** - kachny nebyly infikovány a sloužily jako kontroly, + pozitivní reakce, – reakce nezaznamenána, prázdná buňka – sérum nebylo testováno

	Nákaza druhem	Kachna	CB2 intakt	CB2 degl.	CB1.1 degl.	CB1.1 gl.
<i>Anas platyrhynchos</i> f. <i>domestica</i> 28. d.p.i.	Tr	A1	+		-	
		A2	+		-	
		A3	+		+	+
		A4	+	+	-	
	Ts	A1	+		-	
		A2	+	+	-	
	Ko	A3	+		-	
		A4	+	+	-	
<i>Anas platyrhynchos</i> f. <i>domestica</i> 35. d.p.i.	Tr	B1	+		-	
		B2	+		-	
	Ts	B1	+		-	
		B2	+		-	
	Ko	B3	+		-	
		B4	+		-	
<i>Anas platyrhynchos</i> f. <i>domestica</i> 40. d.p.i.	Tr	C1	+		-	
		C2	+	+	-	
	Ts	C1	+		-	
		C2	+		-	
		C3	+		+	+
		C4	+	+	-	
	Ko	C5	+		-	
		C6	+	+	-	-
<i>Anas platyrhynchos</i> f. <i>domestica</i> 40. d.p.i.	Tr	D1	+		-	
		D2	+		-	
	Ts	D1	+		+	+
		D2	+		+	-
	Ko	D3	+		-	
		D4	+		-	
Opakované infekce (4×) <i>Anas platyrhynchos</i> 50. d.p.i.	Tr	E1	+	+	-	
		E2				
		E3	+		+	+
		E4	+		+	+
		E5	+		+	+
		E6	+	+	-	
Opakované infekce (2×) <i>Anas platyrhynchos</i> 40. d.p.i.	Ts	E1	+	+	+	-
		E2	+		-	
<i>Anas platyrhynchos</i> 40. d.p.i.	Ko	E1	+		+	+
		E2	+	+	-	
		E3	+		-	
Infekce kachen s plně zralým imunitním systémem 40.d.p.i.	Tr	F1	+	+	+	+
		F2	+		-	
		F3	+		+	+
		F4	+		+	+



Obrázek 10a: Reakce vybraných kachních sér s deglykosylovaným a glykosylovaným CB2; M-markery; 1- CB2 deglykosylovaný na SDS-PAGE; 2 - kachna nakažená *T. regenti* 50 .d.p.i.; 3 -kachna nakažená *T. szidati* 40. d.p.i.; 4 - naivní kachna; 5 - CB2 nativ na SDS-PAGE; 6 - kachna nakažená *T. regenti* 50. d.p.i.; 7 - kachna nakažená *T. szidati* 40. d.p.i.; 8 - naivní kachna

Obrázek 10b: Reakce vybraných kachních sér s intaktním CB1; M-markery; 1- CB1 (glykosylovaný) na SDS-PAGE; 2 - kachna nakažená *T. regenti* 50 .d.p.i.; 3 -kachna nakažená *T. szidati* 40. d.p.i.; 4 - naivní kachna

Obrázek 10c: Reakce vybraných kachních sér s deglykosylovaným CB1; M-markery; 1- CB1 (deglykosylovaný) na SDS-PAGE; 2 - kachna nakažená *T. regenti* 50 .d.p.i.; 3 -kachna nakažená *T. szidati* 40. d.p.i.; 4 - naivní kachna

5.9 Western blot IgM – homogenáty cercárií *T. regenti*

Imunoblotty, kde jsme analyzovali vazbu kachních protilátek třídy IgM na antigeny cercárií, nepřinesly žádné relevantní výsledky. „Anti duck IgM“ protilátka rozpoznávala více složek kachního séra, nejen Fc oblast IgM . Tato nespecifická reakce se objevovala i po prodloužení doby blokace z 2 na 3 hodiny a změně složení a koncentrace blokovacího pufru. Protilátka se nespecificky vázala při použití celé doporučené škály ředění. Výsledkem bylo značné množství nespecifických reakcí – bloty nebylo možné vyhodnotit.

5.10 Sekvence TsTPI získaná pomocí degenerovaných primerů

Na základě sekvence TsTPI od dr. Martina Kašného jsme navrhli expresní primery. Tyto primery však nenasadaly na templátovou DNA. Rozhodli jsme se proto nejprve navrhnout primery degenerované, pomocí nichž bychom získali přesnou sekvenci TsTPI. Při navrhování degenerovaných primerů jsme zohlednili podobu sekvence TPI známou od jiných motolic.

Pomocí degenerovaných primerů jsme získali po osekvenování v Laboratoři sekvenace DNA nukleotidovou sekvenci dlouhou 756 bp. Po vyhodnocení v programu Blast®

Basic Local Alignment Search Tool, který porovnal naši sekvenci s podobnými sekvencemi v genové databázi, jsme zjistili, že je tato sekvence homologní z 82 % s TPI *S. heamatobium* (AB114683.1) a z 81 % homologní k TPI *S. mansoni* (XM_002571815.1, M83294.1). Podle této sekvence jsme navrhli expresní primery. V současné době máme sekvenací potvrzenou přítomnost genu pro TsTPI v expresním systému buněk BL21 *E. coli*.

Uvádíme zde aligmet Naší sekvence (TsTPI-LT) a sekvence získané od dr. Martina Kašného (TsTPI-MK). Žlutě jsou označena místa, dle kterých jsme navrhli expresní primery.

TsTPI-LT	1	ATGTCTGGATCTCGCACATTTTTTT	GTTGGTGGGAATTGGAAGATGAATGGTAGCCATTCA	60
TsTPI-MK	1	ATGTCTAGATCTCGCAAATTTTTTT	GTTGGTGGAAATTGGAAGATGAATGGAAGCCATTCA	60
TsTPI-LT	61	GATAATGACAAATTGATTCAAATCTCTCTGAAGCTCAGTTTGGCGAAAATATAGAAGTC		120
TsTPI-MK	61	GATAATGATAAGTTGATTCAAATCTCTCTGAAGCTCAGTTTGGCGAAAATATAGATGTC		120
TsTPI-LT	121	TTGGTGGCTCCACCATCTATCTATCTGCGTGAAGTCCGGAATCGTTTAAAGAAAAATATT		180
TsTPI-MK	121	TTGGTGGCTCCACCATCTATCTATCTGCGTGAAGTCCGGAATCGTTTAAAGAAAAATATA		180
TsTPI-LT	181	CATGTTGCTGCCAAAACTGCTACAAAAGTCCCGAAGGGTGCTTTTACTGGTGAAATTAGC		240
TsTPI-MK	181	CCTGTTGCTGCCAAAACTGCTACAAAAGTCCCGAAGGGTGCTTTTACTGGCGAAATTAGC		240
TsTPI-LT	241	CCCGCAATGATAAAAAGATGTTGGCTGTGAATGGGTAATACTTGGTCATTCTGAAAGAAGA		300
TsTPI-MK	241	CCCCAATGATGAAAGATGTTGGCTGCGAATGGGTGATACTTGGCCATTCTGAAAAATA		300
TsTPI-LT	301	AATATTTTTGGCGAATCTGATGAGCTCATTGCCGAAAAGTTCAACACGCCATTGCTGAA		360
TsTPI-MK	301	AATATTTTTGGCGAATCTGATGAGCTCATTGCCTACAAAAGTTCAACACGCCATTGCTGAA		360
TsTPI-LT	361	GGCTTAAGCGTCATTGCATGCATTGGTGAAACATTACCAGAACGTGAAGCTAATAAAAACA		420
TsTPI-MK	361	GGCTTAAGCGTCATTGCATGTATTGGTGAAACATTACCCCAACGTGAAGGTAATAAAAACA		420
TsTPI-LT	421	GAGGAAGTATGTCTAAGACAGTTAAAAGCAATCGCAAACAAAATAAAGTCGGCTGATGAA		480
TsTPI-MK	421	GATGAAGTATGTCTAAGACAGTTAATTGCAATCGCAAACAAAATAAAGTCGGCTGATGAA		480
TsTPI-LT	481	TGGCAAAGAATAGTTGTTGCCATATGAACCTGTATGGGCTATTGGTACAGGTAAAGTTGCC		540
TsTPI-MK	481	TGGCAAAGAATATTTGTTGCCATATGAACCTGTATGGGCTATTGGTACAGGTAAAGTTGCC		540
TsTPI-LT	541	ACACCTACACAAGCACAGAAGTTCATAATTTTCTAAGAAAATGGTTAAAATCTAATGCA		600
TsTPI-MK	541	ACACCTACACAAGCACAGTAAGTTCATAATTTTCTAAGAAAATGGTTAAAATCTAATGCA		600
TsTPI-LT	601	CCAGCTGGTGTGATGAGAAATTACGCATAATATACGGCGGCTCAGTGACTGCTGCTAAT		660
TsTPI-MK	601	CCACCTGGTGTGATGAAAAATTACGCATTATATACGGCGGCTCAGTGACTGCTGCTAAT		660
TsTPI-LT	661	TGTAAAGAATTAGCTCAACAACCTGATGTCCGATGGGTTTTAGTCGGTGGTGCTTCATTG		720
TsTPI-MK	661	TGTAAAGGAATTAGCTCAGAAACCTGATGTCCATGGATTTTTAGTTGTGGGTGCTTCATTG		720
TsTPI-LT	721	AAACCAGAATTTATTGACATATGTAAAGCCAGACAA	756	
TsTPI-MK	721	AAACCAGATTTTATTGACATATGTTAAGCTAGACAA	756	

6 Diskuse

Tato práce si kladla za cíl popsat vývoj humorální imunitní odpovědi přirozeného definitivního hostitele proti antigenům vývojových stadií ptačích schistosom druhů *T. regenti* a *T. szidati*. Navazovala na výzkum popisující tento typ imunitní odpovědi u nespecifických hostitelů (člověk, myš) (Horák et al. 1998, Lichtenbergová et al. 2008, Chanová et al. 2012).

Během výzkumu jsme chtěli sledovat hladiny imunoglobulinů třídy IgM, které jsou spojeny s časnou fází protilátkové odpovědi (Ratcliffe 2006) a třídy IgY. Jedná o evoluční prekurzor savčích IgG a IgE (Taylor et al. 2009), zastává tak v ptačím imunitním systému pravděpodobně funkce obou těchto tříd imunoglobulinů.

Data získaná otestováním sér experimentálně infikovaných kachen druhem *T. regenti* v ELISA testu ukazují signifikantní zvýšení hladiny anti TrH_C IgY v době odpovídající 20. d.p.i. Jak zjistili Liu and Higinis 1990, 5 dní po vylíhnutí se u kachňat snižuje hladina IgY protilátek, které jsou původem z mateřského organismu. Nárůst hladiny specifických IgY a IgM byl zaznamenán až kolem 20. dne věku kachny. Hladina specifických IgY se poté pohybovala v rozmezí hodnot OD 1,5 – 2,5; pokud došlo k zvýšení hladiny IgM, obvykle se pohybovala v rozmezí hodnot 0,6 - 1,2. Naproti tomu zůstávaly hladiny obou typů protilátek v sérech kontrol stále na nižší úrovni, v rozmezí hodnot 0 – 0,5. Domácí kachny v našem experimentu byly infikovány ve věku 7 až 10 dnů. V době 20. d.p.i. se jejich věk pohyboval kolem 30 dnů, tedy ve věku postupného dozrávání imunitního systému. V případě experimentálně nakažených divokých kachen byla nákaza prováděna u skupiny s opakovanými infekcemi ve věku 21 dnů a infekce plně imunokompetentních kachen byla provedena ve věku odpovídajícím 40 dnům. V tomto věku hladiny IgM protilátek dosahují hodnot nalézáných u dospělých zvířat (Ng and Higgins 1986). Séra kachen infikovaných *T. szidati* podobnou tendenci neukazovala. Pohybovala se stále na stejné úrovni OD jako séra naivních kachen. Po experimentálních infekcích jsme ověřovali nákazu kachen druhem *T. szidati* přítomností vajíček v jejich trusu. Miracidia vylíhla z vajíček byla vždy přítomna, ale většinou ve velmi malém počtu. Tato skutečnost naznačuje, že se experimentální kachny málo nakazily. Intenzitu reakce také mohlo ovlivnit, kolik cercárií zahynulo již při penetraci. Pokud penetrovalo jen minoritní množství cercárií, imunitní systém neměl příležitost vytvořit specificky se vážající protilátky.

ELISA test zaměřený na zjišťování hladiny IgM u infikovaných domácích kachen bohužel nepřinesl příliš mnoho výsledků. Hladina anti TrH_C IgM se v průběhu celého experimentu pohybovala na stejné úrovni jak u naivních, tak u infikovaných kachen (OD₄₅₀ 0

– 0,6). Pouze u skupiny reinfikovaných divokých kachen a skupiny nakažené v době plné imunokompetence byly zaznamenány změny v hladině specifických IgM.

IgM se objevuje již 72 hodin po inokulaci antigenu, nejvyšší hladinu lze zaznamenat v období odpovídajícím 4 - 8 dnům po setkání s antigenem (Higgins 1975 dle Tizzard et al. 2002), navíc se jedná o protilátky s krátkou životností (Leslie and Clem 1970). Při intervalech odběru odpovídajících 7 a 10 dnům po infekci se tak mohlo stát, že prudké zvýšení IgM nemuselo být vůbec zaznamenáno. Odběr v době odpovídající 7. d.p.i. spadá teoreticky do popsaného intervalu, je však na jeho horní hranici. U experimentálních kachen, tak mohlo dojít k zvýšení hladiny IgM v časnější fázi. Dalším možným vysvětlením, proč bylo zaznamenané zvýšení IgM jen u skupin divokých kachen (nakažovaných ve vyšším věku) a ne u domácích kachen, může být nezralost imunitního systému domácích kachen v době infekce. V době předpokládané největší produkce IgM byl jejich věk nižší než 20 dnů, protilátky tak ještě nemusely být tvořeny v dostatečné míře.

Zvýšení hladiny anti TrH_C IgY protilátek mohlo být způsobeno také vývojem dalších vývojových stadii parazita, která mohou exprimovat rozpoznávané antigeny ve větší míře, než to dělaly cercárie. Vývoj *T. regenti* je velmi rychlý, je odhadován na pouhých 23 - 25 dní od infekce (Horák et al. 1999; Kolářová et al 2001). Již 1,5 dne po infekci lze nalézt schistosomula v periferních nervech. Dospělci se objevují v nosní sliznici již 13. d.p.i. (Hrádková and Horák 2002).

Metodou ELISA byla otestována i séra získaná při mysliveckém odstřelu na Dvorském rybníce. Při mikroskopickém vyšetření stěrů střev, cév mezenteria a nosních sliznic nebyla prokázána aktuální infekce ptačími schistosomami. Nicméně se jednalo o dospělé kachny, které se v minulosti mohly s těmito parazity setkat. Hladina anti TrH_C IgY nedosáhla u žádného z testovaných sér stejné úrovně jako u experimentálně infikovaných kachen, ale většinou byla vyšší než u experimentálních kontrol. Séra kachen DKC a DKE, u kterých byly při vyšetření nalezeny jiné parazity (DKC - tasemnice z čeledi Hymenolepididea, DKE vajíčka *Capillaria sp* a pijavka *Theromyzon sp.*) dosahovala nejvyšších hodnot OD₄₅₀ z celé skupiny. Dá se předpokládat, že existuje zkřížená reaktivita mezi některými konzervovanými antigeny různých druhů parazitů. Nelze ovšem vyloučit, že obě kachny v minulosti infekci ptačími schistosomami prodělaly. Hladina anti TrH_C IgM u odstřelených kachen se pohybovala u většiny testovaných sér v rozmezí 0,1 - 0,4. Pokud by v minulosti proběhla u těchto kachen nákaza ptačími schistosomami, nebyly by již v akutní fázi infekce, což naměřené hodnoty potvrzují.

Uvedené výsledky metody ELISA s použitím „anti duck IgM“ je nutno brát s jistou rezervou, neboť jsme při pozdějších experimentech na Western blotu zjistili, že se tyto protilátky nespecificky vážou na velké množství složek kachního séra.

Pomocí metody Western blotu jsme zjišťovali, jaké spektrum antigenů je rozpoznáváno infikovanými kachnami a jak se mění v průběhu infekce. Testovali jsme vazbu protilátek třídy IgY a IgM na homogenátech z cercárií a schistosomul *T. regenti* a cercárií *T. szidati*. Bohužel jsme byli nuceni experimenty s IgM přerušit kvůli nespecifické vazbě protilátek na PVDF membránu a na velkou část složek kachního séra, jak je uvedeno výše.

Experimentálně jsme ověřili vazbu IgY na antigeny TrH_C. Na jedné PVDF membráně byla vždy testována séra z jednoho odběru. Prvnímu odběru tedy odpovídala séra získaná 7. a 10. d.p.i. Již v této době od infekce se objevila u většiny infikovaných sér reakce v oblasti 47-49 kDa a 45 - 47 kDa. Tyto antigeny byly rozpoznávány i v dalších intervalech po celou dobu sledování humorální odpovědi. Od 14. a 20. d.p.i. byly rozpoznávány séry všech infikovaných kachen. Naproti tomu séra kontrol tyto antigeny nerozpoznávala, takže se jednalo o specifické reakce.

Dále jsme zaznamenali specifickou reakci v oblasti v rozmezí 18 – 20 kDa, která se rovněž objevila u některých infikovaných kachen již při prvním odběru (7. a 10. d.p.i.) a zůstala cílem protilátek i po zbývající dobu sledování. U některých infikovaných kachen jsme také zaznamenali reakci v oblastech kolem 20 kDa, 55 kDa a v oblasti nad 100 kDa. Velikost bandu nelze přesněji určit, protože se v této oblasti nepovedlo převést na membránu standardy odpovídající této vysoké molekulové velikosti. Reakce v oblasti kolem 20 kDa byla pozorovatelná od 20. d.p.i., téměř výhradně u sér z divokých kachen. Objevovala se jak u opakovaně infikovaných kachen, tak u kachen infikovaných v době plné zralosti imunitního systému. Reakce proti většině významněji rozpoznávaných antigenů byla zaznamenána při druhém odběru (14. nebo 20. d.p.i.). Tato reakce byla pozorovatelná až do ukončení pokusu, u skupiny reinfikovaných kachen až do 50. dne po první infekci.

Po proměření v programu Quantity One jsme nebyli schopni přesněji určit velikost těchto specificky rozpoznávaných antigenů. Je to dáno zaprvé rozdílem, který vznikl při elektroforetické separaci na gelu a také použitím dvou markerů s rozdílným složením standardních proužků. Program Quantity One dopočítává dle zadaných standardů molekulovou velikost a i drobný posun skenovaného stripu membrány může ve výsledku vést k posunu hodnoty velikosti bandů až v jednotkách kDa.

Lichtenbergová et al. (2008) popsali reakci sér reinfikovaných myší i pacientů s prodělanou cercáriovou dermatitidou v oblasti 50 kDa. V budoucnu by bylo vhodné ověřit,

zda se v našem případě jedná o stejný antigen porovnáním reakce sér infikovaných kachen a myši na jedné PVDF membráně, nebo ještě lépe po 2-D elektroforéze, popř. charakterizací pomocí hmotnostní spektrometrie.

V literatuře je možné dohledat různé antigeny lidských schistosom, které jsou rozpoznávány séry pacientů s prokázanou schistosomózou. V oblasti mezi 50 a 40 kDa, která byla v našem experimentu rozpoznávána všemi séry infikovaných kachen, připadají v úvahu glyceraldehyd-3P-dehydrogenáza (42 kDa), fosfoglycerát kináza (45 kDa) a fruktoso1,6 bisfosfát adoláza (44 kDa) (El Ridi et al. 1998, Lee et al. 1995, Mutapi et al. 2011).²

Séra kachen nakažených *T. szidati*, která jsme testovali na imunoblotu, rozpoznávala dva antigeny v oblasti kolem 19 kDa a v oblasti 45 - 47 kDa. Tyto antigeny byly rozpoznávány i séry naivních kachen, tudíž se pravděpodobně jednalo o nespecifické vazby. Stejná reakce se objevila při experimentálním ověřování zkřížené reaktivity mezi antigeny *T. regenti* a *T. szidati* - na PVDF membráně s homogenátem cercárií *T. szidati*, kde jsme testovali vazbu IgY z sér kachen infikovaných *T. regenti*, se objevila opět silná, ale evidentně nespecifická reakce v oblastech kolem 19 kDa a 44 kDa. Objevily se i další ojediněle rozpoznávané antigeny. Protože se jednalo pouze o jednotlivé případy, nelze z nich vyvozovat žádné závěry.

Při experimentálních infekcích ptačími schistosomami jsme používali kachny, které pocházejí z outbredních linií. Na základě svého genetického pozadí tak mohou reagovat individuálněji, než by reagovali inbrední jedinci. Tím si vysvětlujeme pozorované rozdíly v rozpoznávání některých antigenů. To, že imunitní odpověď je silně ovlivněna právě

² Glyceraldehyd-3P-dehydrogenáza je antigen o molekulové hmotnosti 42 kDa rozpoznávaný séry přirozeně rezistentních pacientů. Při experimentech indukoval 40% ochranu imunizovaných myši a křečků proti infekci cercáriemi *S. mansoni* a *S. haematobium* (El Ridi et al. 1998). Tento antigen je lokalizován v tegumentu schistosomul a dospělých červů.

Glykolytický enzym fosfoglycerát kináza byl pomocí imunofluorescenčně značených protilátek lokalizován ve všech buňkách dospělých červů i schistosomul, intenzivní fluorescenční signál byl pozorován v buňkách asociovaných s tuberkuly, ve svalech a v tegumentu. Jeho molekulová velikost byla určena jako 45 kDa (Lee et al. 1995).

Poslední z vybraných antigenů je 44 kDa velký enzym fruktoso 1,6 bisfosfát adoláza. Tento antigen vyskytující se ve dvou izoformách byl rozpoznáván protilátkami IgA (první izoforma) a IgG1 (druhá izoforma) z sér obyvatel Zimbabwe z oblastí s endemickým výskytem *S. haematobium* (Mutapi et al. 2011). Tyto antigeny byly lokalizovány v tělech dospělců a schistosomul, je ale možné, že jsou tyto proteiny přítomny i v těle cercárií.

genetickým pozadím, uvádí například Rosas et al. (2008), kteří srovnávali imunitní odpověď několika kmenů myši proti infekci *Leishmania mexicana*.

Lichtenbergová et al. (2008) popsali silnou reakci IgG ze sér opakovaně reinfikovaných myši a ze sér pacientů s potvrzenou cercáriovou dermatitidou s antigenem *T. regenti* v oblasti 25 kDa. Při testování kachních sér pomocí imunoblotu jsme v této oblasti pozorovali nespecifickou reakci. Není však vyloučeno, že se k antigenu v této oblasti vážou jak nespecifické IgY u kontrol, tak specifické protilátky u infikovaných kachen. Tuto skutečnost by bylo vhodné v budoucnu ověřit sledováním intenzity vazby k danému antigenu. Za použití 2-D blotu bychom mohli vyloučit, že se v této oblasti vyskytují dva či více antigenů, z nichž je například jeden rozpoznáván nespecificky.

Tento 25 kDa antigen detekovaný v práci Lichtenbergové et al. (2008) byl posléze určen jako trioso – fosfát izomeráza (Kašný et al. 2009). Na základě sekvence DNA pro TPI získané z druhu *T. szidati* byly navrženy primery a zahájena příprava rekombinantní formy TPI. Získaná sekvence po porovnání s DNA databázemi ukázala 82% podobnost s nukleotidovou sekvencí *S. hematobium*. Z 81 % byla shodná s genem TPI u *S. mansoni*. TPI je evolučně konzervovaný enzym podílející se na glykolýze, a podle naznačených výsledků podobnosti s jinými schistosomami se dá předpokládat, že bude zkříženě reagovat mezi jednotlivými druhy schistosom. Předpokládáme tedy, že když připravíme TPI podle sekvence získané z druhu *T. szidati*, budou ho rozpoznávat i séra kachen infikovaných *T. regenti*. Doufáme, že tato zkřížená reaktivita se nebude vyskytovat mezi jinými méně příbuznými druhy parazitů. Při splnění tohoto předpokladu by tak bylo možné TPI použít jako jednu složku diagnostického kitu k rozpoznání prodělané infekce ptačími schistosomami. Do termínu dokončení této práce jsme nestihli rekombinantní TsTPI připravit, proto jsme nebyli schopni otestovat vhodnost tohoto proteinu pro diagnostické účely. V současné době máme zaklonovaný plazmid v expresních buňkách BL21 *E. coli*.

Další z antigenů silně rozpoznávaných protilátkami třídy IgG i IgE sér myši reinfikovaných *T. regenti* i pacientů s cercáriovou dermatitidou, byl enzym glycerinaldehyd-3P-dehydrogenáza (Lichtenbergová et al. 2008). Reakce byla zaznamenána v oblasti odpovídající 34 kDa. V našem experimentu byl v oblasti kolem 35 kDa protilátkami kachen rozpoznáván antigen, jednalo se však opět o nespecifickou vazbu, neboť se na něj vážaly i protilátky neinfikovaných kachen. Ač se z posouzení reakce na membránách zdá, že je antigen rozpoznáván stejnou měrou jak séry kontrol, tak séry infikovaných kachen, bylo by vhodné jako v případě antigenu z oblasti 25 kDa využít měření denzity rozpoznávaných oblastí, popřípadě otestovat tuto reakci na 2-D blotu.

Pomocí imunoblotu jsme otestovali s několika vybranými séry kachen vazbu protilátek na antigeny obsažené v homogenátu 7 denních schistosomul *T. regenti*. Séra infikovaných kachen specificky rozpoznávala dva antigeny v oblasti 37 kDa a 18 kDa. Tato reakce se objevila již 10. d.p.i., silnější vazba na tyto antigeny je pozorovatelná až 20. d.p.i. Tyto antigeny byly rozpoznávány po celou dobu sledování. Reakce v oblasti 18 kDa se objevila i u některých sér testovaných na membráně s homogenátem z cercárií *T. regenti*. Je možné, že se jedná o stejný antigen a bylo by vhodné to v budoucnu otestovat.

Molekulové velikosti 18 kDa se nejvíce blíží v literatuře popsany 20 kDa VSLBP (very-low-density lipoprotein-binding protein) z *S. japonicum*³ (Fan et al. 2003) V oblasti 37 kDa je u *S. mansoni* lokalizován antigen glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenáza. V případě *T. regenti* byla molekulová hmotnost tohoto antigenu určena jako 34 kDa. Není však vyloučeno, že by se mohlo jednat o jinou izoformu tohoto glykolytického enzymu.

Sběr schistosomul z infikovaných kachen je velmi obtížný, navíc je nutné smrtit velké množství pokusných zvířat. Jedná se tudíž o velmi špatně dostupný materiál. V budoucnu bychom chtěli pokusy zopakovat s *in vitro* kultivovanými schistosmulami. Jak např. uvádí Chanová et al. (2012), imunoreaktivita povrchu schistosomul je nezávislá na druhu hostitele či *in vitro* kultivaci, reakce antigenů *in vitro* kultivovaných schistosomul by se tak nemusela výrazně odlišovat od *ex vivo* schistosomul.

K přípravě diagnostického kitu, jehož pomocí by bylo možné ověřit v minulosti prodělanou infekci ptačími schistosomami, je potřeba charakterizovat několik silně a spolehlivě rozpoznávaných antigenů, které by posléze mohly být rekombinantně připraveny. Z tohoto důvodu jsme zkoušeli pomocí imunoblotů reakci kachních sér s rekombinantními cathepsiny TrCB1.1 a TrCB2, které jsme měli k dispozici. U lidských pacientů se schistosomózou přítomnost protilátek proti CB1 indikuje s 98% pravděpodobností přítomnost vajec ve stolici (Ruppel et al. 1990), je to tedy velmi spolehlivý indikátor onemocnění. Oba cathepsiny TrCB1.1 i TrCB2 byly testovány v glykosylované i deglykosylované formě. Jak popsal Stack et al. (2006), při přípravě rekombinantního SmCB1 v expresním systému *P. pastoris* docházelo k hyperglykosylaci, která způsobovala falešně pozitivní reakce s IgG pacientů. Všechna námi testovaná kachní séra (30. – 50. d.p.i.) rozpoznávala rTrCB2

³ Tento rekombinantně připravený protein přítomný v tegumentu dospělých samců (Fan et al. 2003) vyvolal u imunizovaných myší 33,5% snížení výskytu dospělých červů a 47,6% snížení produkce vajec oproti kontrolám (Gan et al. 2005 dle McManus a Loukas 2008).

v intaktní (glykosylované) formě. Stejná nespecifická reakce byla pozorována i s deglykosylovanou formou rTrCB2. Naproti tomu deglykosylovaný rTrCB1.1 byl rozpoznáván pouze některými testovanými séry, nikdy však séry kontrol. Tuto skutečnost může vysvětlit rozdílná míra exprese obou cathepsinů v průběhu životního cyklu parazita. Exprese CB2 je v porovnání s CB1 vyšší u všech vývojových stadií (Dolečková et al. 2010). CB2 je krom jiného lokalizován v penetračních žlázách cercárií (Dolečková et al. 2009), je to tedy antigen, s nímž se do styku dostávají všechny infikované kachny. Na tento antigen se bohužel vázala nespecificky i séra naivních kachen.

CB1 byl lokalizován ve střevě schistosomul *T. regenti* (Dvořák et al. 2005). Ptačí schistosomy jako zástupci prvoústých živočichů regurgitují zbytky natrávené potravy smísené se střevními proteázami. Imunitní systém tak na tyto proteázy může reagovat. Ve vývojovém stadiu cercárie však motolice žádnou potravu nepřijímají. Je možné, že infekce byla u některých kachen slabá a penetrující cercárie byly zabity složkami imunitního systému již v kůži. V tomto případě by se pak do kontaktu se střevními proteázami, které produkují do okolí schistosomula a dospělci, nedostaly a nemohla by se tak proti nim vytvořit protilátková odpověď.

Molekulová hmotnost CB2 v nativní formě se pohybovala v rozmezí 30 – 28 kDa. Při celkovém srovnání reakcí, do kterého jsme zahrnuli všechny uskutečněné odběry včetně těch od kontrol, je na grafu 24 patrná reakce v oblasti kolem 32 kDa, což je molekulová hmotnost rekombinantně připraveného glykosylovaného cathepsinu CB2. Teoretická molekulová hmotnost TrCB2 byla určena jako 28,5 kDa. Na SDS PAGE však vycházela právě uvedených 32 kDa. Za tuto změnu molekulové velikosti jsou podle Dolečkové et al. 2009 zodpovědné kvasinky *P. pastoris*, v kterých byl rekombinantní CB2 připravován. Cathepsiny mají potenciální glykosylační místa, kvasinky však v těchto místech protein hyperglykosylují. Skutečná velikost se tak pohybuje kolem 30 kDa. Jak je již uvedeno výše, molekulovou velikost rozpoznávaných antigenů se nám v programu Quantity One podařilo určit jen přibližně, proto se může jednat právě o CB2, který byl nepřesně proměřen.

Jedním z našich vytčených cílů bylo porovnat humorální imunitní odpověď kachen s plně zralým imunitním systémem a kachen, které byly infikovány v době jeho nezralosti. Výsledky ELISA testu i imunoblotů jednoznačně ukazují, že kachny infikované v době plné zralosti reagují velmi silně a rozpoznávají specifické antigeny již 10. d.p.i. (tedy ve věku 50 dnů) na rozdíl od juvenilních kachen, které většinou ukazují vazbu na antigen až při 2. odběru, v době 14. či 20. d.p.i. (tedy ve věku 20 – 30 dnů). Hladiny protilátek IgY se v ELISA testu u těchto kachen pohybují kolem hodnoty OD 2, stejně jako hodnoty kachen s nedozrálou

imunitou. Jedním z důvodů, proč by mohly být reakce opakovaně infikovaných kachen a kachen s plně dozrálou imunitou silnější, může být použití vyšší infekční dávky cercárií, v případě *T. regenti* byla zvýšena o 500 cercárií, v případě *T. szidati* o 1000 cercárií. K tomuto kroku jsme přistoupili, protože jsme se obávali, že infekce v pozdějším věku by mohly být slabší. Tyto výsledky mohou být také zkresleny faktem, že pro nákazu kachen s plně rozvinutou imunitou byly použity divoké kachny, byť odchované uměle v uzavřeném prostředí. Jak je patrné z výsledků imunoblotu, kachny KoE2 a KoE3, které sloužily jako zdravá kontrola, v porovnání s kontrolami z řad domácích kachen reagují s více antigeny a vykazují silnější reakci. To může být zapříčiněno vyšší hladinou nespecifických protilátek, která je závislá krom jiného na věku experimentálního zvířete. Tyto kachny se k nám dostaly ve věku 21 dnů, tudíž nemůžeme úplně vyloučit, že se do této doby setkaly s jinými patogeny. Jak ukazují výsledky ELISA testu, průběh protilátkové odpovědi u opakovaně infikovaných kachen byl stejný jako u kachen infikovaných pouze jedinou dávkou cercárií.

Na příkladu divoké kachny ze skupiny E (KoE1) si můžeme ukázat jasný rozdíl mezi imunoreaktivitou protilátek kachen naivních a kachen infikovaných. Při experimentální nákaze došlo k úniku 1 nakažené kachny do hejna ostatních ještě před vybráním kontrol. Mezi tři vybrané kontroly se tak dostala s největší pravděpodobností tato kachna, která byla infikovaná druhem *T. regenti*. Naznačují to jak výsledky ELISA testu, kde se pohybují normální hodnoty OD u kontrol po celou dobu odběrů kolem hodnoty 0,5, zatímco u kachny KoE1 můžeme na grafu sledovat stejný vývoj v hladině IgM a IgY jako u zaručeně infikovaných kachen. Stejně tak na imunoblotech rozpoznává sérum této kachny antigeny v oblasti 47-49 kDa a 43-45 kDa, tedy antigeny na které se vážou pouze protilátky z infikovaných kachen. Takto jsme vlastně nechtěně potvrdili možnosti imunodiagnostiky infekce *T. regenti* u kachen, byť zatím na jediném „slepém“ vzorku.

Jednoznačný popis protilátkové imunitní odpovědi kachen byl komplikován faktem, že naše experimentální kachny nepocházejí z inbredních linií, jako tomu bylo u výzkumu humorální odpovědi na myším modelu. Experimenty provedené na kuřatech ukazují, že celý repertoár protilátek vzniká u ptáků mezi 10. a 15. dnem embryonálního vývoje (McCormack et al. 1991). Infikované kachny tak na rozdíl od myši již nemohou během dalšího vývoje tvořit nová vazebná místa imunoglobulinů, lépe reagující s antigeny patogenů a parazitů, s nimiž se setkávají. Séra některých kachen tak mohla rozpoznávat antigeny, které byly u jiných jedinců bez protilátkové odezvy.

Další obtíž při tomto výzkumu představuje skutečnost, že kachny produkují dvě izoformy IgY. IgY (7,8S) a zkrácenou formu IgY ΔFc (5,7S). IgY ΔFc chybí funkční Fc

oblast (Higgins a Warr 1993), která je po navázání na antigen rozpoznávána T-lymfocyty. Není schopna vázat komplement a vyvolat kožní anafylaxi (Grey 1967). Anti duck IgY vázající se na Fc oblast kachních IgY tak nemají možnost rozpoznat navázané zkrácené izoformy IgY Δ Fc. Je možné, že protilátková odpověď proti některým antigenům je tak ve skutečnosti silnější, než ukazují naše výsledky. Nicméně obě izoformy IgY vznikají pomocí alternativního splicingu mRNA těžkého řetězce (Magor et al. 1994), je tedy velmi málo pravděpodobné, že by daný jedinec tvořil pouze zkrácenou formu IgY, rozpoznávající významný antigen.

Mám-li shrnout, naše experimenty ukazují, že protilátková odpověď proti antigenům cercárií *T. regenti* se u většiny kachen rozvíjí kolem 20. dne od infekce. Dále se nám podařilo objevit několik slibně rozpoznávaných antigenů, v oblasti kolem 18 kDa a mezi 40 a 50 kDa v případě reakce s antigeny cercárií, u antigenů z homogenátu schistosomul se jednalo o reakci ve velikosti 18 a 37 kDa. Mimo jiné jsme postoupili při přípravě rekombinantní TPI, kterou máme v současnosti již v expresním systému.

7 Závěr

Ve snaze popsat humorální imunitní odpověď specifických hostitelů proti antigenům ptačích schistosom *T. regenti* a *T. szidati* jsme otestovali pomocí metody ELISA a imunoblotu séra odebraná experimentálně nakaženým kachnám i séra získaná při lovu divokých kachen. Výsledky získané v ELISA testu ukazují, že dynamika vývoje protilátkové odpovědi proti antigenům obsaženým v homogenátu cercárií (TrH_C a TsH_C) se u obou sledovaných druhů liší. U kachen infikovaných *T. regenti* bylo zaznamenáno výrazné zvýšení anti TrH_C IgY 20. d.p.i. Změny v hladině protilátek třídy IgM, projevující se mírným zvýšením OD 10. d.p.i. a poté následný pokles na předchozí úroveň, byly zjištěny pouze u opakovaně reinfikovaných kachen a kachen infikovaných v době plné imunokompetence. U kachen infikovaných druhem *T. szidati* se hladiny anti TsH_C IgY i anti TsH_C IgM v průběhu celého sledování neměnily a zůstávaly na stejné úrovni, jako byla naměřena u naivních kachen. Je ovšem možné, že to bylo zapříčiněno slabými infekcemi experimentálních kachen.

Séra z ulovených divokých kachen otestovaná ELISA metodou nikdy nedosáhla stejné hladiny protilátek jako séra experimentálně infikovaných kachen. Při ohledání kachen nebyla zjištěna infekce ptačími schistosomami, pouze byla u dvou jedinců zaznamenána přítomnost jiných parazitů. Hladina protilátek IgY byla u těchto kachen zvýšená.

Séra kachen nakažených *T. regenti*, která jsme testovali pomocí imunoblotu se specificky vážala na 2 antigeny v oblasti 49 - 47 kDa a 47 - 45 kDa. IgY protilátky rozpoznávaly tyto dva antigeny již od prvního odběru, tedy v době odpovídající 7. nebo 10. d.p.i. U některých kachen se objevila i reakce v oblasti kolem 18 kDa a 55 kDa. Celkově se protilátky z sér infikovaných kachen vážaly na větší počet antigenů. Tato reakce však byla zaznamenána pouze u jednotlivých kachen, nejspíše z důvodu rozdílného genetického pozadí experimentálních zvířat. Několik vybraných sér jsme otestovali pomocí imunoblotu s navázaným antigenem z 7 denních schistosomul *T. regenti*. Tato séra krom jiného specificky rozpoznávala antigeny o velikosti 37 kDa a 18 kDa. V budoucnu chceme ověřit skutečnou velikost těchto specificky rozpoznávaných antigenů pomocí hmotnostní spektrometrie a identifikovat jejich přesnou lokalizaci v těle parazita pomocí imunofluorescence. Také bychom chtěli určit o jaké proteiny se jedná, připravit je v rekombinantní formě a otestovat jejich antigenicitu.

Séra kachen infikovaných *T. szidati* se vážala převážně nespecificky na antigeny, které rozpoznávala i séra kontrol. Stejně jako u infekcí druhem *T. regenti* se objevilo několik specificky rozpoznávaných antigenů, ovšem pouze u jednotlivých kachen. Při pokusu o

ověření zkřížené reaktivity mezi oběma druhy jsme otestovali reakci sér kachen infikovaných *T. regenti* s antigeny z homogenátu cercárií *T. szidati*. Objevila se nespecifická reakce ve stejných místech, jako jsme pozorovali u kachen infikovaných *T. szidati*. Od testování vazby IgM protilátek jsme upustili po zjištění, že se naše sekundární protilátka „anti duck IgM“ váže nespecificky na mnoho složek kachního séra, nejen na IgM.

Otestovali jsme také reakci sér s rekombinantně připravenými proteázami CB1.1 a CB2. CB2 byl rozpoznáván všemi otestovanými séry, včetně těch od naivních kachen, CB1.1 rozpoznávala jen některá séra, nikdy však séra kontrol. Tento experiment jsme zařadili kvůli předpokladu, že tyto proteázy by mohly být silně antigenní a mohly by se v budoucnu stát součástí kitu určeného k diagnostice prodělané infekce ptačími schistosomami.

V neposlední řadě jsme podnikli pokus o přípravu rekombinantního glykolytického enzymu triozy - fosfát izomerázy (TPI; 25 kDa), který byl silně rozpoznáván v předchozích experimentech infikovanými nespecifickými hostiteli (Lichtenbergová et al. 2008). V současné době již máme sekvenací potvrzeno, že produkt je zaklonován v expresním systému BL21 *Escherichia coli*. V budoucnu chceme otestovat, zda je tento antigen rozpoznáván také séry specifických hostitelů, kachen. Dosavadní výsledky z imunoblotů tento předpoklad nepotvrzují. V případě testování kachních sér byla zaznamenána v oblasti 25 kDa pouze nespecifická reakce.

Z výsledků našich experimentů můžeme již vyvodit několik závěrů. V první řadě je to skutečnost, že se hladina protilátek IgY se dostává na nejvyšší úroveň v době kolem 20. d.p.i. bez ohledu na stáří infikované kachny. Také se nám podařilo najít několik slibně reagujících antigenů, které by se daly použít při diagnostice prodělané infekce ptačími schistosomami.

V budoucnu plánujeme v tomto výzkumu zaměřeném na monitoring humorální odpovědi kachen pokračovat. Chtěli bychom pokusy zopakovat s větším počtem jedinců, aby bylo možné provést statistickou analýzu výsledků. Také chceme změnit schéma odběrů: kvůli zachycení časné protilátkové odpovědi zastoupené třídou IgM. Alespoň v prvních dvou týdnech po infekci plánujeme odebírat séra v intervalech dvou až tří dnů. Nejprve ale bude nutné získat specifičtější sekundární protilátku „anti duck IgM“.

Dalším naším cílem je popsat rozdíl mezi akutní a chronickou fází infekce. K tomuto účelu se nejlépe hodí protilátky IgY, které jsou spojeny s humorální odpovědí v pozdějších fázích infekce. Chtěli bychom dlouhodobě sledovat hladinu těchto protilátek a zjistit, zda a jak se vyvíjí v dlouhém časovém úseku po infekci. Zjištění doby, po kterou přetrvává protilátková odpověď, je stěžejní pro tvorbu diagnostického „kitu“. Ten by mohl být využit jak ve veterinární oblasti, tak například při studiích ovlivnění fitness ptáků parazity

probíhajících např. na Katedře zoologie PřF UK v Praze. S tím se pojí také potřeba odhalit možné zkřížené reakce mezi antigeny různých parazitů či jiných patogenů, s kterými se mohou dostat zkoumaní jedinci do kontaktu.

Dále bychom chtěli zařadit také metodu imunohistochemie, pomocí níž bychom dokázali určit přesnou lokalizaci rozpoznávaných antigenů a 2-D bloty, kvůli jednoznačné identifikaci rozpoznávaných antigenů. Dále si uvědomujeme nutnost odfiltrování nespecifických reakcí, kterých je bohužel velké množství. Stejně tak bude v budoucnu nutné hodnotit také intenzitu reakcí. Je totiž možné, že ač je daný antigen rozpoznáván nespecifickými protilátkami kontrol, můžou se u infikovaných jedinců vyskytovat i protilátky specifické. Měřením denzity reakce by se jejich přítomnost dala detekovat.

Zajímavý námět k dalšímu zkoumání nám poskytlo srovnání protilátkové odpovědi druhů *T. regenti* a *T. szidati*. Odlišné místo definitivní lokalizace parazita (CNS - *T. regenti*, cévy mezenteria - *T. szidati*) i migrační cesty parazita mohou ovlivnit rozdíly v protilátkové odpovědi. V neposlední řadě plánujeme zaměřit se i na antigeny dalších vývojových stadií parazita, s kterými přichází kachny jako definitivní hostitelé do styku (dospělci, vajíčka).

8 Seznam zkratek

- APC - antigen prezentující buňky (antigen presenting cell)
- BALT - lymfatická tkáň bronchů (bronchus-associated-lymphoid-tissue)
- BCR - specifický receptor B lymfocytů pro antigen (B-cell receptor)
- BSA – albumin z bovinního séra (bovine serum albumin)
- β – APP – β amyloid precursor protein
- C_H – konstantní doména těžkého řetězce
- C_L – konstantní doména lehkého řetězce
- CALT – lymfatická tkáň spojivky (conjunctival-associated lymphoid tissue)
- CB1/CB2 – cathepsin B1/B2
- D_H – diverzifikační úsek těžkého řetězce
- D – MAP – dipeptidic multiple antigen peptide
- ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- GALT - lymfatická tkáň střeva (gut-associated-lymphoid-tissue)
- GAPDH – glyceraldehyd – 3 fosfát dehydrogenáza
- IFN- γ - interferon γ
- Ig - imunoglobulin
- IgA - imunoglobulin A
- IgE - imunoglobulin E
- IgG - imunoglobulin G
- IgM - imunoglobulin M
- IgX - imunoglobulin X
- IgY - imunoglobulin Y
- IL – interleukin
- J_H – spojovací oblast těžkého řetězce
- J_L - spojovací oblast lehkého řetězce
- MHC II - hlavní histokompatibilní komplex II (major histocompatibility complex II)
- mRNA – mediátorová RNA
- NDV – Newcastle disease virus

- NK buňky - přirozený zabíječ – buňky (natural killers)
- PCR - polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
- pIgR – polymerický imunoglobulinový receptor
- PZQ - praziquantel
- RT-PCR – real time Polymerase Chain Reaction
- SC - sekretorická komponenta
- Tc - cytotoxický T lymfocyt (T cytotoxic lymphocyte)
- Ts - supresorový T lymfocyt (T supressor lymphocyte)
- Th - pomocný T lymfocyt (T helper lymphocyte)
- TCR - specifický receptor T lymfocytů pro antigen (T cell receptor)
- TPI – trioso-fosfát izomeráza
- TrE/S – cercariální exkrečně sekreční produkty
- TrH_C – homogenát z cercárií *T. regenti*
- TrH_S - homogenát z schistosomul *T. regenti*
- TsH_C - homogenát z cercárií *T. szidati*
- V_H – variabilní oblast těžkého řetězce
- V_L - variabilní oblast lehkého řetězce

Zkratky používané v kapitole Výsledky

- DK - divoká kachna
- D.p.i. – den po infekci (day post infection)
- K - domácí kachna
- NDK- naivní divoká kachna
- NK – naivní domácí kachna

9 Použitá literatura

ABDULLA, M. H., LIM, K. C., SAJID, M., MCKERROW, J. H. AND CAFFREY, C. R. (2007): Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS Med* 4, e14.

BENATAR, T., IACAMPO, S., TKALEC, L., RATCLIFFE, M. J. (1991): Expression of immunoglobulin genes in the avian embryo bone marrow revealed by retroviral transformation. *Eur J Immunol.* 21, 2529-2536.

BUTCHER, G. D., HARMS, R. H., WINTERFIELD, R. W. (1989): Relationship between delayed onset of egg production and involution of the bursa of Fabricius in White Leghorn chickens. *Avian Dis.* 33, 361–364.

CAFFREY, C. R., SALTER, J. P., LUCAS, K. D., KHIEM, D., HSIEH, I., LIM, K. C., RUPPEL, A., MCKERROW, J. H., SAJID, M. (2002): SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 121, 49–61.

CAFFREY, C. R., MCKERROW, J. H., SALTER, J. P. SAJID, M. (2004): Blood ‘n’ guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.* 20, 241-248.

CARVALHO, G. B. F., SILVA-PEREIRA R. A. DA, PACÍFICO, L. G. G., FONSECA, C. T. (2011): Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106, 837-843.

ČERNÝ, H. (2005): Anatomie domácích ptáků. 1. vyd. Brno: Metoda s.r.o., 448 str. ISBN 80-239-4966-7.

CIRIACO, E., PÍNERA, P. P., DÍAZ-ESNAL, B., LAURÁ, R. (2003): Age- Related Changes in the Avian Primary Lymphoid Organs (Thymus and Bursa of Fabricius). *Micros Res Tech.* 62, 482-487.

DALTON, J. P., CLOUGH, K. A., JONES, M. K., BRINDLEY, P. J. (1996): Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun.* 64, 1328-1344.

DALTON, J. P., CLOUGH, K. A., JONES, M. K., BRINDLEY, P. J. (1997): The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology.* 114, 105–112.

DEGEN, W. G., DAAL, N., ROTHWELL, L., KAISER, P., SCHIJNS, V. E. (2005): Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet Microbiol.* 105, 163-167.

DESSEIN, A. J., BEGLEY, M., DEMEURE, C., CAILLOL, D., FUERI, J., DOS REIS, M. G., ANDRADE, Z. A., PRATA, A., BINA, J. C. (1988): Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. *J Immunol.* 140, 2727-2736.

DIAS DA SILVA, W., TAMBOURGI, D. V.(2010): IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 135, 173-180.

DOENHOFF, M. J., PICA-MATTOCCIA, L. (2006): Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 4, 199-210.

DOLEČKOVÁ, K., ALBRECHT, T., MIKEŠ, L., HORÁK, P. (2010): Cathepsins B1 and B2 in the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*: distinct gene expression profiles and presumptive roles throughout the life cycle. *Parasitol Res.* 107, 751–755.

DOLEČKOVÁ, K., KAŠNÝ, M., MIKEŠ, L., CARTWRIGHT, J., JEDELSKÝ, P., SCHNEIDER, E. L., DVOŘÁK, J., MOUNTFORD, A. P., CRAIK, C. S., HORÁK, P. (2009): The functional expression and characterisation of a cysteine peptidase from the invasive stage of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Int J Parasitol.* 39, 201-211.

DVOŘÁK, J., DELCROIX, M., ROSSI, A., VOPÁLENSKÝ, V., POSPÍŠEK, M., ŠEDINOVÁ, M., MIKEŠ, L., SAJID, M., SALI, A., MCKERROW, J.H., HORÁK, P. AND CAFFREY, C.R. (2005): Multiple cathepsin B isoforms in schistosomula of *Trichobilharzia regenti*: identification, characterisation and putative role in migration and nutrition. *Int J Parasitol.* 35, 895-910.

EL RIDI, R., FAROUK, F., SHERIF, M., AL-SHERBINY, M., OSMAN, A., EL GENGEHI, N., SHOEMAKER, C. B. (1998): T and B cell reactivity to a 42-kDa protein is associated with human resistance to both schistosomiasis mansoni and haematobium. *J Infect Dis.* 177, 1364-1372.

EL RIDI, R., SHOEMAKER, C. B., FAROUK, F., EL SHERIF, N. H., AFIFI, A. (2001): Human T- and B Cell Responses to *Schistosoma mansoni* Recombinant Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Correlate with Resistance to Reinfection with *S. mansoni* or *Schistosoma haematobium* after Chemotherapy. *Infect Immun.* 69, 237–244.

EL RIDI, R., MONTASH, M., TALLIMA, H. (2004): Immunogenicity and Vaccine Potential of Dipeptidic Multiple Antigen Peptides from *Schistosoma mansoni* Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase. *Scand J Immunol.* 60, 392–402.

FAN, J., GAN, X., YANG, W., SHEN, L., MCMANUS, D. P., BRINDLEY, P. J. (2003): A *Schistosoma japonicum* very low-density lipoprotein-binding protein. *Int J Biochem Cell Biol.* 35, 1436-1451.

GOUDOT-CROZEL, V., CAILLOL, D., DJABALI, M., DESSEIN, A. J. (1989): The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37- kDa glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *J Exp Med.* 170, 2065-2080.

GREY, H. M. (1967): Duck Immunoglobulins II. Biologic and Immunochemical Studies. *J Immunol.* 98, 820-826.

HAAS, W., PIETSCH, U. (1991): Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host. *Parasitol Res.* 77, 642–644.

HARN, D.A., GU, W., OLIGINO, L. D., MITSUYAMA, M., GEBREMICHAEL, A., RICHTER, D. (1992): A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.* 148, 562-567.

- HIGGINS, D. A., WARR, G.W. (1993): Duck immunoglobulins: structure, functions and molecular genetics. *Avian Pathol.* 22, 211-236.
- HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L., DVOŘÁK, J. (1998a): *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite.* 5, 349-357.
- HORÁK, P., KOVÁŘ, L., KOLÁŘOVÁ, L., NEBESÁŘOVÁ, J. (1998b). Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact. *Parasitology.* 116, 139-147.
- HORÁK, P., DVOŘÁK, J., KOLÁŘOVÁ, L. TREFIL, L. (1999): *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems. *Parasitology.* 119, 577-581.
- HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L. ADEMA, C. M. (2002): Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Adv Parasitol.* (52), 155-233.
- HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J. (2009): Základy imunologie, 4. vydání, Praha/Kroměříž: Triton, 316 str., ISBN:978-80-7387-280-9.
- HRÁDKOVÁ, K., HORÁK, P. (2002): Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *J Helminthol.* 76, 137-141.
- CHAMOT, E., TOSCANI, L., ROUGEMONT, A. (1998): Public health importance and risk factors for cercarial dermatitis associated with swimming in Lake Lemman at Geneva, Switzerland. *Epidemiol Infect.* 120, 305–314.
- CHANOVÁ, M., LICHTENBERGOVÁ, L., BULANTOVÁ, J., MIKEŠ, L., HORÁK, P. (2012): *Trichobilharzia regenti*: Antigenic structures of intravertebrate stages. *Cent Eur. J. Biol.* 7, 83-90.
- KAŠNÝ, M. LICHTENBERGOVÁ, L., KOLÁŘOVÁ, L., HORÁK, P. (2009): Identification and characterization of dominant antigens of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti*. Abstract book – 3rd Workshop on Bird Schistosomes and Cercarial Dermatitis, 21.
- KLINKERT, M. Q., FELLEISEN, R., LINK, G., RUPPEL, A., BECK, E. (1989): Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol Biochem Parasitol.* 33, 113–122.
- KOBAYASHI, K., VAERMAN, J. P., BAZIN, H., LEBACQ-VERHEYDEN, A. M., HEREMANS, J. F.(1973): Identification of J-chain in polymeric immunoglobulin from a variety of species by cross-reaction with rabbit antisera to human J-chain. *J Immunol.* 111,1590–1594.
- KOLÁŘOVÁ, L., HORÁK, P., ČADA, F (2001): Histopathology of CNS and nasal infections cause by *Trichobilharzia regenti* in vertebrates. *Parasitol Res.* 87, 644-650.
- KOUŘILOVÁ, P., HOGG, K. G., KOLÁŘOVÁ, L. MOUNTFORD, A. P.(2004): Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. *J Immunol.* 172, 3766–3774.

- KOUŘILOVÁ, P., KOLÁŘOVÁ, L. (2002). Variations in immunofluorescent antibody response against *Trichobilharzia* and *Schistosoma* antigens in compatible and incompatible hosts. *Parasitol. Res.* 88, 513-521.
- LESLIE, G. A., CLEM, L. W. (1969): Phylogeny of immunoglobulins structure and function III. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.* 130, 1337-1352
- LESLIE, G. A., CLEM, L. W. (1970): Chicken Immunoglobulins: Biological Half-lives and Normal Adult Serum Concentrations of IgM and IgY. *Proc Soc Exp Biol Med.* 134,195-198.
- LEE, K. W., SHALABY, K. A., THAKUR, A., MEDHAT, A. M., KARIM, A. M., LOVERDE, P. T. (1995): Cloning of the gene for phosphoglycerate kinase from *Schistosoma mansoni* and characterization of its gene product. *Mol Biochem Parasitol.* 71, 221-231
- LICHTENBERGOVÁ, L., KOLBEKOVÁ, P., KOUŘILOVÁ, P., KAŠNÝ, M., MIKEŠ, L., HAAS, H., SCHRAMM, G., HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L., MOUNTFORD, A. P. (2008): Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. *Parasite Immunol.* 30, 585-595.
- LICHTENBERGOVÁ, L., LASSMANN, H., JONES, M. K., KOLÁŘOVÁ, L., HORÁK, P. (2011): *Trichobilharzia regenti*: Host immune response in the pathogenesis of neuroinfection in mice, *Exp Parasitol.* 128, 328-335.
- LIU, S. S., HIGGINS, D. A. (1990): Yolk-sac transmission and post-hatching ontogeny of serum immunoglobulins in the duck (*Anas platyrhynchos*). *Comp Biochem Physiol B.* 97, 637-644.
- LOUKAS, A, BETHONY, J. M., BROOKER, S., HOTEZ, P. J. (2006): Hookworm vaccines-past, present and future. *Lancet Infect Dis.* 6, 733-741.
- LUNDQVIST, M. L., MIDDLETON, D. L., RADFORD, C., WARR, G. W., MAGOR, K. E. (2006): Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. *Dev Comp Immunol.* 30, 93-100.
- MAGOR, K. E., HIGGINS, D. A., MIDDLETON, D. L., WARR, G. W. (1994): One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. *J Immunol.* 153, 5549-5555.
- MAGOR, K. E., WARR, G. W., BANDO, Y., MIDDLETON, D. L., HIGGINS, D. A. (1998): Secretory immune system of the duck (*Anas platyrhynchos*). Identification and expression of the genes encoding IgA and IgM heavy chains. *Eur J Immunol.* 28, 1063-1068.
- MAKAROVA, E., GOES, T. S., MARCATTO, A. L. M., LEITE, M. F., GOES, A. M.(2003). Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26. *Parasitol Int.* 52, 269–279.
- MAST, J., GODDEERIS, B. M. (1999): Development of immunocompetence of broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 70, 245-256.
- MCCORMACK, W. T., TJOELKER, L. W., THOMPSON, C. B. (1991): Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annu Rev Immunol.* 9, 219-241.

- MCMANUS, D. P., LOUKAS, A. (2008): Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev.* 21, 225-242.
- MCWILLIAM, H. E. G., DRIGUEZ, P., PIEDRAFITA, D., MCMANUS, D. P., MEEUSEN, E. N. T. (2012): Novel immunomic technologies for schistosome vaccine development. *Parasite Immunol.* 34, 276–284.
- MEULEMAN E., HUYER A. R., MOOIJ J.H. (1984): Maintenance of the life cycle of *Trichobilharzia ocellata* via the duck *Anas platyrhynchos* and the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Neth J Zool* 34, 414-417.
- MUTAPI, F., BOURKE, C., HARCUS, Y., MIDZI, N., MDULUZA, T., TURNER, C. M., BURCHMORE, R., MAIZELS, R. M. (2011): Differential recognition patterns of *Schistosoma haematobium* adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG1 and IgG4. *Parasite Immunol.* 33, 181–192.
- NEI, M., GU, X., SITNIKOVA, T. (1997): Evolution by the birth-and-death proces in multigene of the vertebrate immune systém. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 7799-7806.
- NG, P. L., HIGGINS, D. A. (1986): Bile immunoglobulin of the duck (*Anas platyrhynchos*) I. Preliminary characterization and ontogeny. *Immunology.* 58, 323-327.
- DE OLIVEIRA, E. J., KANAMURA, H. Y., TAKEI, K., HIRATA, R. D., VALLI, L. C., NGUYEN, N. Y., DE CARVALHO RODRIGUES, I., DE JESUS, A. R., HIRATA, M. H. (2008): Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102, 360-366.
- RATCLIFFE, M. J. H. (2006): Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev Comp Immunol.* 30, 101-118.
- REYNAUD, C. A., ANQUEZ, V., DAHAN, A., WEILL, J. C. (1987): A hyperconversion mechanism generates the chicken preimmune light chain repertoire. *Cell.* 48, 379-388.
- REYNAUD, C. A., ANQUEZ, V., WEILL, J. C. (1991): The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire. *Eur J Immunol.* 21, 2661–2670.
- REYNAUD, C. A., DAHAN, A., ANQUEZ, V., WEILL, J. C. (1989): Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell.* 59,171–183.
- REYNOLDS, S. R, DAHL, C. E, HARN, D. A. (1994): T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. *J Immunol.* 152, 193–200.
- RIBATTI, D., CRIVELLATO, E., VACCA, A. (2006): The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage. *Clin Exp Immunol.* 145, 1–4.

- ROSAS, L. E., KEISER, T., BARBI, J., SATOSKAR, A. A., SEPTER, A., KACZMAREK, J., LEZAMA-DAVILA, C. M., SATOSKAR, A. R. (2005): Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int Immunol.* 17,1347-1357.
- RUDOLFOVÁ, J., HAMPL, V., BAYSSADE-DUFOUR, C., LOCKYER, A. E., LITTLEWOOD, D. T., HORÁK, P. (2005): Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host. *Parasitol Res.* 95, 79–89.
- RUPPEL, A., IDRIS, M. A., SULEIMAN, S. M., HILALI, A. M. H. (1990): *Schistosoma mansoni* diagnostic antigens (SM31/12): A seroepidemiological study in the Sudan. *Trop Med Parasitol.* 41, 127–130.
- RUPPEL, A., DIESFELD, H. J., ROTHER, U. (1985): Immunoblot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. *Clin Exp Immunol.* 62, 499–506.
- SHOEMAKER, CH., GROSS, A., GEBREMICHAEL, A., HARD, D. (1992): cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 1842-1846.
- SKELLY, P. J., SHOEMAKER, C. B.(2001): *Schistosoma mansoni* proteases Sm31 (cathepsin B) and Sm32 (legumain) are expressed in the cecum and protonephridia of cercariae. *J Parasitol.* 87, 1218-1221.
- SOLARI, R., KRAEHNBUHL, J. P. (1985): The biosynthesis of secretory component and its role in the transepithelial transport of IgA dimer. *Immunol Today* 6, 17-20.
- SPILLNER, E., BRAREN, I., GREUNKE, K., SEISMANN, H., BLANK, S., DU PLESSIS, D. (2012): Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.05.003>
- STACK, C. M., DALTON, J. P., CUNNEEN, M., DONNELLY, S. (2005): De-glycosylation of *Pichia pastoris*-produced *Schistosoma mansoni* cathepsin B eliminates non-specific reactivity with IgG in normal human serum. *J Immunol Methods.* 304, 151-157.
- SVENDSEN, L., CROWLEY, A.,STODULSKI, G.,HAU, J. (1996): Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J. Immunol. Methods* 191, 113–120.
- TAYLOR, A. I., FABIANE, S. M., SUTTON, B. J., CALVERT, R. A. (2009): The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE, *Biochemistry.* 48, 558–562.
- TIZARD, I. (2002): The avian antibody response. *Semin Avian Exot Pet.* 11, 2-14.
- TURJANICOVÁ, L. (2009). Praha, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Antigeny schistosom a imunitní odpověď specifických a nespecifických hostitelů. Bakalářská práce, 1-38.

WARR, G. W., MAGOR, K. E., HIGGINS, D. A. (1995): IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today*.16,392–398.

WATANABE, H., KOBAYASHI, K., ISAYAMA, Y. (1975): Peculiar secretory IgA system identified in chickens. II. Identification and distribution of free secretory component and immunoglobulins of IgA, IgM, and IgG in chicken external secretions. *J Immunol*. 4,998-1001.

WIELAND, W. H., ORZÁEZ, D., LAMMERS, A. PARMENTIER, H. K., VERSTEGEN, M. W. A., SCHOTS, A. (2004): A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochem J*. 380, 669–676.

ZHU, Y., SI, J., HARN, D. A., XU, M., REN, J., YU, C., LIANG, Y., YIN, X., HE, W., CAO, G.(2006): *Schistosoma japonicum* triose-phosphate isomerase plasmid DNA vaccine protects pigs against challenge infection. *Parasitology*. 132, 67-71.

Sekundární citace

FLAJNIK, M. F., MILLER, K. M., DU PASQUIER, L. (2003): Evolution of the immune systems. *Fundamental immunology* (5th ed), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 519–570

GALLAGHER, J. S., VOSS, E. W. (1970): Immune precipitation of purified chicken antibody at low pH. *Immunochemistry* 7, 771-785.

GAN, Y., SHI, Y. E., BU, L. Y., NING, C. X., ZHU, H. G. (2005): Vaccination of mice with recombinant nucleic acid vaccine encoding the integral membrane protein Sj23 and cytokine IL-12 elicits specific immune responses against *schistosoma japonica*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 85,193-198.

HIGGINS, D. A. (1975): Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. *Vet Bull*. 45, 139-154.

LA VALETTE DE ST. GEORGE A. (1855): *Symbolae ad trematodum evolutionis historiam*. Dissertation, Berolius.

VAN LOVEREN, H., F. REDEGELD, H. MATSUDA, T. BUCKLEY, J. S. TEPEMA, J. GARSEN. (1997): Mast cells. J. D. Bos, ed. *Skin Immune System* 2nd Ed.159. CRC Press, New York.

NEUHAUS, W. (1952) Biologie und Entwicklung von *Trichobilharzia szidati* n. sp. (Trematoda, Schistosomatidae), einem Erreger von Dermatitis beim Menschen. *Z Parasitenkd* 15, 203–266.

Další zdroje

<http://oldweb.izip.cz/ds3/hypertext/JVAJR.htm>