

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



**Mgr. Michaela Vaščíková**

Molekulární a sérologická diagnostika nálezů trichobilharziemi

Molecular and serological diagnosis of infections caused by *Trichobilharzia*

Diplomová práce

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

Konzultant: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze,

Podpis

## **Pod'akovanie:**

Ďakujem môjmu školiteľovi Petrovi Horákovi za jeho odborné vedenie, cenné rady, pripomienky, ktorými mi bol nápomocný pri vypracovaní diplomovej práce a hlavne za tie pekné nervy. Moje poďakovanie takisto patrí RNDr. Martinovi Pospíškovi, Ph.D. za jeho rady a pomoc s molekulárnou diagnostikou. Ďakujem Jane, Líbe, Tomášovi za asistencie pri odberoch a rady pri riešení pokusov. Taktiež by som chcela poďakovať všetkým v helmintologickom laboratóriu bez ktorých by to tam nebolo také super. Taktiež ďakujem rodine a hlavne Ľubošovi, že ma podporoval.

## Abstrakt

Cerkárie rodu *Trichobilharzia* penetrujú nie len do kože definitívneho hostiteľa (vodné vtáctvo), ale aj do kože náhodných hostiteľov (cicavce). Dôsledkom penetrácie je vznik hypersenzitívnej reakcie nazývanej cercáriová dermatitída.

Cieľom práce bolo detegovať parazitárnu DNA zo séra a mozgomiešneho moku infikovaných kačiek, tiež zo séra infikovaných myší. Pomocou PCR s primermi pre tandemovo repetitívnu sekvenciu sme boli schopní zachytiť 1 fg parazitárnej DNA izolovanej zo séra infikovaných kačiek. Parazitárnu DNA sa nám podarilo amplifikovať iba u 16 vzoriek séra a likvoru kačiek, ale nie zo sér myší.

Ďalej boli myšie séra testované ELISA a Western blot metódou, a to za použitia antigénu homogenátu cercárií *T. regenti* (TRhc), *T. szidati* (TShc) a *S. mansoni* (SMhc). Výsledky ukazujú na progresívny nárast hladiny IgM protilátok, ktorý bol viditeľný od 10 dní prvej infekcie a nárast hladiny IgG protilátok až od druhej reinfekcie. Po 10 dňoch od štvrtej reinfekcie hladina oboch protilátok v sére postupne klesala, ale ešte 100 dní od štvrtej reinfekcie bola hladina protilátok vyššia ako u negatívnych sér.

Výsledky z Western blotu ukazujú, že IgG a IgM protilátky v homológnom sére rozpoznávali antigény 21 a 22 kDa z TRhc. V homológnom sére IgG protilátky rozpoznávali antigén 26 kDa z TShc a IgM protilátky sa viazali na antigény 32 kDa a 52 kDa. V heterológnom sére nebol antigén 26 kDa z TShc rozpoznávaný IgG protilátkami. Tento antigén by mohol slúžiť k medzidruhovému rozlíšeniu medzi *T. regenti* a *T. szidati*.

Pomocou 2D elektroforézy proteínové spoty rozpoznávané IgG protilátkami boli identifikované ako fruktóza-1,6-bisfosfát aldoláza, peroxiredoxín, glyceraldehyd-3- fosfát dehydrogenáza, trioso-fosfát izomeráza, fosfoglycerátmutáza a Sm 21,7 (s membránou asociovaný proteín).

## Kľúčové slová:

ELISA, Western blot, PCR, protilátky, parazitárna DNA, diagnostika, *T. regenti*, *T.szidati*

## **Abstract**

Cercariae of the genus *Trichobilharzia* can penetrate not only the skin of definitive hosts (ducks), but they are also able to penetrate the skin of accidental hosts (mammals). As a result of the penetration, the inflammatory response known as cercarial dermatitis appears.

The goal of our thesis is to detect parasite DNA in the serum and cerebrospinal fluid of infected ducks, and also in the serum of infected mice. By using PCR with primers designed for a tandem repeated sequence, we were able to detect 1 femtograms of parasite DNA isolated from sera of infected ducks. We were able to amplify parasite DNA only from 16 samples of sera and cerebrospinal fluid of the infected ducks, but we were not able to do so with the serum of mice.

Sera of infected mice were also tested by ELISA and Western blot. The homogenates of *T. regenti* (TRhc), *T. szidati* (TShc) and *S. mansoni* (SMhc) cercariae were selected as an antigen. The results showed progressive increase in the level of IgM antibody from 10 days after 1st infection and also increase of the level of IgG from the 2nd infection. 10 days after the 4th infection, the level of IgM and IgG gradually declined, but the level of antibodies 100 days after the 4th infection was still higher if compared to uninfected mice.

Results from Western blot analysis demonstrate that both IgG and IgM antibodies in the homologous serum of mice recognized proteins 21 and 22 kDa from TRhc. In homologous serum IgG antibodies specifically recognized 26 kDa antigen and IgM antibodies bound to 32 kDa and 52kDa from TShc antigen. In the heterologous serum of mice was not recognized protein 26 kDa from TShc. This antigen could be used to interspecies differentiation between *T. regenti* and *T. szidati*.

By using 2D electrophoresis, protein spots were recognized by IgG antibodies and identified as fructose 1,6-bisphosphate aldolase, peroxiredoxine, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, phosphoglycerate mutase, and Sm21.7 (membrane-associated protein).

## **Key words:**

ELISA, Western blot, PCR, antibodies, parasitic DNA, diagnostics, *T. regenti*, *T. szidati*

# Obsah

<b>Zoznam skratiek a značiek.....</b>	<b>9</b>
<b>1 Úvod.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Literárny prehľad.....</b>	<b>13</b>
2.1 Modelové organizmy.....	13
2.1.1 Cyklus <i>Trichobilharzia regenti</i> .....	13
2.1.2 Cyklus <i>Trichobilharzia szidati</i> .....	14
2.2 Nešpecifická a špecifická imunita.....	14
2.2.1 Th1, Th2, Th17.....	15
2.2.2 Protilátková imunitná odpoveď.....	16
2.3 Imunitná odpoveď v koži hostiteľa po penetrácii cercárií <i>T.regenti</i> .....	16
2.4 Protilátková odpoveď na antigény vtáčích schistosom.....	17
2.5 Vybrané známe antigény u schistosom.....	18
2.5.1 Katepsín B a L.....	18
2.5.2 Trioso-fosfát-izomeráza a glycerinaldehyd-3 fosfát dehydrogenáza.....	19
2.5.3 Úzky výber nových antigénov významných pre diagnostiku.....	19
2.6 Molekulárna analýza.....	19
2.6.1 Mitochondriálny (mt) genóm.....	19
2.6.2 Jadrový genóm.....	20
2.6.3 Tandemovo repetitívna sekvencia.....	20
2.6.4 Výber molekulárnych markerov použitých na diagnostiku parazitárnej DNA v biologickom materiáli.....	21
2.6.5 Molekulárne markery použité pri monitoringu schistosom v jazerách.....	22
<b>3 Materiál a metodika.....</b>	<b>24</b>
3.1 Zber cercárií.....	24
3.2 Experimentálne nákazy laboratórnych zvierat.....	24
3.2.1 Nákazy kačiek.....	24
3.2.2 Nákazy myši.....	24
3.3 Odber krvi, mozgomiešneho moku a spracovanie biologického materiálu.....	25
3.3.1 Kačky.....	25
3.3.2 Myši.....	25
3.4 Príprava antigénu z homogenátu cercárií.....	26
3.5 Meranie koncentrácie proteínu.....	26

3.6	ELISA a proteínová analýza.....	26
3.6.1	Proteínová elektroforéza 1D (SDS-PAGE) .....	26
3.6.2	Farbenie gélu.....	27
3.6.3	Imunoblot.....	27
3.6.4	Proteínová elektroforéza 2D .....	28
3.6.5	Vyhodnotenie imunoblotu .....	30
3.6.6	ELISA .....	31
3.7	Molekulára analýza .....	32
3.7.1	Izolácia DNA .....	32
3.7.2	Meranie koncentrácie DNA .....	33
3.7.3	Testované primery .....	33
3.7.4	PCR.....	37
3.7.5	Gélová elektroforéza.....	38
3.7.6	Extrakcia z gélu.....	39
3.7.7	Ligácia a transformácia buniek XL-1 Blue.....	39
3.7.8	Kontrola transformácie buniek .....	39
3.7.9	Sekvenácia .....	40
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>41</b>
4.1	ELISA.....	41
4.1.1	IgM protilátková odpoveď proti antigénom <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i> .....	41
4.1.2	IgG protilátková odpoveď proti antigénom <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i> .....	43
4.1.3	Protilátková odpoveď IgM a IgG v heterológnom sére proti antigénu <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i> .....	44
4.2	Western blot.....	47
4.2.1	Antigény <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i> rozpoznávané protilátkami IgM z homológnych sér.....	47
4.2.2	Antigény <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i> rozpoznávané protilátkami IgG z homológnych sér.....	48
4.2.3	Antigény <i>T. regenti</i> , <i>T. szidati</i> a <i>S. mansoni</i> rozpoznávané protilátkami IgG z heterológnych sér.....	51
4.3	Identifikácia rozpoznávaných antigénov z 2D blotu pomocou hmotnostnej spektrometrie.....	54
4.4	Molekulárna diagnostika .....	58
4.4.1	PCR.....	58

<b>5</b>	<b>Diskusia .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Záver.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Zoznam použitej literatúry.....</b>	<b>72</b>

## Zoznam skratiek a značiek

APC – antigén prezentujúca bunka

BCR – špecifický receptor B lymfocytov pre antigén

d.p. – dni po

d.p.i. – dni po infekcii

DC – dendritická bunka

E/S – exkrečno sekrečné produkty

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FBPA – fruktóza-1,6-bisfosfát aldoláza

FDC – folikulárne dendritické bunky

GAPDH - glyceraldehyd – 3 fosfát dehydrogenáza

IEF – izoelektrická fokusácia

IF – priamy imunofluorescenčný test

IFAT – nepriamy imunofluorescenčný test

IFN- $\gamma$  – interferón  $\gamma$

Ig – imunoglobulín

IgA – imunoglobulín A

IgE – imunoglobulín E

IgG – imunoglobulín G

IgM – imunoglobulín M

IL – interleukín

L – likvor

LPS – lypopolysacharid

LT – laboratórna teplota

MHC gp I – hlavný histokompatibilný komplex glykoproteínov I. triedy

MHC gp II – hlavný histokompatibilný komplex glykoproteínov II. triedy

NK bunky – prirodzený zabíjač – bunky

PCR – polymerázová reťazová reakcia  
rDNA – ribozomálna DNA  
S – sérum  
SH – *S. haematobium*  
SJ – *S. japonicum*  
SM – *S. mansoni*  
SMhc – homogenát cercárií *S. mansoni*  
SM<sub>m</sub> – sérum myši nakazenej *S. mansoni*  
Tc – cytotoxické bunky  
TCR – špecifický receptor T lymfocytov pre antigén  
Th – pomocný T lymfocyt  
TNF – faktor nekrotizujúci nádor  
TPI – trioso-fosfát izomeráza  
TR – sérum z myši nakazenej *T. regenti*  
TRhc – homogenát cercárií *T. regenti*  
TR<sub>k</sub> – sérum z kačky nakazenej *T. regenti*  
TS – sérum z myši nakazenej *T. szidati*  
Ts – supresorové bunky  
TShc – homogenát cercárií *T. szidati*  
TS<sub>k</sub> – sérum z kačky nakazenej *T. szidati*

# 1 Úvod

Vtáčie schistosomy rodu *Trichobilharzia* sú motolice s dvoj-hostiteľským cyklom viazaným na vodné prostredie. Vtáčie schistosomy môžeme rozdeliť na viscerálne druhy (*T. szidati*) a nazálne druhy (*T. regenti*). Ich infekčné larvy - cercárie - dokážu penetrovať nie len do definitívnych hostiteľov (vodné vtáctvo), ale aj do náhodných hostiteľov (myši, ľudia). Po opakovanom kontakte s cercáriami sa môže u náhodných hostiteľov objaviť kožná reakcia nazývaná cercáriová dermatitída. Jedná sa o nepríjemne svrbiace vyrážky. U citlivých jedincov sa môže vyskytnúť aj zvýšená teplota, opuch v mieste penetrácie alebo zväčšenie lymfatických uzlín.

Schistosomuly ako ďalšie štádium sú schopné opustiť kožu hostiteľa a migrovať do vnútorných orgánov aj v tele náhodných hostiteľov, kde nedokončia svoj vývoj a hynú niekoľko dní po infekcii. Larválne štádiá nazálnej neurotropnej *T. regenti* môžu počas migrácie svojim definitívnym aj náhodným hostiteľom spôsobovať vážne neuromotorické problémy a z toho dôvodu môže nastať aj úhyn jedincov.

Bolo by preto vhodné mať presný diagnostický marker pre imunologickú, alebo molekulárnu diagnostiku, ktorou by bolo možné odlíšiť pôvodcu ochorenia. Taktiež by bolo vhodné u náhodných hostiteľov vedieť rozoznať, či sa jedná o dermatitídu spôsobenú vtáčimi schistosomami, ľudskými schistosomami, alebo dermatitídu spôsobenú inými alergénmi vyskytujúcimi sa vo vode.

Z tohto dôvodu som sa vo svojej práci zaoberala sérologickou a molekulárnou diagnostikou infekcií spôsobených vtáčimi schistosomami (*T. szidati* a *T. regenti*) u definitívnych a náhodných hostiteľov.

## Ciele práce:

Hlavným cieľom bolo nájsť citlivú diagnostickú metódu, ktorá by vedela zachytiť infekcie spôsobené vtáčimi schistosomami a to u definitívnych aj náhodných hostiteľov, z dôvodu, že žiadna spoľahlivá neinvazívna diagnostická metóda ešte nie je. Pre dosiahnutie výsledkov sme sa zaoberali nasledovnými činnosťami:

- pomocou ELISA sledovať zmenu hladiny špecifických protilátok IgM a IgG v myších sérach proti antigénom z homogenátu cercárií
- zistiť pomocou imunoblotu, aké antigény z homogenátu cercárií (*T. regenti*, *T. szidati* a *S. mansoni*) sú rozpoznávané IgG a IgM protilátkami zo sér infikovaných myší
- otestovať ELISA a imunoblotom skríženú reaktivitu medzi *T. regenti*, *T. szidati* a *S. mansoni*
- separovať rozpoznané proteíny 2D elektroforézou a identifikovať ich pomocou hmotnostnej spektrometrie
- detegovať parazitárnu DNA v biologických materiáloch (sérum, mozgomiešny mok) z infikovaných kačiek a myší

## 2 Literárny prehľad

### 2.1 Modelové organizmy

*Trichobilharzia* je najväčší rod z čeľade Schistosomatidae, ktorý pokrýva viac ako 40 druhov vtáčích parazitov. Dvojhostiteľský cyklus je podobný príbuznému rodu *Schistosoma*. Vodné slimáky slúžia ako medzihostiteľ pre rod *Trichobilharzia* a vodné vtáky ako definitívny hostiteľ (Horák a kol. 2002). *Trichobilharzia regenti* je nazálna neurotropná schistosoma, ktorá ako medzihostiteľa využíva vodného slimáka rodu *Radix*. *Trichobilharzia szidati* patrí medzi viscerálne schistosomy, ako medzihostiteľ im v našom laboratóriu slúži vodný slimák *Lymnaea stagnalis*.

Vtáče schistosomy *T. regenti* a *T. szidati* sú však schopné penetrovať aj do cicavcov (náhodných hostiteľov), ale nedokážu v nich dospieť a produkovať vajíčka (Horák a Kolářová 2001; Kouřilová a kol. 2004a). U opakovane infikovaných myší je Th2 polarizovaná odpoveď a vzniknutá cercáriová dermatitída má na začiatku charakter hypersenzitívnej reakcie typu I a neskôr kožného zápalu (Kolářová a kol. 1997; Kolářová a kol. 2013; Horák a kol. 2015).

#### 2.1.1 Cyklus *Trichobilharzia regenti*

Z vajíčok vyskytujúcich sa v nazálnom tkanive sa liahnu miracídia a uvoľňujú sa do vodného prostredia, najmä okolo dvadsiateho piateho dňa po infekcii (Horák a kol. 1998a). Po nájdení medzihostiteľa doňho miracídium prenikne a transformuje sa na ďalšie larválne štádium, na materskú sporocystu. Materská sporocysta obsahuje zárodočné bunky, z ktorých sa vyvíja larválne štádium dcérska sporocysta. Zo zárodočných buniek dcérskej sporocysty sa vyvíja cercária, ktorá penetráciou tela opúšťa slimáka (Horák a kol. 2002). U cercárií je dokázaná foto-pozitívna reakcia. Stávajú sa aktívnymi tieňmi alebo pri mechanickej stimulácii, kedy plávajú k vodnej hladine (Horák a kol. 1998a). Po penetrácii do kože teplokrvných stavovcov sa cercária transformuje na ďalšie larválne štádium, na schistosomulu. Schistosomuly migrujú v priebehu infekcie definitívneho hostiteľa miechou k miestu svojej definitívnej lokalizácie. Dospelé červy sú lokalizované v mäkkej časti nazálneho tkaniva, často mimo ciev už trinásť deň po infekcii. U niektorých nakazených kačiek sa počas infekcie môže objaviť aj paralýza končatín a to medzi siedmym až osemnástym dňom po infekcii (Horák a kol. 1999).

Keďže cercárie vtáčích schistosom sú schopné penetrovať aj do náhodných hostiteľov, boli robené experimentálne nákazy myší, kde sa sledovala prípadná migrácia červov. U myší boli schistosomuly nájdené v koži, periférnych nervoch, mieche, predĺženej mieche a mozgu 2. – 24. deň po infekcii (Hrádková & Horák 2002) nedokážu však dospieť a hynú.

### **2.1.2 Cyklus *Trichobilharzia szidati***

Cyklus *T. szidati* v rámci medzihostiteľa je podobný s cyklom vyššie popísanej motolice. Z medzihostiteľa sú uvoľnené cercárie a penetrujú do definitívneho hostiteľa. Krátko po transformácii opúšťa schistosomula kožu a migruje cez cievy do krvného riečiska pľúc, obličiek, pečene a čriev. V pľúcach kačiek sa vyskytujú v lúmene pľúcnych tepien a krvných kapilár druhý až desiaty deň po infekcii a tiež vstupujú do vzdušného priestoru a odtiaľ naspäť do krvného riečiska. Migrácia je dokončená v cievach a neskôr v tkanive črevnej steny, kde môžeme nájsť dospelcov.

Aj s touto schistosomou boli uskutočnené experimentálne nákazy myší. Schistosomuly nájdené v pľúcach myší, boli prevažne lokalizované extravaskulárne v alveolárnej stene tkaniva, druhý až štvrtý deň po infekcii, po šiestom dni už boli schistosomuly poškodené (Haas a Pietsch 1991; Chanová a kol. 2007).

## **2.2 Nešpecifická a špecifická imunita**

Imunitná reakcia je výsledkom úzkej spolupráce nešpecifických a špecifických mechanizmov imunity. Oba tieto mechanizmy zahŕňajú bunkové a humorálne zložky.

Vrodený (nešpecifický, neadaptívny) imunitný systém obsahuje obmedzený počet receptorov pre detekciu cudzorodej látky. Je však schopný už niekoľko minút po vystavení patogénu generovať protektívnu zápalovú odpoveď. Do bunkovej zložky nešpecifickej imunitnej odpovede sú zahrnuté fagocytujúce monocyty, granulocyty (neutrofilny, eosinofily, basofily), dendritické bunky a cytotoxické NK bunky. Humorálny komponent zahŕňa komplementový systém, lektíny, interferóny a iné sérové proteíny (Turvey & Broide 2010).

Získaná (špecifická, adaptívna) imunita je vývinovo mladšia, reakcia na patogén sa úplne rozvinie po niekoľkých dňoch až týždňoch. Adaptívna imunitná odpoveď je realizovaná T a B lymfocytmi. Bunkovo sprostredkovaná imunitná odpoveď je založená na T lymfocytoch. Pri humorálnej imunitnej odpovedi sú stimulované B lymfocyty, ktoré

sa zmenia na plazmatickú bunku a sekrétujú protilátky (Alberts a kol. 2002).

### **2.2.1 Th1, Th2, Th17**

Vrodená imunita zohráva kľúčovú úlohu pri aktivácii adaptívnej imunitnej odpovede. Hlavný komponent spájajúci nešpecifickú a špecifickú imunitnú odpoveď tvoria dendritické bunky (DC), ktoré patria medzi bunky prezentujúce antigén (APC). K diferenciácii DC a zmene na APC bunku dochádza po rozpoznaní molekulárnej štruktúry spojenej s patogénom pomocou patogén rozpoznávajúcich receptorov na povrchu DC. Na povrch APC buniek sú vystavené komplexy MHC glykoproteínov II. triedy (MHC gp II) s peptidovými fragmentami pohltených molekúl, ktoré sú rozpoznávané prostredníctvom antigénne špecifického receptora (TCR) na povrchu T lymfocytov (Kapsenberg 2003; Kaiko a kol. 2008).

T lymfocyty exprimujúce TCR môžeme rozdeliť na: CD4<sup>+</sup> T lymfocyty majúce na povrchu CD4 molekuly - koreceptor pre MHC gp II a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty majúce na povrchu molekuly CD8 - koreceptor pre MHC gp I. CD8<sup>+</sup> T bunky majú funkcie spojené s produkciou cytokínov a sú známe ako prekursori cytotoxických T buniek (Tc) a supresorových buniek (Ts). CD4<sup>+</sup> bunky môžeme rozdeliť podľa produkujúcich cytokínov do niekoľkých skupín.

Th1 bunky produkujú IL-2, IFN- $\gamma$  a TNF- $\beta$ , ktoré sú účinné pri ochrane proti intracelulárnym infekciám. Th17 bunky produkujú IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-22 a TNF- $\alpha$ . Zdá sa, že bunky Th17 hrajú dôležitú úlohu pri autoimunitných ochoreniach, pri imunopatologických tkanivových zápalových reakciách ako aj pri aktivácii neutrofilov v boji proti extracelulárnym baktériám (Park a kol. 2005; Liang a kol. 2006; Kaiko a kol. 2008).

Do ďalšej skupiny radíme Th2 bunky, ktoré produkujú interleukíny IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 pri extracelulárných infekciách. Imunitná reakcia Th2 typu sa aktivuje pri kontakte s parazitárnym antigénom. Dochádza k proliferácii a diferenciácii B lymfocytov. Vplyvom IL-4 dochádza k produkcii IgE protilátok. Vplyvom IL-5 sa diferencujú eosinofilné granulocyty a IL-3 a IL-4 stimulujú proliferáciu a degranuláciu žírnych buniek (Kidd 2003).

Cytokíny sú všeobecne považované za hlavné molekuly, ktoré dokážu nasmerovať imunitnú odpoveď k Th1, Th2 alebo Th17 línii. Bolo však zistené, že polarizačné signály sú okrem cytokínov závislé aj od buniek vrodenej imunity, a to od Nk buniek, bazofilov, eosinofilov a mastocytov (Kaiko a kol. 2008).

## 2.2.2 Protilátková imunitná odpoveď

Následujúci všeobecný prehľad v rámci protilátkovej imunitnej odpovede bol čerpaný z posledného vydania knihy od prof. Hořejšího a prof. Bartůňkovej (2013). Protilátková imunitná reakcia je založená na rozoznávaní antigénu pomocou antigénne špecifického receptora (BCR) na povrchu B lymfocytov. BCR je zložený z povrchového imunoglobulínu rozoznávajúceho antigén a signalizačných molekúl. Povrchový imunoglobulín sa radí k IgM a IgD triedam a pozostáva z dvoch ťažkých (H) a dvoch ľahkých (L) reťazcov.

Protilátková odpoveď je buď nezávislá na Th lymfocytoch, alebo primárne a sekundárne Th závislá. Pri Th nezávislej imunitnej reakcii sa B lymfocyty aktivujú a zhlukujú po kontakte s bakteriálnym lipopolysacharidom (LPS) alebo antigénom polymérnej štruktúry. To je signál k diferenciácii na plazmatické bunky a tvorbe IgM protilátok.

Primárna fáza protilátkovej reakcie nastupuje po rozpoznaní antigénu receptorom BCR na B-lymfocyte a po pohltení antigénu pomocou APC. IgM protilátky sú produkované v primárnej fáze protilátkovej odpovede a spolu s antigénom tvoria imunokomplexy. Tie sú zachytené v lymfatických uzlinách na povrchu folikulárnych dendritických buniek (FDC), ktoré slúžia B lymfocytom ako bunky prezentujúce antigén.

Sekundárna fáza protilátkovej reakcie je zahájená po rozpoznaní antigénu na FDC a prijatím signálu od Th lymfocytov. Dochádza k deleniu a diferenciácii B lymfocytov. Miesto IgM protilátok sa začnú produkovať protilátky triedy IgG, IgA a IgE. Tvorba jednotlivých izotypov protilátok závisí od pôsobenia cytokínov. Stimuláciou IL-4 vznikajú IgG a IgE, TGF- $\beta$  a IL-10 je podnetom pre produkciu IgA, za tvorbou IgG2b a IgG3 je IFN- $\gamma$ .

## 2.3 Imunitná odpoveď v koži hostiteľa po penetrácii cercárií *T.regenti*

Cercáriová dermatitída sa prejavuje ako erytém, žihľavka, ktorá sa neskôr zmení na makulopapulárnu svrbivú vyrážku (Kolářová a kol. 2013). Môže byť sprevádzaná opuchom, horúčkou alebo zdurením lymfatických uzlín (Horák a kol. 2002). Závažnosť dermatitídy u ľudí závisí od počtu penetrujúcich cercárií a od imunity postihnutej osoby. Je známe, že opakované invázie cercárií senzibilizujú organizmus, potom je reakcia omnoho intenzívnejšia.

Imunohistopatológia cercáriovej dermatitídy bola experimentálne skúmaná v náhodných hostiteľoch (ľudia, myši) (Horák et al. 2015)

*T. regenti* primárna infekcia myši krátko po penetrácii vyústila v zápalovú reakciu v epidermis a dermis, sprevádzanú opuchom a vazodilatáciou. Ďalej došlo k infiltrácii makrofágov, granulocytov, neutrofilov, MHC II bunkami prezentujúcimi antigén (APC), a v malom počte boli zastúpené CD4+ bunky (Kouřilová a kol. 2004a; Kouřilová a kol. 2004b). Po 18 h boli v *in vitro* kultúre z biopsie kože detegované cytokíny IFN- $\gamma$  zodpovedné za Th1 typ odpovede. Tiež boli produkované zápalové cytokíny IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-12P40, ktoré iniciujú diferenciáciu Th17 buniek (Liang a kol. 2006). Detegované hladiny IL-4 a IL-10 cytokínov spojených s Th2 imunitnou odpoveďou boli len veľmi nízke. Antigénne stimulované lymfocyty z kože jedenkrát nakazených myši produkujú zmiešanú Th1, Th17 a Th2 cytokínovú odpoveď. Cytokíny IL-6 a IL-1 $\beta$  indukujú Th17 imunitnú odpoveď u myši a ľudí infikovaných vtáčimi schistosomami po prvýkrát (Acosta-Rodriguez a kol. 2007).

Oproti tomu u štyrikrát reinfikovaných myši bola výrazne zvýšená infiltrácia granulocytov, APC a CD4+ buniek. Produkcia cytokínov IL-4 a IL-5 asociovaných s Th2 imunitnou odpoveďou bola oveľa vyššia ako u jedenkrát infikovaných myši. (Lichtenbergová & Horák 2012).

## 2.4 Protilátková odpoveď na antigény vtáčích schistosom

Bolo spravených niekoľko štúdií zaoberajúcich sa špecifickou protilátkovou odpoveďou vedenou proti povrchovým antigénom rôznych larválnych štádií, alebo na molekuly sekrétované z acetabulárnych žliaz vtáčích schistosom.

Povrch cercárií ako aj povrch *in vitro* transformovaných schistosomul bol rozpoznávaný IgG protilátkami a celkovým Ig z myších a ľudských sér infikovaných *T. szidati*, avšak *in vivo* transformované schistosomuly z kože a pľúc IgG protilátky nerozpoznávali. IgM protilátky z myšieho séra odobraného po druhej nákaze mierne reagovali s povrchom cercárií a *in vitro* transformovaných schistosomul (Horák a kol. 1998b).

Pomocou metód IF (priamy imunofluorescenčný test) a IFAT (nepriamy imunofluorescenčný test) (Kouřilová & Kolářová 2002) u schistosomy *T. regenti* bolo zistené, že špecifické protilátky IgG zo sér infikovaných myši s *T. regenti* jednoznačne rozpoznávali glykokalyx. Chanová a kol. (2012) zistili, že zvyšky cercáriálneho glykokalyxu sú stále prítomné aj na jeden deň starej *in vitro* transformovanej schistosomule *T. regenti*. (Kolářová a kol. 1994) pomocou ELISA metódy potvrdili, že protilátky myších sér nakazených *T. szidati* a

*S. mansoni* rozoznávajú už po 3 d.p.i. antigény glykokalyxu, a neskôr aj ďalšie cercariálne antigény.

Kouřilová a kol. (2004a) a Lichtenbergová a kol. (2008) sa zaoberali monitoringom dynamiky protilátkovej odpovede pomocou ELISA u náhodných hostiteľov (myši) nakazených *T. regenti*. Hladina špecifických protilátok IgG2a asociovaných s Th1 odpoveďou proti homogenátu cercárií (*T. regenti*) výrazne vzrástla po štvrtej reinfekcii, naproti tomu IgG2b sotva vzrástli v akomkoľvek čase po infekcii Kouřilová a kol. (2004a) a Lichtenbergová a kol. (2008) zaznamenali významný nárast IgM protilátok už od prvej infekcie.

Markantný nárast protilátok IgG1 asociovaných s Th2 odpoveďou bol zaznamenaný najmä po druhej až štvrtej reinfekcii. Nárast hladiny celkového IgE bol značný už po druhej reinfekcii a rástol každou ďalšou reinfekciou (Kouřilová a kol. 2004a).

U protilátkovej odpovedi proti antigénom z E/S produktov bol zaznamenaný rovnaký trend u hladín IgM a IgG1 protilátok. Rozdiel bol v IgG2a a IgG2b protilátkovej odpovedi, kde nebola detegovaná výrazná odpoveď voči E/S produktom (Lichtenbergová a kol. 2008).

## 2.5 Vybrané známe antigény u schistosom

Hostiteľský organizmus po penetrácii cercárii do kože imunitne reaguje na rôzne parazitárne povrchové antigény, alebo na antigény vylučované z penetračných žliaz.

### 2.5.1 Katepsín B a L

Pomocou imunolokalizácie Dalton a kol. (1997) pozorovali prítomnosť katepsínu B a katepsínu L v postacetabulárnych žľazách cercárií *S. mansoni*. Skelly a Shoemaker (2001) lokalizovali katepsín B (Sm31) iba v čreve a v protonefridiách cercárií.

V čreve schistosomul *T. regenti* Dvořák a kol. (2005) identifikovali 6 izoforiem katepsínu B1 (33kDa) (TrCB1.1 – TrCB1.6). Dolečková a kol. (2007) identifikovali štyri cDNA sekvencie katepsínu B1. Jeho prítomnosť bola potvrdená v sporocystách a cercáriách *T. regenti*. Sekvencia vykazuje 100 % zhodu so sekvenciou TrCB1.1 zo schistosomul. Kašný a kol. (2007) z extraktu cercárií *T. regenti* taktiež identifikovali katepsín B (33 – 34 kDa), ktorý je schopný degradovať kolagén a keratín.

## 2.5.2 Trioso-fosfát-izomeráza a glycerinaldehyd-3 fosfát dehydrogenáza

Použitím Western blot analýzy s antigénom homogenátu cercárií *T. regenti* bolo zistené, že špecifické protilátky IgG a IgE zo sér reinfikovaných myší nakazených *T. regenti* sa viazali na niekoľko proteínov (14,7; 17; 28; 34 a 50 kDa). Antigény 25; 34 a 50 kDa boli protilátkami rozpoznávané v E/S produktoch (Lichtenbergová a kol. 2008).

Kašný a kol. (2009) pomocou hmotnostnej spektrofotometrie identifikovali proteíny *T. regenti* ako trioso-fosfát-izomerázu (25 kDa) a glycerinaldehyd-3 fosfát dehydrogenázu (34 kDa).

## 2.5.3 Úzky výber nových antigénov významných pre diagnostiku

Carvalho a kol. (2011) identifikovali ďalšie antigény vhodné pre diagnostiku *S. mansoni*. Pri výbere vhodných kandidátov bol kladený dôraz na to, aby vytipované antigény neboli podobné s proteínmi iných helmintov a ľudskými proteínmi. Na zhodnotenie imunogenicity vybraných proteínov bola zvolená Western blot analýza (1D, 2D). Použitím antigénu zo schistosomul a dospelých červov *S. mansoni* bolo dokázané, že IgG protilátky zo séra infikovaných myší rozpoznávajú proteíny 12,8 kDa, 16,5 kDa (cytochróm oxidáza), 18,9 kDa (cytochróm oxidáza) a 43,5 kDa.

## 2.6 Molekulárna analýza

Molekulárna analýza je jedna z tých najcitlivejších a najšpecifickejších metód na určovanie druhov parazitov alebo na zistenie ochorenia pred a po jeho prepuknutí. V porovnaní s inými dostupnými diagnostickými metódami má táto metóda najmenej skřížených a falošne pozitívnych/ negatívnych reakcií.

### 2.6.1 Mitochondriálny (mt) genóm

Mitochondriálny genóm bol sekvenovaný u rôznych parazitických helmintov ako aj u zástupcov rodu *Schistosoma* z dôvodu prístupu k novým potencionálnym molekulárnym markerom. Kompletný mt genóm bol charakterizovaný napríklad u *S. haematobium*,

*S. mekongi*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. spindale*, *Paragonimus westermani*, *F. hepatica*, *Hymenolepis diminuta*, *Taenia solium*, *T. asiatica*, *Echinococcus multilocularis* a *E. granulosus* (Littlewood a kol. 2006).

Webster a kol. (2007) charakterizovali mt genóm u *T. regenti*, za účelom vytvorenia nových molekulárnych markerov pre diagnostiku ekologickej, epidemiologickej a fylogenetickej štúdie. Dĺžka mt genómu (DQ859919) je 14 838 bp a pozostáva z génov (*cox3*, *cytb*, *nad4L*, *nad4*, *atp6*, *nad2*, *nad1*, *nad3*, *cox1*, *cox2*, *nad6*, *nad5*) a 24 mitochondriálnych tRNA. Tiež obsahuje tri tandemovo repetitívne regióny dĺžky 184 bp, ktoré môžu slúžiť ako ďalší potencióálny marker. Ďalej bolo zistené, že z hľadiska poradia génov je mitochondriálny mt genóm *T. regenti* identický s mt genómom *S. japonicum*.

## 2.6.2 Jadrový genóm

### rDNA

ITS1 oblasť rDNA môže slúžiť k rozlíšeniu fylogenetických vzťahov v rámci rodu. ITS1 oblasť bola popísaná u *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mattheei* a *S. japonicum* (Kane a Rollinson 1994; Herwerden van a kol. 1998). Rovnaká oblasť rDNA bola popísaná aj u vtáčích schistosom. Amplifikáciou DNA boli získané PCR produkty rôznych dĺžok troch analyzovaných druhov *T. regenti*, *T. szidati* a *T. franki*. Každý produkt pozostával z ITS1, ITS2, 5.8 regiónov a z čiastočných sekvencií 18s, 28s rRNA génov. Sekvencie 5.8S, 18s, 28s boli medzidruhovo identické a podobné aj s inými schistosomami. Sekvencie ITS1 a ITS2 vykazovali medzidruhovú rozdielnosť, tak aj v dĺžke PCR produktov. Sekvencia ITS1 oblasti obsahuje tandemovo repetitívne elementy, a taktiež ukazuje vyšší stupeň medzidruhovej variability ako sekvencia ITS2 oblasti. Podľa autorov sú tieto sekvencie vhodné nielen k tvorbe fylogenetických stromov, k overeniu medzidruhových vzťahov medzi trichobilharziami, ale aj k navrhnutiu špecifického markeru pre diagnostiku (Dvořák a kol. 2002).

## 2.6.3 Tandemovo repetitívna sekvencia

Hamburger a kol. (1991) charakterizoval krátku tandemovo repetitívnu DNA sekvenciu 121 bp (Sm1 – 7), ktorá je vysoko zastúpená v genóme *S. mansoni*. Túto sekvenciu považuje za veľmi dobrú sondu, a to z dôvodov vysokej detekčnej senzitivity, a pretože

sekvencia je pravdepodobne nekódujúca, vyvíja sa rýchlejšie ako zbytok genómu. Zistil, že tvorí až 12 % z celkového genómu *S. mansoni*, čo tvorí 600 000 kópií na bunku (Pontes a kol. 2003). Pomocou Dot-blot hybridizačnej analýzy bola preukázaná skrížená reaktivita sondy s *S. haematobium*, čo naznačuje podobnosť sekvencií.

Preto bola klonovaním charakterizovaná tandemovo repetitívna DNA sekvencia o veľkosti 121 bp aj z genómu *S. haematobium* (*DraI*), ktorá tvorí okolo 15 % celkového genómu. Pomocou Dot-blot hybridizácie nebola zistená žiadna skrížená reakcia s *S. mansoni* ani s *T. ocellata* (Hamburger a kol. 2001).

Tandemovo repetitívna DNA sekvencia o veľkosti 396 bp (*ToSau3A*) bola taktiež charakterizovaná u *T. regenti*, *T. szidati* a *T. franki*. Hertel a kol. (2002) odhadujú, že sekvencia reprezentuje 2 % genómu *T. regenti*, 1,5 % genómu *T. szidati* a 1 % genómu *T. franki* (14 000, 10 000 a 7000 kópií na bunku). Dot-blot hybridizáciou bola zistená len medzidruhová skrížená reaktivita, nie s *S. mansoni*.

#### 2.6.4 Výber molekulárnych markerov použitých na diagnostiku parazitárnej DNA v biologickom materiáli

V tabuľke 1 je uvedený , len veľmi úzky výber molekulárnych markerov využívaných v diagnostike niektorých nami vybraných helmintov.

**Tabuľka 1.** Úzky výber molekulárnych markerov používaných u nami vybraných helmintov v diagnostike zo séra a mozgomiešneho moku.

Gén, sekvencia	Organizmus	Biologický materiál (L – z ľudí; M – z myší)	PCR metóda/ sensitivita metódy	Autor
COX1	<i>S. mansoni</i>	sérum, moč (L)	PCR/ 0,01 pg	(Kato-Hayashi a kol. 2010)
	<i>S. japonicum</i>			
	<i>S. haematobium</i>			
	<i>S. mekongi</i>			

COX1	<i>T. solium</i>	sérum	nested-PCR/ 10-13g	(Ramahefarisoa a kol. 2010)
Sm1 – 7	<i>S. mansoni</i>	sérum, stolica (L)	PCR/ 1 fg	(Pontes a kol. 2002)
Sm1 – 7	<i>S. mansoni</i>	plazma (*CFPD) (L, M)	Real-time PCR/ 68,8 kópií na ml	(Wichmann a kol. 2009)
Sm1 – 7	<i>S. mansoni</i>	sérum (*CFPD) (M)	PCR/ –	(Hussein a kol. 2012)
pTsol9 (repetitívny element <i>T. solium</i> genómu)	<i>T. solium</i>	mozgomiešny mok (L)	PCR/ 10 fg	(Michelet a kol. 2011)
pTsol9	<i>T. solium</i>	sérum, mozgomiešny mok (L)	Real-time PCR/ –	(Yera a kol. 2011)
28S ITS	<i>S. mansoni</i> <i>S. japonicum</i> <i>S. haematobium</i>	moč (L)	PCR/ 0,98 – 3,7 pg	(Sandoval a kol. 2006)

\*CFPD cell free parasite DNA

### 2.6.5 Molekulárne markery použité pri monitoringu schistosom v jazeroch

Pri podozrení na prítomnosť ľudských a vtáčích schistosom v prírodných kúpaliskách sa v prvom rade vyšetrujú vodné slimáky, aby sa potvrdila prítomnosť parazita. Ak ich však nie je možné nájsť, existuje metóda založená na rozbere veľkého množstva vody z jazera. Pomocou filtrovania a koncentrovania vzoriek je v závere DNA extrahovaná z malého množstva supernatantu. V tabuľke 2 sú uvedené molekulárne markery používané pri detekcii parazitárnej DNA z vody.

**Tabuľka 2:** Molekulárne markery využívané pri hľadaní cercárií v jazerách

Gén, sekvencia	Organizmus	Materiál	sensitivita PCR metódy	Autor
Sm1 – 7	<i>S. mansoni</i>	voda s cercáriami	PCR/ 1 cercária	(Hamburger a kol. 1998)
ToSau3A	<i>Trichobilharzia</i> spp.	voda s cercáriami	PCR/ –	(Schets a kol. 2010)
ITS1, ITS2	<i>Trichobilharzia</i> spp.	voda s cercáriami	PCR/ nenaamplifikovali DNA	(Schets a kol. 2010)

### **3 Materiál a metodika**

#### **3.1 Zber cercárií**

Infikované slimáky (*T. regenti* – *Radix peregra* a *T. szidati* – *Lymnaea stagnalis*) boli zozbierané z akvárií do oddelených sklenených pohárov, na ktoré sa nechalo svietiť svetlo po dobu 1 – 2 h. Potom sa pomocou sita separovali slimáky od vody s cercáriami, ktorá sa preliala do vysokej odmernej banky obalenej alobalom osvetlenej na vrchnom okraji studeným svetlom. Skoncentrované cercárie boli zbierané do 50 ml centrifugačných skúmaviek. Pred nákazou laboratórných zvierat sa zozbierané cercárie spočítali.

#### **3.2 Experimentálne nákazy laboratórných zvierat**

##### **3.2.1 Nákazy kačiek**

Kačky *Anas platyrhynchos f. domestica* sa nakazovali vo veku 7 – 12 dní. Pred infikovaním boli kačkám umyté nohy, tie sa potom vložili do nádoby s 1000 – 1500 cercáriami na 1 h. Po nákuze boli nohy skontrolované či došlo k penetrácii cercárií. Následne sa kačky označili farebnými krúžkami a vrátili sa naspäť do chovných kliebok.

##### **3.2.2 Nákazy myší**

Myši C57Bl/6 (inbredný kmeň, samice, 16 týždňov staré) boli umiestnené v izolátore v CEB (Centrum pro experimentální biomodely) vo zverinci 1. LF UK. Myši boli infikované podľa metodiky popísanej Lichtenbergovou a kol. (2008). Infekcia prebehla v uzavretých nádobách, kde boli myšie nohy a chvost vystavené 1000 cercáriám po dobu 1 h v tme. Po nákuze boli myši separovane umiestnené do plastovej chovnej nádoby.

### **3.3 Odber krvi, mozgomiešneho moku a spracovanie biologického materiálu**

#### **3.3.1 Kačky**

##### **Odber mozgomiešneho moku kačky**

Odber bol vykonaný MVDr. Nečasovou za sterilných podmienok vo veterinárnej ambulancii (Veterinárni klinika Na hrádku). Podľa metodiky Moore a kol. (1994) boli kačky pred zákrokom 24 h bez stravy. Likvor sa odoberal do sterilných 1,5 ml mikroskúmaviek v celkovej anestéze špeciálnymi ihlami Spinocan 22G z *cisterna magna* v objeme 100 – 500 µl. Interval odberov bol každý piaty deň od nákazy cerkárkami *T. regenti* aj s negatívnou kontrolou (5, 10, 15 a 20 d.p.i.). Vzorky likvoru boli skladované pri -20 °C.

##### **Odber krvi kačky**

Miesto vpichu sa pred odberom vydenzifikovalo etanolom. Krv sa odoberala bez anestézy pomocou inzulínovej striekačky U100 29G z *aa. metatarsales dorsales* v množstve 100 – 1000 µl v závislosti od veľkosti kačky do 1,5 ml sterilných mikroskúmaviek. Na zastavenie krvácania bol v mieste odberu vyvinutý mierny tlak so suchou gázou. Pre rýchlejšie zacelenie rany bol použitý tekutý obväz (URGO sprej). Odobratá krv sa nechala stáť vo zvislej polohe cca 1 h a stočila sa pri 1500 g/ 10 min. Získané sérum bolo odobraté a v malých alikvótoch skladované v -20 °C.

#### **3.3.2 Myši**

##### **Odber krvi myší**

Krv z myši bola získaná z laterálnej chvostovej žily podľa návodu Joslina (2009). Pred odberom krvi sa myš znehybnila umiestnením do fixátora. Pre lepšiu viditeľnosť žíl bol chvost vložený do valca s teplou vodou (35 °C). Miesto odberu sme opäť dezinfikovali etanolom. Vydenzifikovanou žiletkou bola prerezaná laterálna chvostová žila a miernym tlakom prsta sa chvost masíroval pre kontinuálne vytekanie krvi. Krv bola zbieraná pomocou sklenených kapilár v objeme do 200 µl. Krvácanie bolo zastavené tlakom suchou gázou a použitím tekutého obväzu. Krv bola stočená pri 1500 g / 15 min a sérum bolo odpipetované a uskladnené v -20 °C.

### 3.4 Príprava antigénu z homogenátu cercárií

Cerkárie boli zbierané (viď časť 3.1) na ľade. Po usadení sa na dno centrifugačnej skúmavky sa stočili v centrifuge vychladenej na 4°C / 5000rpm / 10 min. Tento krok sa opakoval 3x, po každom nasledovalo premytie vodou. Do 2 ml mikroskúmavky bol nakoniec pridaný (7x) inhibítor proteáz cOmplete Mini EDTA-free (Roche). Na vytvorenie homogenátu bol použitý sonikátor Vibra Cell™ 72405 (Bioblock Scientific) a sonikovalo sa na ľade (4×10s, pri amplitúde 50). Vytvorený homogenát cercárií bol centrifugovaný 16 000 g / 20 min v 4°C. Supernatant bol aliquotovaný po 100 µl a uchovávaný v -80 °C.

### 3.5 Meranie koncentrácie proteínu

Vzorky a proteínové štandardy 0 – 400 ng/µl boli pripravené pomocou kitu QUANT-IT™ PROTEIN ASSAY KIT (Invitrogen) v 96 jamkových čiernych mikrotitračných doštičkách (Nunc). Fluorometrom Infinite M200 (TECAN) pri OD 470 nm/ 570 nm bola meraná koncentrácia proteínu. Kalibračná krivka bola vyhodnotená v programe MAGELLAN.

### 3.6 ELISA a proteínová analýza

#### 3.6.1 Proteínová elektroforéza 1D (SDS-PAGE)

Použité roztoky:

Roztok A: (20x) pufor NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen) s dH<sub>2</sub>O

Roztok B: do roztoku A 250 ml bolo pridané 500 µl antioxidantu (NuPage Invitrogen)

Na separáciu proteínov z homogenátu cercárií *T. regenti* (TRhc), *T. szidati* (TShc) a *S. mansoni* (SMhc) bola použitá 1D (SDS-PAGE) elektroforéza, ktorá prebehla na 1 jamkovom/ 10 jamkovom, 4-12% gély (NuPAGE® Bis-Tris Precast ) o hrúbke 1 mm v cele X Cell Sure Lock™ Mini-Cell (Invitrogen). Do vnútornej komory bol naliaty roztok B a do vonkajšej roztok A. Vzorka homogenátu (250 µg/1 jamkový gél, 20 µg do jednej jamky na 10 jamkový gél) bola zmiešaná s (1:3) LDS (NuPAGE® Invitrogen) vzorkovým puforom a s (1:10) redukčným roztokom 50mM Dithiotreitol (Sigma) a nanosená na gél. Delenie proteínov prebehlo vertikálne za redukujúcich podmienok pri napätí 100 V (2 gély) alebo 80 V (1 gél) s

proteínovým štandardom Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad). Separované proteíny boli z gélu preblotované pomocou Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) na PVDF membránu (Bio-Rad).

### **3.6.2 Farbenie gélu**

Roztoky:

Farbiaci roztok "Coomassie gel stain"

1, 2 g brilliant blue R

300 ml metanolu

240 ml  $d_4H_2O$

60 ml kyseliny octovej

Odfarbovací roztok "Coomassie gel de-stain"

250 ml metanolu

100 ml kyseliny octovej

650 ml  $d_4H_2O$

Po dokončení proteínovej elektroforézy a po preblotovaní boli gély farbené roztokom "Coomassie gel stain". Tento roztok slúži na vizualizáciu elektroforeticky rozdelených proteínov a ku kontrole preblotovaných proteínov. Farbenie gélu prebehlo za stáleho trepania 15 min. Gél bol odfarbovaný pomocou "Coomassie gel de-stain" až do objavenia proteínových prúžkov. Potom sa gél preložil do  $d_4H_2O$ , aby nedochádzalo k ďalšiemu odfarbovaniu.

### **3.6.3 Imunoblot**

Použité roztoky:

Premývací pufor:

TBS-T, pH 7,5 (20 mM Tris base, 150 mM NaCl,  $d_4H_2O$ , 0,01% Tween 20)

Blokovací pufor:

TBS-T + 5 % nízkoťučné mlieko v prášku (Bio-Rad)

Membrána PVDF sa zmáčala metanolom, premyla sa  $dH_2O$ , následne sa zafarbila pomocou roztoku Ponceau S 0,01%. Z PVDF membrány bol odstránený marker a zbytok bol nastrihaný na prúžky o šírke 2,5 mm. Jednotlivé prúžky boli vložené do 12 žliabkovej doštičky a nechali sa blokovať v blokovačom pufri 3 h. Prúžky boli inkubované 1,5 h s myšími sérami, ktoré sa riedili v blokovačom pufri v pomere 1:80. Každý prúžok bol po inkubácii premytý premyvacím pufrom 3x po 5 min a inkubovaný 1 h so sekundárnou protilátkou riedenou v blokovačom pufri v rôznych pomeroch vid' Tabuľka 3.

**Tabuľka 3:** Riedenie sekundárnych protilátok v závislosti od použitého antigénu

Sekundárna protilátka	Riedenie u TRhc membrány	Riedenie u TShc membráy	Riedenie u Smhc membráy
IgG	1:2000	1:2000	1:2000
IgM	1:5000	1:1000	–

Po inkubácii boli prúžky premyté premyvacím pufrom 3x po 5 min a potom bol na ne napipetovaný substrátový roztok z kitu Opti – 4CN <sup>TM</sup> (Bio-Rad). Vyvinutá reakcia bola zastavená  $dH_2O$ . Všetky kroky prebehli pri laboratórnej teplote a za stáleho trepania.

Prúžky sa nechali vyschnúť, následne sa nalepili na papier aj s proteínovým štandardom a dali sa oskenovať na skeneri GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). Vyhodnotenie blotov prebehlo pomocou programu Quantity One (Bio-Rad). Vďaka tomuto programu sa zistila molekulová veľkosť jednotlivých antigénov rozpoznávaných protilátkami IgM a IgG v priebehu infekcie.

### 3.6.4 Proteínová elektroforéza 2D

Použité roztoky:

Rehydratačný roztok 10 ml:

7 M Urea (Bio-Rad)

2 M Thiourea (Sigma)

4% Chaps (Bio-Rad)

100 mM DTT (Sigma)

0,5% Amfolyty pH 3 – 10 (Bio-Rad)

zrnko Bromfenolovej modrej (LACHEMA)

dH<sub>2</sub>O

Ekvilibračný roztok základný 50 ml:

6 M Urea

2% SDS

0,05 M Tris – HCl pH = 8,8 (Invitrogen)

20% Glycerol

dH<sub>2</sub>O

Ekvilibračný roztok I: pridať 2% DTT (Sigma)

Ekvilibračný roztok II: pridať 2,5% Iodacetamid (Sigma)

Deň I. : K homogenátu (250 µg) bola pridaná v pomere 1:1 vychladená 20% kyselina trichlóroctová v acetóne (TCA) a vzorka bola inkubovaná cez noc v – 20 °C.

Deň II.: Vzorka bola zcentrifugovaná pri 4 °C, 16 000g / 10 min. Odpipetoval sa supernatant a 2x sa premyl vychladeným acetónom v pomere 1:1 (centrifugácia rovnako). Šetrne bol odobratý supernatant a nechal sa vysušiť v – 20 °C/1 min. Pelet bol rozpustený v 125 µl rehydratačného roztoku, pridalo sa 0,3 µl amfolytov pH 3 – 10 a vzorku sa napipetovala na dno žliabku 12 žliabkovej doštičky. Prúžky IPG ReadyStrip™, pH 3-10 (Bio-Rad) boli vložené gélovou časťou na vzorku a inkubovali sa 1 h pri laboratórnej teplote (LT). Po inkubácii sa prúžky prekryli 1,5 ml minerálnym olejom (Bio-Rad) a nechali sa inkubovať 10 – 16 h/ LT

Izoelektrická fokusácia (IEF):

Elektródové drôtičky žliabkov fokusačnej misky boli prekryté navlhčenými papierikmi. Prúžky IPG sa vložili do žliabkov fokusačnej misky gélom nadol podľa naznačenej polaroty a prevrstvili sa 1,5 ml minerálnym olejom. Miska bola vložená do fokusačnej cely PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad).

Protokol IEF prebiehal za aktívnej rehydratácie pri 50V / 20 °C/ 2 h, ďalším krokom bol režim rapid / 4000V a potom táto reakcia prebiehala 30 000 V-hodín.

Deň III.:

Prúžky sa vybrali, odkvapkal sa prebytočný minerálny olej a umiestnil sa každý do čistého žliabku 12 žliabkovej doštičky gélom nahor. Prúžky boli prevrstvené ekvilibračným roztokom I a inkubovali sa 10 min za stáleho trepania. V ďalšom kroku sa pridal ekvilibračný roztok II a opakovala sa inkubácia.

Na proteínovú elektroforézu 1D (SDS-PAGE) bol použitý 1 jamkový 12% gél (NuPAGE® Bis-Tris Precast) o hrúbke 1mm. Po inkubácií sa prúžky prepláchli v roztoku B (viď roztoky v časti 3.6.1). Každý prúžok sa opatrne vložil do jamky gélu. Ďalšie kroky boli zhodné s časťou 3.6.1. Následne bol gél z 1D elektroforézy zafarbený (viď časť 3.6.2) a druhý gél bol preblotovaný.

Imunoblot

Všetky kroky zhodné s časťou 3.6.3, ale membrána nebola nastrihaná na prúžky a inkubácia s myším sérom prebiehala pri teplote 4 °C cez noc a za stáleho trepania.

### **3.6.5 Vyhodnotenie imunoblotu**

Membrána aj oba odfarbené gély boli oskenované na skenery GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). Vyhodnotenie prebehlo pomocou programov Quantity One (Bio-Rad) a grafickým editorom GIMP. Spoty z oboch gélov zhodné so spotmi na membráne boli vyrezané a vložené do 1,5 ml mikroskúmaviek. Pre analyzovanie neznámych proteínov boli

vzorky zaslané do Laboratória hmotnostnej spektrometrie (PřF UK). Následne získané sekvencie boli porovnávané s databázou NCBI (BLASTp) a tiež voči transkriptómu *T. regenti*.

### 3.6.6 ELISA

Použité roztoky:

Premývací roztok:

PBS-T; 0,1 M PBS (10x), pH 7,4 ( 1.5 M NaCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O) + 0,05% Tween 20 (Bio-Rad)

blokovací roztok:

PBS - T (+ 5% nízkoúčinné mlieko v prášku (Bio-Rad))

Antigén o koncentrácií 0,625 µg/ 100 µl (homogenát cercárií TRhc, Tshc) bol rozriedený v uhličitanovom pufri (pH 9,6) a napipetovaný na 96 jamkovú mikrotitračnú doštičku (MaxiSorb, Nunc). Inkubácia prebehla vo vlhkej komôrke cez noc v 4 °C. Všetky nasledujúce kroky boli vykonané vo vlhkej komôrke pri izbovej teplote a za stáleho trepania. Doštička bola 3x po 1 min premytá 150 µl PBS-T. Na zablokovanie nešpecifickej reakcie bol použitý blokovací roztok. Inkubácia prebiehala 2 h. Po odstránení blokovacieho roztoku boli myšie séra riedené podľa tabuľky 3 v 100 µl PBS-T a inkubované 2 h. Následne bola doštička 3x po 1 min premytá 150 µl PBS-T. Sekundárne protilátky (vid' Tabuľka 4) boli riedené do 100 µl PBS-T a nechali sa inkubovať 1,5 h.

**Tabuľka 4:** Riedenie myších sér a sekundárnych protilátok v závislosti od antigénu

Antigén	Riedenie	IgG	IgM
Antigén TRhc	Riedenie protilátky	1:8000	1:10000
	Riedenie séra	1:80	1:200
Antigén TShc	Riedenie protilátky	1:8000	1:10000
	Riedenie séra	1:80	1:400

Doštička sa premyla 6x po 1 min 150 µl PBS-T a pomocou 100 µl substrátu 3,3' 5,5'

tetramethylbenzidín (TMB) (Sigma) sa vizualizovala reakcia. Prostredníctvom 100 µl 1 M HCl bola táto reakcia zastavená. Na fluorometri Infinite M 200 (Tecan) prebehlo meranie absorbančie pri OD 450 nm (program MEGELLAN). Cutoff hodnoty boli vypočítané z 10 negatívnych sér podľa Frey a kol. (1998).

### **3.7 Molekulára analýza**

#### **3.7.1 Izolácia DNA**

##### **Cerkárie**

Z cercárií *T. regenti*, *T. szidati* a *S. mansoni* konzervovaných v 96% etanole bola DNA izolovaná buď komerčným kitom QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) podľa návodu výrobcov, alebo HotSHOT metódou podľa (Rudbeck & Dissing 1998).

Protokol pre HotSHOT:

Po odsatí etanolu bolo k cercáriám pridaných 20 µl 0,2 M NaOH (bez úpravy pH~12) (Penta), a inkubácia prebehla 30 min/ 75 °C. Extrakcia bola zastavená pridaním 180 µl TRIS-HCl (bez úpravy pH~5) (Sigma).

##### **Izolácia DNA - Sérum, mozgomiešny mok**

Na izoláciu DNA zo sér (infikované kačky a myši) sa použilo niekoľko komerčných kitov: QIAamp DNA mini kit (QIAGEN), DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN), Isolate II blood DNA kit (BIOLINE). Pri komerčných kitoch sa postupovalo podľa pokynov výrobcu.

Pred izoláciou DNA boli vzorky mozgomiešneho moku upravené podľa protokolu (Michelet a kol. 2011). Celková DNA zo séra a likvoru bola získaná použitím kitu DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN) a Isolate II blood DNA kit (BIOLINE) a QIAamp DNA mini kit (QIAGEN). Ďalej bola na izoláciu DNA zo séra a likvoru použitá HotSHOT metóda podľa protokolu Rudbecka a Dissinga (1998).

Protokol pre HotSHOT bol rovnaký ako v časti 3.7.1.1. s rozdielom: NaOH bolo pridané k 5 µl séra/ mozgomiešneho moku a inkubácia prebehla 5 min/ LT.

### 3.7.2 Meranie koncentrácie DNA

Koncentrácia každej vyizolovanej DNA bola meraná na spektrofotometre NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) pri 230/260 nm a 260/280 nm.

### 3.7.3 Testované primery

Cytochróm c oxidáza (COI)

Sekvencie primerov (vid' Tabuľka 5) pre COI boli získané od Lockyera a kol. (2003).

**Tabuľka 5:** Primery pre cytochróm c oxidázu

Názov	Sekvencia primeru	Dĺžka amplikonu
COX1schist	F: TCTTTRGATCATAAGCG R: TAATGCATMGGAAAAACA	1100 bp

### ITS 1

ITS 1 oblasť bola zvolená ako vhodný diagnostický marker, pretože sekvencie jednotlivých druhov vtáčích schistosom sú rozdielne. Primery pre ITS 1 oblasť boli navrhnuté podľa sekvencií od Dvořáka a kol. (2002) (vid' obrázok 1).

Univerzálne primery pre ITS 1 region (PCR a nested PCR) (vid' Tabuľka 6.) boli navrhnuté tak, aby veľkosti jednotlivých amplikónov boli na gély okom odčítateľné.

Navrhnuté boli taktiež primery špecifické pre odlíšenie *T. regenti* od ostatných schistosom. Špecifita všetkých primerov bola testovaná pomocou NCBI (BLAST).

gb AF263829.1 _54-1378	ACAAGACATTCAAACATGTACCCCAATFGAAGCACGGATATTGTTCTGGTG 50
gb AF356845.1 _54-1019	ACAAGACATTCAAACATGTACCCCAATFGAAGCACGGATATTATTCTGGTG 50
gb AF263828.1 _54-798	ACAAGATTCTCAAACATGTACCCCAATFGAAGCACGGATATTGTTGTGGTG 50
gb AF263829.1 _54-1378	TGCTGAGACATGCCAGTTGGTGTAGGTTCCCCAGATCTAAAC-ACCAAAG 99
gb AF356845.1 _54-1019	TGCTGAGACATGCCAGTTGGTGTAGGTTCCCTAGATCAAAC-ACCAAAA 99
gb AF263828.1 _54-798	TGCTAAGACACGCCAGTTGGTGTGGTTGACCTG-CCTAGTCGACCG--G 97
gb AF263829.1 _54-1378	AGCACAAAAGAGTGRAATACTCTTGAAGACTGGGA-GGGCAGTCARTA 340
gb AF356845.1 _54-1019	AGCACAAAAGAGTGRAATACTCTTGCAGACTGAGCTGGGCAGTCGATGAA 321
gb AF263828.1 _54-798	AGCACAAATGAGTGRAAGTA-TCATGATGGCTGTCC----CAGTCGAT--- 233
gb AF263829.1 _54-1378	CGATTGAGAGAGGTGTTCAITGTCGGTTTCATTGATCAAGTGTGTTGGCT 390
gb AF356845.1 _54-1019	-----AAGGA-----TCTTGGTGGTCCTTTGAT-GAGTGTGTTGGCC 359
gb AF263828.1 _54-798	-----CATTGAT----- 240
gb AF263829.1 _54-1378	TGGGCAACCAATTCAGCACAAGAGAGTGAAGTAATCTTGAAGACTAGGAGG 440
gb AF356845.1 _54-1019	TGACGAAACCAATTCAGCACAAGAGAGAGTAATCTTGCAGACTGAGAGG 409
gb AF263828.1 _54-798	-----AGAGAAATA-TAT----- 252
gb AF263829.1 _54-1378	GCAGTCAATAGATGATGAGAGAGGTGTTTCATGTCGGTTCATTGATAAGT 490
gb AF356845.1 _54-1019	GCAGTCGATG----- 419
gb AF263828.1 _54-798	----- 419
gb AF263829.1 _54-1378	GTTGTTTGGCTTGGGCAACCAATTCAGCACAAGAGAGTGGGTAAGTGG 540
gb AF356845.1 _54-1019	-----AAAAGGAT----- 427
gb AF263828.1 _54-798	-----GAT----- 255
gb AF263829.1 _54-1378	AGACTGGCACCGCAGTCAATAGACGATTGAGAGAGGTGTTTCATGTTGGTT 590
gb AF356845.1 _54-1019	--ACTGG-----TGGTC 437
gb AF263828.1 _54-798	--CT-----TGGT- 261
gb AF263829.1 _54-1378	GACCGGGTACCTAGCCTGTTCATATGCTCTGATGGTGTTCCTGTGACTTT 1033
gb AF356845.1 _54-1019	GACCGGGTACCTAGCCTGTTCATATGCTCTGATGGTGTTCCTGTGACTTT 674
gb AF263828.1 _54-798	GACCGGGTACCTAACCTGTTCATATGCTCTGATGGTGTTCCTGTGACTTT 452
gb AF263829.1 _54-1378	TGTTGCCAGATCTGCCAAGGGCGATGGGATAGTACGCGACCTAATGGTTG 1083
gb AF356845.1 _54-1019	TGTTGCCAGATCTGCCAAGGGCGATGGGATAGTACGCGATCTAATGGTTG 724
gb AF263828.1 _54-798	TGTTGCCAGATCTGCCAAGGGCGATGGGACAGTACGCGACCTAATGGTTG 502
gb AF263829.1 _54-1378	TGTGCAAGGTTTGARGAAGGCCTGTGTGCTATATGCATGCGCCCTCG-CCCT 1132
gb AF356845.1 _54-1019	TGTGCAAGGTTTGARGAAGGCCTGTGTGCTATATGCATGCGCCCTCG-CCCT 773
gb AF263828.1 _54-798	TGTGCAAGGTTTGARGAAGGCCTGTGTGTTAATTGCATACGCCCTCGGCCCT 552

**Obrázok 1.** ITS1 región rDNA (časť sekvencie ITS1 regiónu, podľa ktorej boli navrhnuté primery) (vždy je farebne vyznačený prvý forward primer a druhý revers primer, AF263829.1 – *T.regenti*, AF356845.1 – *T.franki*, AF263828.1 – *T.szidati*)

**Tabuľka 6:** Primery pre ITS 1

Názov	Sekvencia primeru	Dĺžka amplikonu
Univerzálne primery vonkajšie pre všetky 3 druhy (sch ITS1v)	F: CATGTACCCAATTGAAGCACGGA R: GCCTTCTTCAAACCTTGCACACAACC	<i>T. regenti</i> - 1089bp <i>T. szidati</i> - 508bp <i>T. franki</i> - 730bp
Univerzálne primery vnútorné degenerované pre všetky 3 druhy (sch ITS1n)	F: TGTGCTRAGACAYGCCAGTKGG R: GAACACCATCAGAGCATATGACAGG	<i>T. regenti</i> - 969bp <i>T. szidati</i> - 393bp <i>T. franki</i> - 615bp
Špecifické primery pre <i>T. regenti</i> (TR specif)	F: AGTTGGTGTAGGTTCCCCAGATC R: GCCCTCCCAGTCTTCAAGAGTATTT	265bp
Univerzálne primery vonkajšie pre všetky 3 druhy (sch vonk)	<b>F: CAAACATGTACCCAATTGAAGCACGG</b> <b>R: CCTTCTTCAAACCTTGCACACAACC</b>	<i>T. regenti</i> - 1092bp <i>T. szidati</i> - 511bp <i>T. franki</i> - 733bp
Primery vnútorné forward pre <i>T. regenti</i> a <i>T. franki</i> (sch nested trtf)	<b>F: TGGTGTGCTGAGACATGCCAGTT</b> <b>R: CACGAGAACACCATCAGAGCATATG</b>	<i>T. regenti</i> - 982bp <i>T. franki</i> - 623bp
Primery vnútorné forward pre <i>T. szidati</i> (sch nested ts)	<b>F: GGTGTGCTAAGACACGCCAGTG</b> <b>R: CACGAGAACACCATCAGAGCATATG</b>	400bp
Špecifické primery pre <i>T. regenti</i> (TR ITS specif)	F: GACGATTGAGAGAGGTGTTTCATGTCCG R: CCGTGCCAGTCTTCAACATTACCTCA	213bp

## Tandemovo repetitívna sekvencia

Táto sekvencia bola zvolená z dôvodu 2% zastúpenia v celkovom genome schistosomi *T. regenti*. Zo sekvencie získanej od Hertela a kol. (2002), (viď obrázok 2) boli prevzaté (T 1323-1 a T 1323-2) a navrhnuté nové (TR2) primery (viď tabuľka 7).

Tabuľka 7. Primery pre T1323

Názov	Sekvencia primeru	Dĺžka amplikonu
T 1323-1	F: GTGACTTGCTACAGGTTGG R: GGCAAGCTCGTATAACCATTC	200bp
T 1323-2	F: GACGACAATAGTTGGGGT R: GGCAAGCTCGTATAACCATTC	104bp
TR2	F: GATGTCCCACCGCCGCAATG R: CAGTACGCACCCACTGGGTTTCGAAC	159bp

### Multiple sequence alignment- klon T1323

T.ocellata GATCAACTCGTAAAAACATAACTAATCCTTACAAACCAAACAACTAAAGAAAATTATTCTGATG 60

T.regenti GATCAACCCGTAAAAACATAACTAATCCTTACAAACCAAACAACTATAGAAAGTTAATCTGATG 60

T.ocellata CTCGCTA GTGACTTGCTACAGGTTGG AGCTTCCTGGAGTTCTAGTGAGAAGTCGTGACCA 120

T.regenti CTCGCTA GTGACTTGCTACAGGTTGG AGTTTCGIG - AGTTCTAGTGAGAAGTCGTGACCA 119

T.ocellata GTGAGGTCCAATTAGAAGTCACGTGTGTGGATGGATGTCCCACC GACGACAATAGTTGGG 180

T.regenti GTGAGGTCCA - TTAGATTTACGTGTGTGGATGGATGTCCCACCGCCGCAATGGTTGGG 178

T.ocellata GTTCGCGCTAAAATCACGAATTGGTAGAAGTTAGAATTGAAGAGCCATTGAATCGGGTCCC  
240

T.regenti - TCGCGCTAAA - TCACGAATTGGTAGAAGTTAGAATTCACGAGCCATTGAA-CGGGTTC 235

T.ocellata AGTGGCTGAATGGTATACGAGCTTGCC TTGTAACCGGAAGGTCTGGGTTCGAATCCCAG 300

T.regenti AGTGGCTGAATGGTATACGAGCTTGCC TTGTAACCGGAAGG - CCTGGTTTCGAAACCCAG 294

T.ocellata TGGGTGCGTACTTCCGATGATTCCGAAACTAGGATGAAACAGCAGCTGTCCAGTACTCCC 360

T.regenti TGGGTGCGTACTGCGGATGATTCCGAAACTAG - ATGAAACAGCAGCTGTCCAGTACTCCC 353

T.ocellata TGGTTTTCAATGGTTCTCTAACTGATATCAGTCCGT 396

T.regenti TGGTTTTCAATGGTTCTCTAA-TGATATCAATCCGT 388

**Obrázok 2.** ToSau3A tandemovo repetitívna sekvencia podľa ktorej boli navrhnuté primery

### 3.7.4 PCR

Pred samotnou PCR bola namiešaná reakčná zmes v PCR boxe do celkového objemu 25 µl ako je popísané v tabuľke 8. Pred prácou bol PCR box vysvietený UV svetlom na 20 min. DNA bola pridávaná do zmesi mimo PCR box v inej miestnosti (kde sa nepracuje s našou DNA) pomocou sterilizovaných špičiek s filtrom, aby sa zabránilo kontaminácií vzoriek.

PCR reakcie prebiehali v thermocycleri C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) podľa protokolov v tabuľkách 8, 9, 10 a 11. V tabuľkách sú uvedené protokoly, kde s týmito anealingovými teplotami boli dosiahnuté najlepšie výsledky. Predtým bola pomocou gradientovej PCR testovaná optimálna teplota nasadenia primerov.

**Tabuľka 8.** Miešanie PCR reakcie

EmeraldAmp Max PCR Master Mix (TAKARA)	12,5 µl
Primer (cox1schist a ITS1 – 10mM; T-1323 a TR2 – 5mM)	0,5 µl
DNA	2 µl
dH <sub>2</sub> O	9,5 µl
Celkový objem	25 µl

**Tabuľka 9.** PCR protocol pre COX1schist primery

Krok/počet cyklov	Teplota (°C)	Čas trvania kroku (min)
1. / 1	94	8
2. / 30	94	0,3
	52	0,3
	68	2
3. / 3	68	7
4. / 1	4	∞

**Tabuľka 10.** PCR protocol pre ITS 1 primery

Krok/počet cyklov	Teplota (°C)	Čas trvania kroku (min)
1. / 1	95	5
2. / 35	95	0,3
	55	1
	72	1
3. / 3	72	10
4. / 1	4	∞

**Tabuľka 11.** PCR protocol pre T-1323 1, T-1323 2 primery

Krok/počet cyklov	Teplota (°C)	Čas trvania kroku (min)
1. / 1	95	4
2. / 36	95	1
	55	1
	72	1
3. / 3	72	10
4.	4	∞

**Tabuľka 12.** PCR protocol pre TR2 primer

Krok/počet cyklov	Teplota (°C)	Čas trvania kroku (min)
1. / 1	95	4
2. / 36	95	1
	63	1
	72	1
3. / 3	72	10
4.	4	∞

### 3.7.5 Gélová elektroforéza

Na výrobu 1,5 % gélu bolo použitých 100 ml 1x TAE roztoku (Invitrogen) s 1,5 g

agarózy (Invitrogen). Po PCR boli vzorky nanosené na gél spoločne s markerom HyperLadder™ 50bp (BIOLINE) alebo GeneRuler™ DNA Ladder Mix ready-to-use 50 µg (Thermo Scientific). Elektroforéza prebiehala pri 90 – 120 V. Z gélu boli pod UV vyrezané bandy požadovanej veľkosti.

### **3.7.6 Extrakcia z gélu**

Vyrezané vzorky z gélu boli extrahované komerčným kitom The Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research), pričom sa postupovalo podľa pokynov daným výrobcom. Po elúcií do  $d_4H_2O$  bola vzorkám meraná koncentrácia DNA na Nanodrope. Ďalej boli vzorky pripravené na sekvenáciu do sekvenačného laboratória (PřF UK). Vyizolované fragmenty menšie ako 200 bp boli ligované prostredníctvom komerčného kitu pGEM®-T Easy Vector System I (Progema) z dôvodu získania celej sekvencie.

### **3.7.7 Ligácia a transformácia buniek XL-1 Blue**

Ligačná reakcia bola pripravená podľa protokolu výrobcu do objemu 10 µl s 3 µl PCR produktu.

Z ligačnej zmesi bolo odobratých 5 µl a umiestnených do vymrazenej 1,5 ml mikroskúmavky. Do tohto objemu sa pridalo vymrazenými špičkami 50 µl buniek XL-Blue a inkubovali sa na ľade 30 min. Následne boli inkubované 45 s/ 42 °C a opäť vrátené na ľad. Hneď potom bolo pridaných 200 µl S.O.C. média predhriateho na 37 °C. Mikroskúmavky s médiom boli inkubované v trepačke 1,5 h/ 37 °C/ 225rpm a potom zcentrifugované. Následne bol vzniknutý pelet (50 – 70 µl ) rozotrený na Petriho misku s LB agarom, ktorá bola predom upravená. Na LB platni bolo rozotrené 50 µl 100 nM ampicilínu, 30 µl 100 mM IPTG (biela selekcia) a 40 µl X-GAL (modrá selekcia). Platne sa nechali cez noc v inkubátore pri 37 °C.

### **3.7.8 Kontrola transformácie buniek**

Kontrola transformácie buniek prebehla, aby sme zistili, či nami vybrané biele bunky

majú vo svojom plazmide vsadený náš inzert. Vypichnuté bunky boli vložené do 0,2 ml mikroskúmavky s 11,5 µl dH<sub>2</sub>O. V C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) bol vykonaný CRACK buniek podľa protokolu v tabuľke 12. Následne bolo do každej mikroskúmavky pridaných 0,5 µl primerov M13 a 12,5 µl EmeraldAmp Max PCR Master Mix (TAKARA).

Protokol PCR s M13 bol rovnaký až na zmenu v počte cyklov (30x) a anealingová teplota bola 55 °C. Po PCR bola DNA elektroforeticky separovaná a vybrané vzorky boli upravené podľa krokov v časti 3.7.6. a 3.7.9.

**Tabuľka 13.** CRACK buniek

Krok/ počet cyklov	Teplota (°C)	Čas trvania kroku (min)
1.1	96	5
	50	1,5
	96	1,5
	45	1
	96	1
	40	1
	4	2

### 3.7.9 Sekvenácia

Vzorky na sekvenovanie boli pripravené v 0,2 ml tenkostenných mikroskúmvkách do celkového objemu 8 µl reakčnej zmesi. Tá bola zložená z 0,3 µl primeru, 5 – 10 ng DNA na 100 bp a doplnená dH<sub>2</sub>O do potrebného objemu. Vzorky boli poslané do sekvenačného laboratória (PřF UK). Z každej zaslanej vzorky sme obdržali dve sekvencie (čítanú z 5 konca forward a 3 konca reverse), ktoré sa analyzovali pomocou programov Seqman DNASTAR<sup>®</sup> (Lasergene), Geneious<sup>®</sup> R7 a BioEdit sequence alignment editor.

## 4 Výsledky

### 4.1 ELISA

#### 4.1.1 IgM protilátková odpoveď proti antigénom *T. regenti* a *T. szidati*

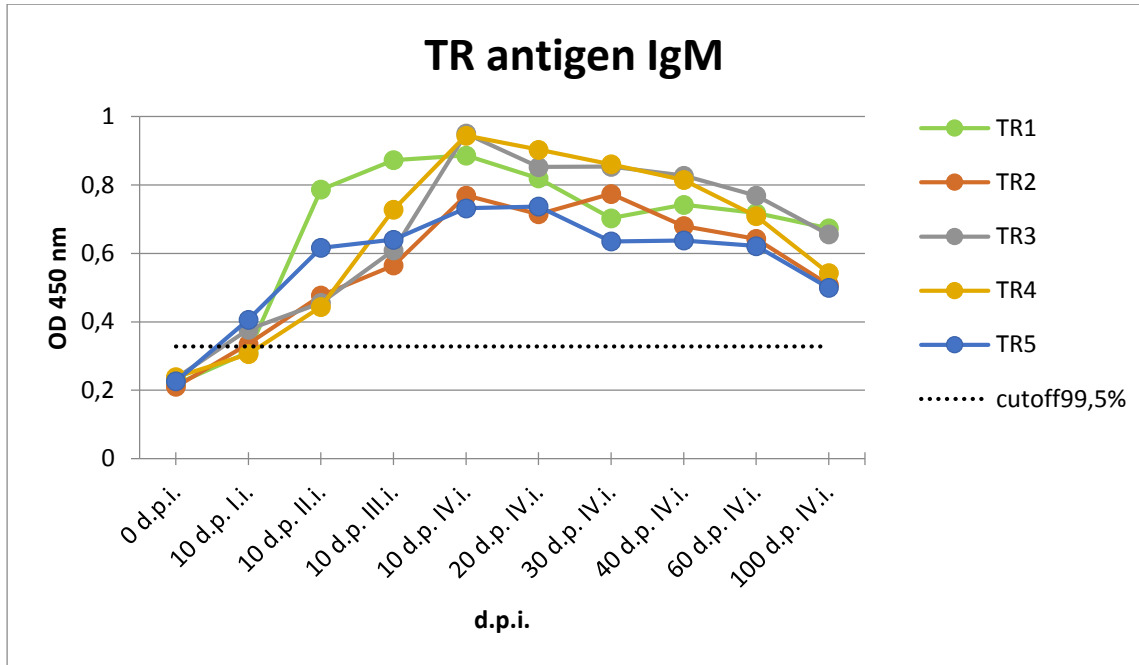
Pomocou ELISA boli testované séra myší experimentálne nakazených *T. regenti* a *T. szidati*. Zisťovala sa zmena hladiny protilátok voči antigénom TRhc (homogenát cercárií *T. regenti*) a TShc (homogenát cercárií *T. szidati*) v rôznych dňoch po infekcii (d.p.i.), hladina protilátok bola vyjadrená v grafoch pomocou OD<sub>450</sub>.

V grafe 1 môžeme pozorovať postupný nárast hladiny IgM protilátok v sére myší nakazených *T. regenti* už od 10. dňa po (d.p.) prvej infekcii až do 10. d.p. štvrtej reinfekcii, potom hladina IgM postupne klesá. Tento pokles hladiny IgM bol zaznamenaný u všetkých sér okrem TR2 a TR5, kde klesajúci trend je až od 20. – 30. d.p. štvrtej reinfekcii a TR1 kde je stúpajúci trend od 40. d.p. štvrtej reinfekcii. U reinfikovaných myší boli anti-TRhc IgM 100 d.p. štvrtej reinfekcii stále vyššie v porovnaní s neinfikovanými myšami a cutoff hodnotou.

Rovnaký priebeh nárastu hladiny IgM bol zaznamenaný aj u sér myší nakazených *T. szidati*, ktoré sú znázornené v grafe 2 Hladina anti-TShc IgM stúpala tiež od prvej infekcie a najvyššiu hodnotu OD dosiahla v 10. d.p. štvrtej reinfekcii. Výnimku tvorilo sérum TS2, ktoré má OD hodnotu 10 dní po druhej reinfekcii vyššiu než v 10. d.p. tretej reinfekcii. Postupné klesanie hladín IgM však nebol zaznamenaný ani u jedného séra.

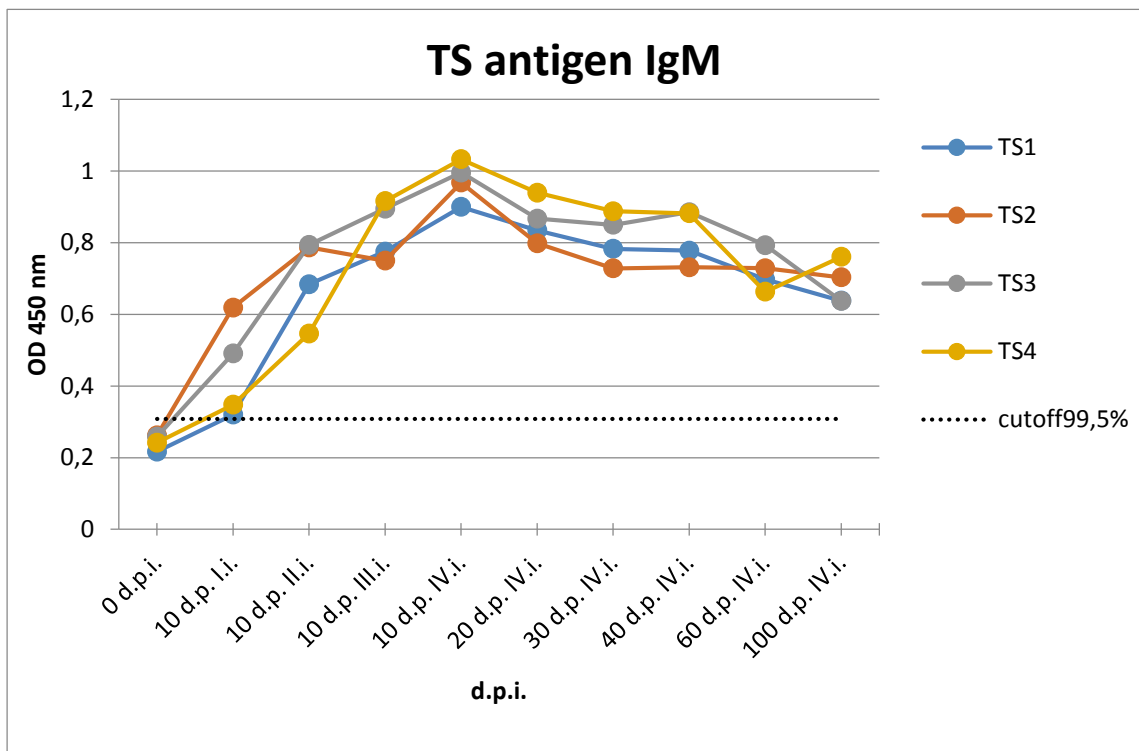
**Graf 1.** Závislosť hladiny anti-TRhc IgM od dní po infekcii.

(TR1 – TR5 – myši nakazené cercárkami *T. regenti*)



**Graf 2.** Závislosť hladiny anti-TShc IgM od dní po infekcii.

(TS1 – TS4 – myši nakazené cercárkami *T. szidati*)



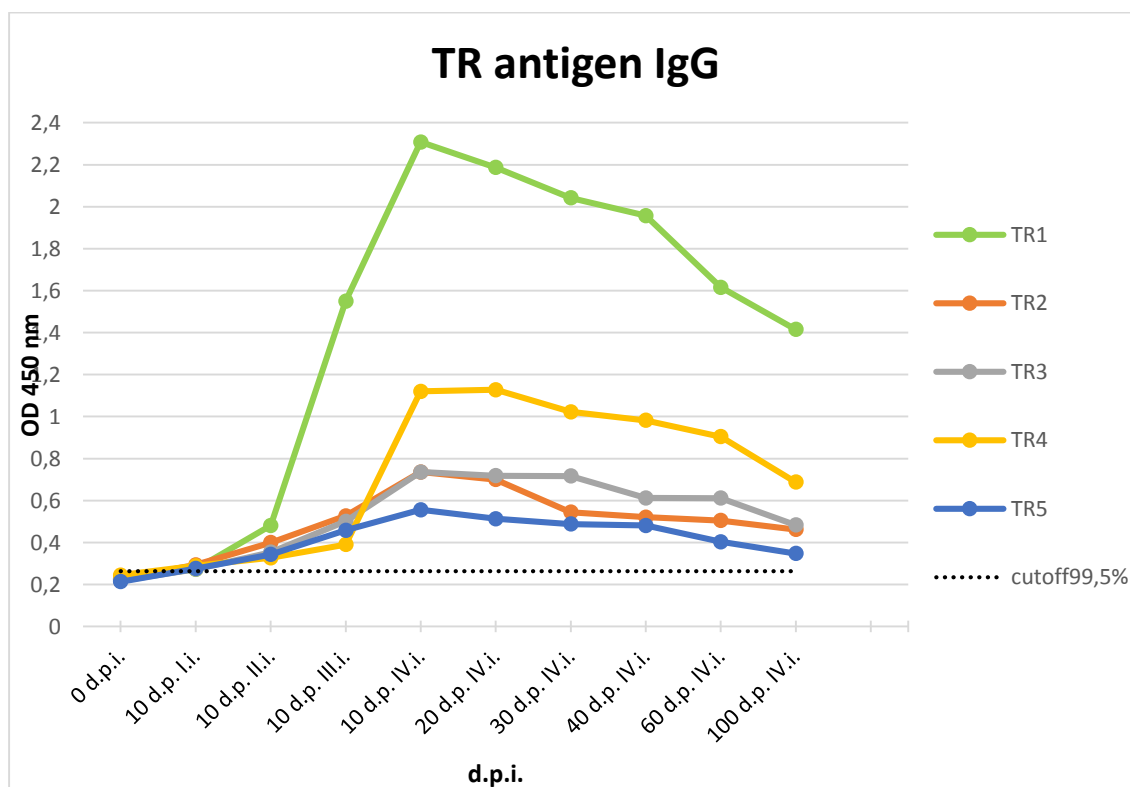
#### 4.1.2 IgG protilátková odpoveď proti antigénom *T. regenti* a *T. szidati*

Nárast hladiny IgG protilátok v sérach (TR1, TR2 a TR5) myši infikovaných *T. regenti*, môžeme sledovať v grafe 3 a to už od 10. d.p. druhej reinfekcii až do 10. d.p. štvrtej reinfekcii. V tomto bode (10. d.p. štvrtej reinfekcii) je hodnota OD najvyššia a pohybuje sa v rozmedzí 0,56 – 2,31, potom hladina protilátok IgG postupne klesá. Sérum TR4 malo hodnotu OD rovnakú v 10. aj 20. deň po štvrtej reinfekcii, a až potom bol evidovaný pokles hladiny IgG protilátok. Obdobná protilátková odpoveď bola aj u séra TR3, ale pokles hladiny anti TRhc IgG bol viditeľný až od 30. dňa po štvrtej reinfekcii.

Postupné zvyšovanie bolo zaznamenané aj u protilátok anti-TShc IgG zo sér myši infikovaných *T. szidati*, ktoré je vidieť v grafe 4 až do 10 d.p. štvrtej reinfekcie. Nameraná OD sa pohybuje v intervale od 0,77 – 1,38. Hladina IgG protilátok v sére TS4 dosiahla najvyššiu hodnotu OD až 30. d.p. štvrtej reinfekcii. Sérum TS3 malo OD hodnotu 10 dní po druhej reinfekcii rovnakú ako v 10. d.p. tretej reinfekcii. Hodnoty OD všetkých sér 100 d.p. štvrtej reinfekcii sú stále vyššie ako u sér neinfikovaných a nachádzajú sa nad hranicou cutoff.

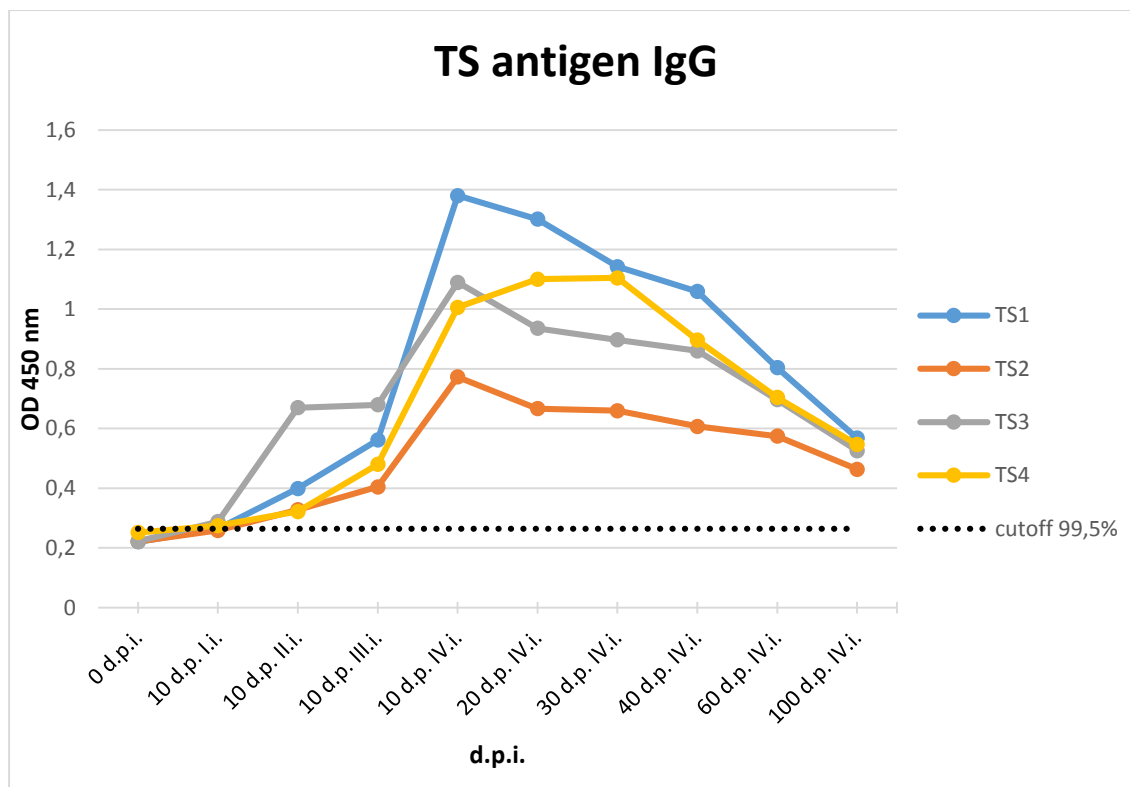
**Graf 3.** Závislosť hladiny anti-TRhc IgG od dní po infekcii.

(TR1 – TR5 – myši nakazené cercáriami *T. regenti*)



**Graf 4.** Závislosť hladiny anti-TShc IgG od dní po infekcii.

(TS1 – TS4 – myši nakazené cercáriami *T. szidati*)



#### 4.1.3 Protílátková odpoveď IgM a IgG v heterológnom sére proti antigénu *T. regenti* a *T. szidati*

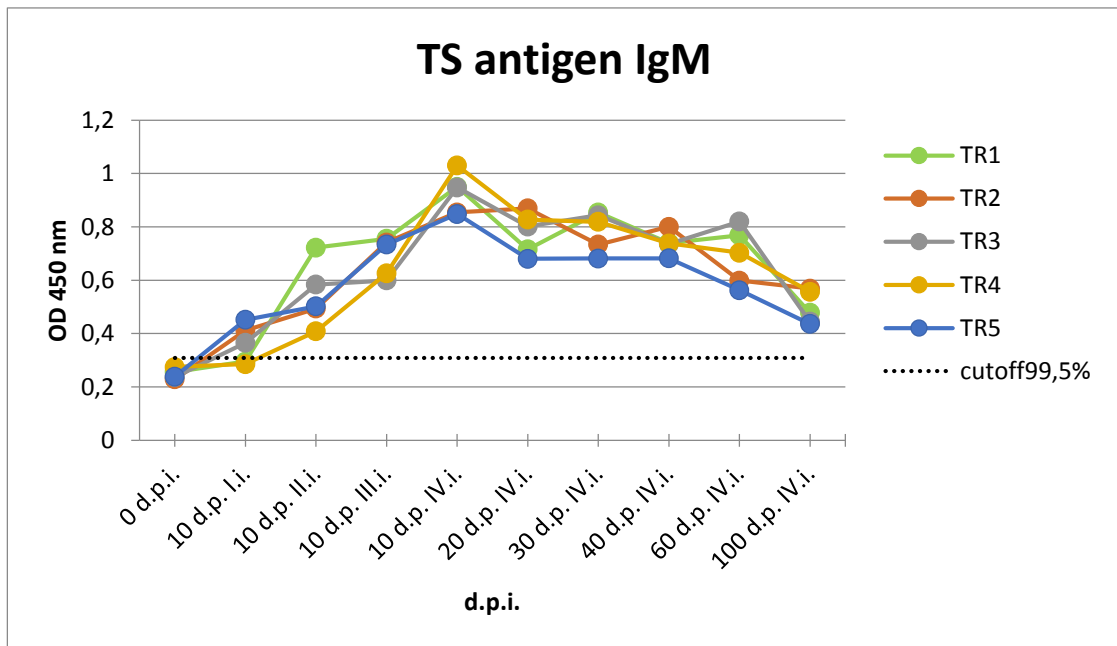
ELISA metódou sa tiež testovala skřížená reaktivita medzi *T. regenti* a *T. szidati*.

IgM protílátky zo sér myší infikovaných *T. regenti* reagujú skřížene s antigénom TShc a opačne. Nárast IgM protílátkovej odpovede (graf 5 a 6) je viditeľný už od začiatku prvej infekcie až do 10 d.p. druhej reinfekcie okrem séra TR4, potom je hladina IgM protílátok u každého heterológneho séra odlišná, ale stále nad hladinou cutoff. V grafe 7 bol pozorovaný postupný nárast anti-TShc IgG od 10. d.p. tretej reinfekcii po 60. d.p. štvrtej reinfekcie s najvyššou hodnotou OD 1,17 – 1,93. U sér TR1 a TR5 bol priebeh IgG odpovede od 20. d.p. štvrtej reinfekcie po 60. d.p. štvrtej reinfekcie nemenný. Následne je zaznamenané zníženie anti TShc IgG.

V grafe 8 bola pozorovaná protilátková odpoveď IgG z heterológnych sér myši infikovaných *T. szidati* na TRhc antigén. Najvyššia nameraná hodnota OD sa pohybuje v rozmedzí 0,47 – 0,56.

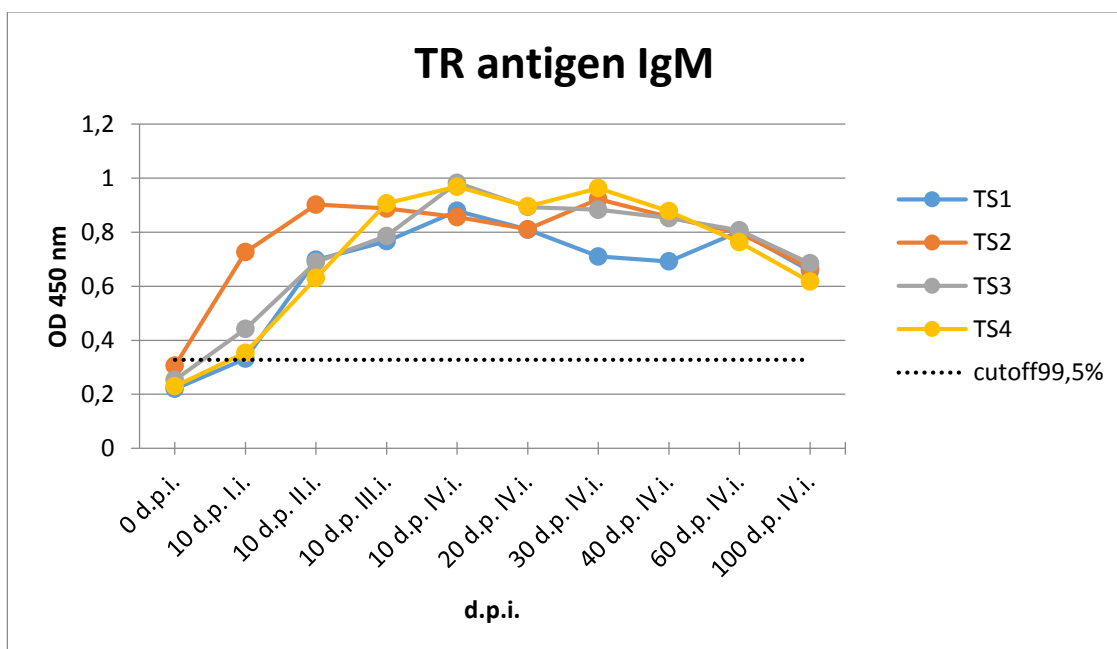
**Graf 5.** Závislosť hladiny anti TShc IgM od dní po infekcii.

(TR1 – TR5 – myši nakazené cercáriami *T. regenti*)



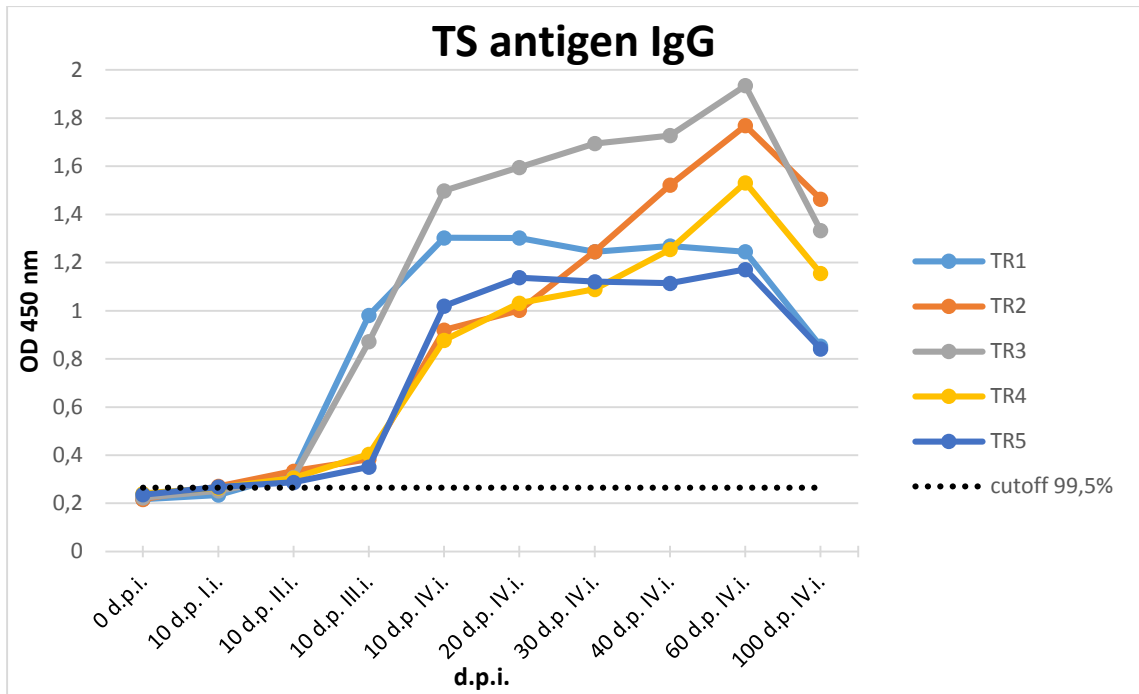
**Graf 6.** Závislosť hladiny anti TRhc IgM od dní po infekcii.

(TS1 – TS4 – myši nakazené cercáriami *T. szidati*)



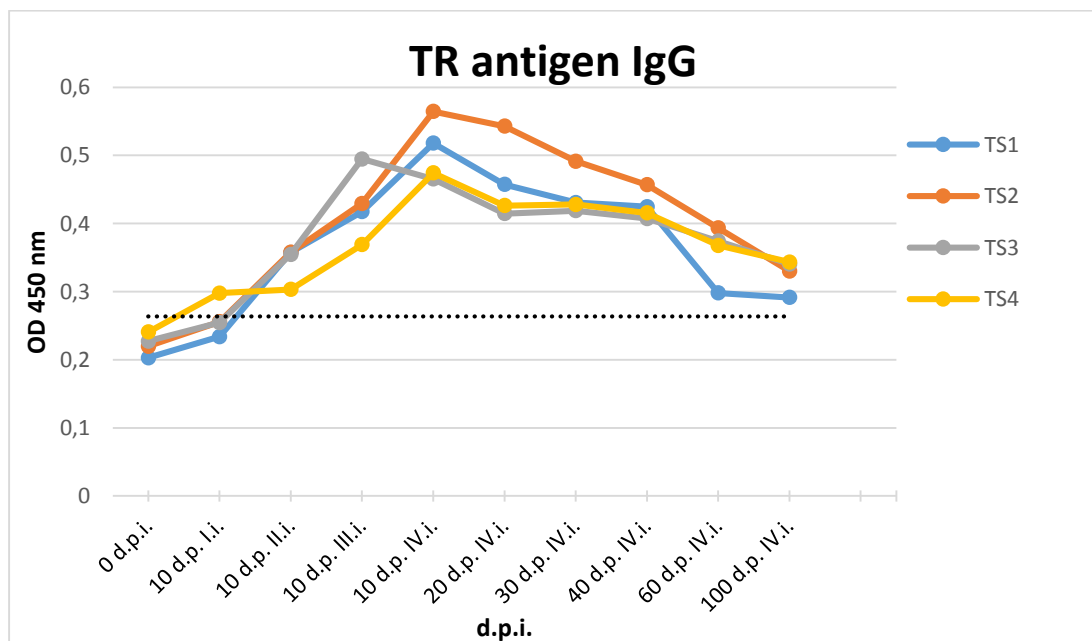
**Graf 7.** Závislosť hladiny anti TShc IgG od dní po infekcii.

(TS1 – TS4 – myši nakazené cercáriami *T. szidati*)



**Graf 8.** Závislosť hladiny anti TRhc IgG od dní po infekcii.

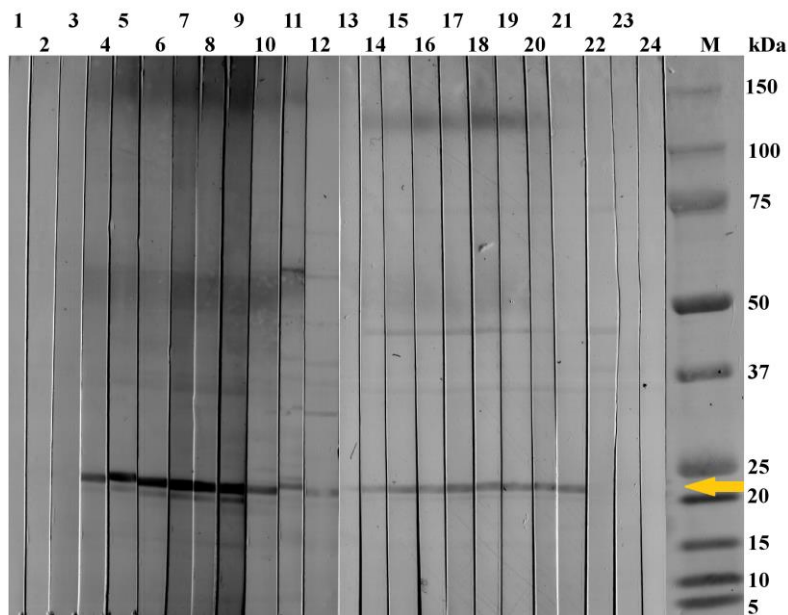
(TR1 – TR5 – myši nakazené cercáriami *T. regenti*)



## 4.2 Western blot

### 4.2.1 Antigény *T. regenti* a *T. szidati* rozpoznávané protilátkami IgM z homológnych sér

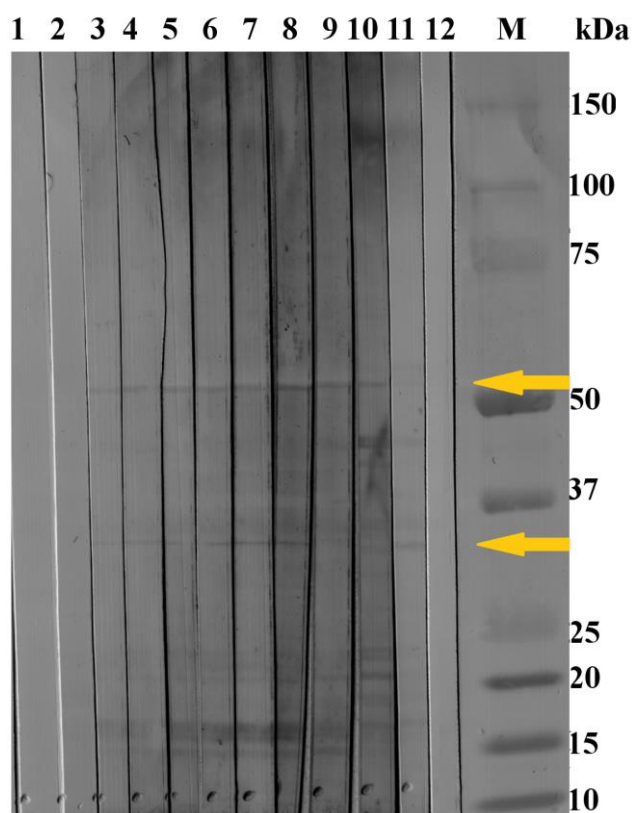
Protilátky IgM zo séra myší infikovaných *T. regenti* rozpoznávali antigény z TRhc v oblasti 21 kDa a 22 kDa od 10. dňa po prvej infekcii až po 100. d.p. štvrtej reinfekcie. U niektorých sér bola zaznamenaná nešpecifická reakcia protilátok anti-TRhc IgM v oblasti 35 kDa a 48 kDa, ktorá bola zaznamenaná aj u negatívnych sér (vid' obrázok 3). U myší nakazených *T. szidati* sa IgM protilátky viazali na antigén TShc v oblasti 15, 17 21 a 52 kDa od 20. dňa po prvej infekcii. Protilátky IgM sa na antigén 32 kDa viazali od 10. dňa po prvej infekcii (vid' obrázok 4).



**Obrázok 3.** Immunoblot so sérami myší (TR4, TR5) nakazených *T. regenti* s antigénom TRhc. IgM protilátky špecificky rozpoznávali antigény v oblasti 21 a 22 kDa v rôznych dňoch po infekcii (d.p.i.).

(M – markery; 1 – negatívna kontrola “BLANK”; 2 a 24 – kontrola sekundárnej protilátky IgM na väzbu s TRhc; 3 – negatívne sérum 1; 4 – sérum TR4 100 d.p. IV. reinfekcii; 5 - TR4 60 d.p. IV. reinfekcii; 6 - TR4 40 d.p. IV. reinfekcii; 7 - TR4 30 d.p. IV. reinfekcii; 8 - TR4 20 d.p. IV. reinfekcii; 9 - TR4 10 d.p. IV. reinfekcii; 10 - TR4 10 d.p. III. reinfekcii; 11 - TR4 10 d.p. II. reinfekcii; 12 - TR4 10 d.p. I. infekcii; 13 - serum TR5 100 d.p. IV. reinfekcii; 14 - TR5 60 d.p. IV. reinfekcii; 15 - TR5 40 d.p. IV. reinfekcii; 16 - TR5 30 d.p. IV.

reinfekcii; **17** - TR5 20 d.p. IV. reinfekcii; **18** - TR5 10 d.p. IV. reinfekcii; **19** - TR5 10 d.p. III. reinfekcii; **20** - TR5 10 d.p. II. reinfekcii; **21** - TR5 10 d.p. I. infekcii; **22** - negatívne sérum 2; **23** - negatívne sérum 3)



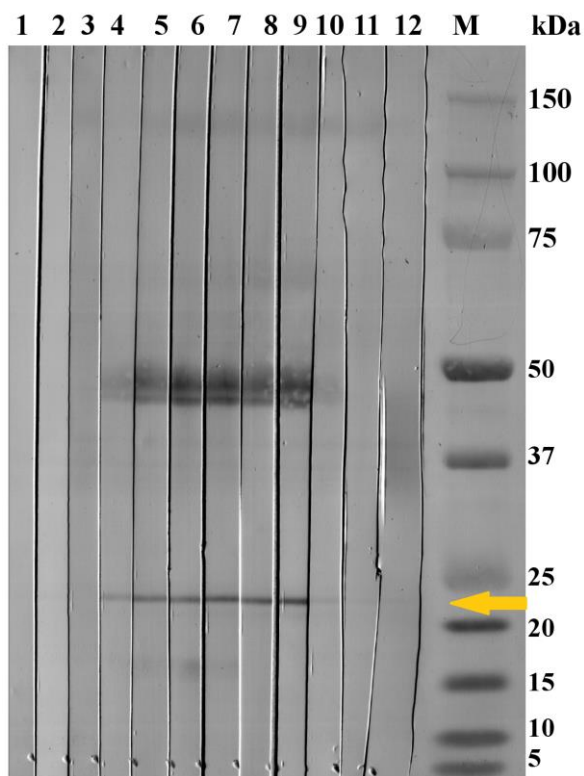
**Obrázok 4.** Imunoblot so sérom myši (TS3) nakazenej *T. szidati* s antigénom TShc. IgM protilátky špecificky rozpoznávali antigény v oblasti 32 a 52 kDa v rôznych dňoch po infekcii (d.p.i.);

(M – markery; **1** – kontrola sekundárnej protilátky IgM na väzbu s TShc; **2** – negatívne sérum 1; **3** – sérum TS3 100 d.p. IV. reinfekcii; **4** - TS3 60 d.p. IV. reinfekcii; **5** - TS3 40 d.p. IV. reinfekcii; **6** - TS3 30 d.p. IV. reinfekcii; **7** - TS3 20 d.p. IV. reinfekcii; **8** - TS3 10 d.p. IV. reinfekcii; **9** - TS3 10 d.p. III. reinfekcii; **10** - TS3 10 d.p. II. reinfekcii; **11** - TS3 10 d.p. I. infekcii; **12** – negatívna kontrola "BLANK")

#### 4.2.2 Antigény *T. regenti* a *T. szidati* rozpoznávané protilátkami IgG z homológnych sér

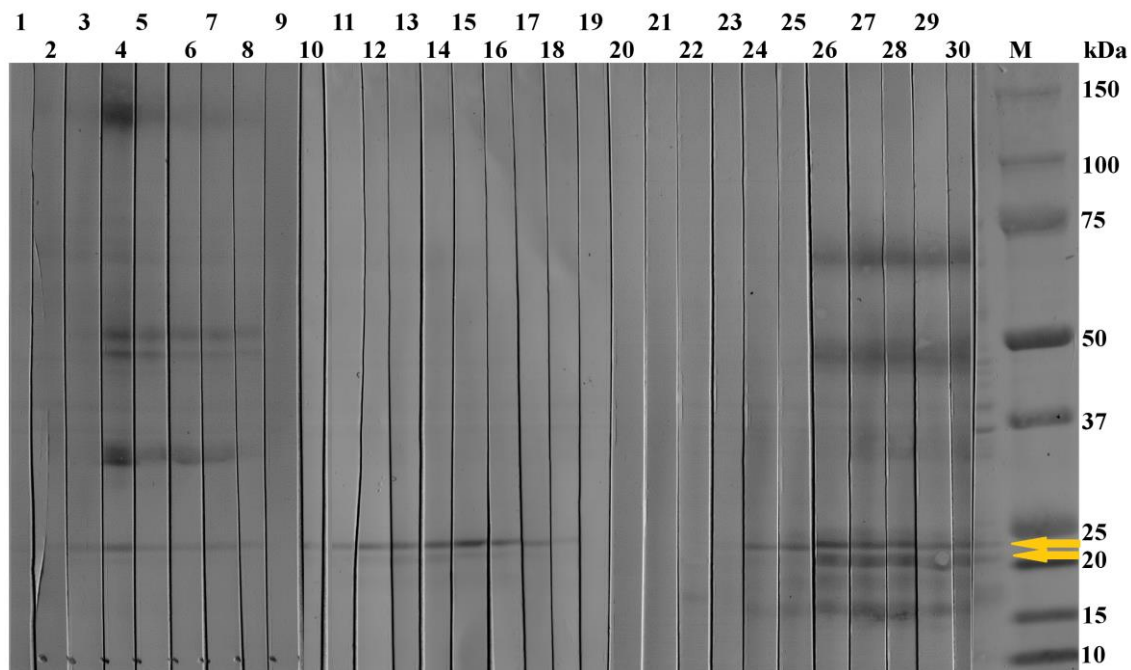
Testované anti-TRhc IgG protilátky u všetkých sér rozpoznávali antigény 21 a 22 kDa prevažne 10 dní po druhej reinfekcii. U niektorých sér boli tiež zaznamenané reakcie v oblastiach 17, 32, 46, 49 a 65 kDa. Táto reakcia je znázornená na obrázkoch 5 a 6.

Anti-TShc IgG protilátky sa viazali u všetkých sér na antigén 26 kDa od 10. dňa po druhej infekcii (vid' Obrázok 7). Ďalšie rozpoznávané antigény boli 21, 35, 38, 56 a 90 kDa, ktoré sa vyskytovali len ojedinele u niektorých sér.



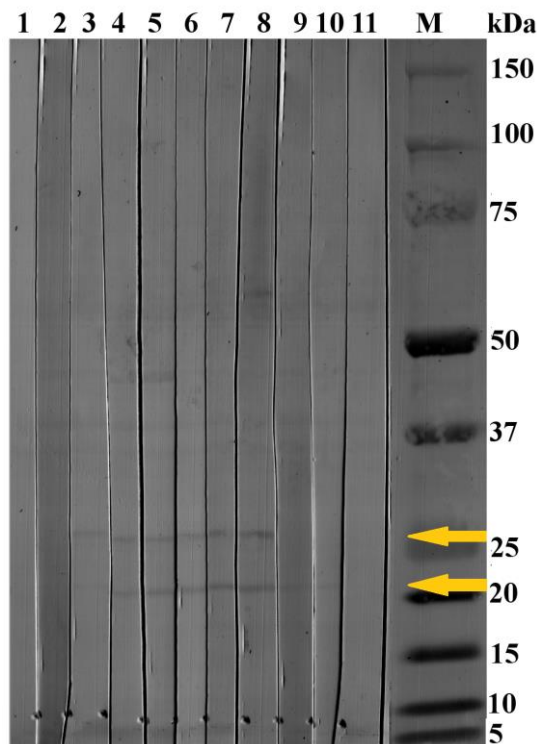
**Obrázok 5.** Imunoblot so sérom myši (TR4) nakazenej *T. regenti* s antigénom TRhc. IgG protilátky špecificky rozpoznávali antigény v oblasti 21 a 22 kDa v rôznych dňoch po infekcii (d.p.i.);

(M – markery; **1** – negatívna kontrola “BLANK”; **2** – kontrola sekundárnej protilátky IgG na väzbu s TRhc; **3** – negatívne sérum; **4** – sérum TR4 100 d.p. IV. reinfekcii; **5** - TR4 60 d.p. IV. reinfekcii; **6** - TR4 40 d.p. IV. reinfekcii; **7** - TR4 30 d.p. IV. reinfekcii; **8** - TR4 20 d.p. IV. reinfekcii; **9** - TR4 10 d.p. IV. reinfekcii; **10** - TR4 10 d.p. III. reinfekcii; **11** - TR4 10 d.p. II. reinfekcii; **12** - TR4 10 d.p. I. infekcii)



**Obrázok 6.** Imunoblot so sérami myší (TR1, TR3 a TR5) nakazených *T. regenti* s antigénom TRhc. IgG protilátky špecificky rozpoznávali antigény v oblasti 21 a 22 kDa v rôznych dňoch po infekcii (d.p.i.);

(M – markery; **1** – TR1 10 d.p. I. infekcii; **2** – TR1 10 d.p. II. reinfekcii; **3** – TR1 10 d.p. III. reinfekcii; **4** – TR1 10 d.p. IV. reinfekcii; **5** – TR1 20 d.p. IV. reinfekcii; **6** – TR1 30 d.p. IV. reinfekcii; **7** – TR1 40 d.p. IV. reinfekcii; **8** – TR1 60 d.p. IV. reinfekcii; **9** – negatívne sérum 4; **10** – TR5 100 d.p. IV. reinfekcii; **11** – TR5 60 d.p. IV. reinfekcii; **12** – TR5 40 d.p. IV. reinfekcii; **13** - TR5 30 d.p. IV. reinfekcii; **14** - TR5 20 d.p. IV. reinfekcii; **15** - TR5 10 d.p. IV. reinfekcii; **16** - TR5 10 d.p. III. reinfekcii; **17** - TR5 10 d.p. II. reinfekcii; **18** - TR5 10 d.p. I. infekcii; **19** – negatívne sérum 5; **20** – negatívna kontrola “BLANK”; **21** – kontrola sekundárnej protilátky IgG na väzbu s TRhc; **22** - negatívne sérum 4; **23** – TR3 10 d.p. I. infekcii; **24** – TR3 10 d.p. II. reinfekcii; **25** – TR3 10 d.p. III. reinfekcii; **26** – TR3 10 d.p. IV. reinfekcii; **27** – TR3 20 d.p. IV. reinfekcii; **28** – TR3 30 d.p. IV. reinfekcii; **29** – TR3 40 d.p. IV. reinfekcii; **30** – TR3 60 d.p. IV. Reinfekcii)



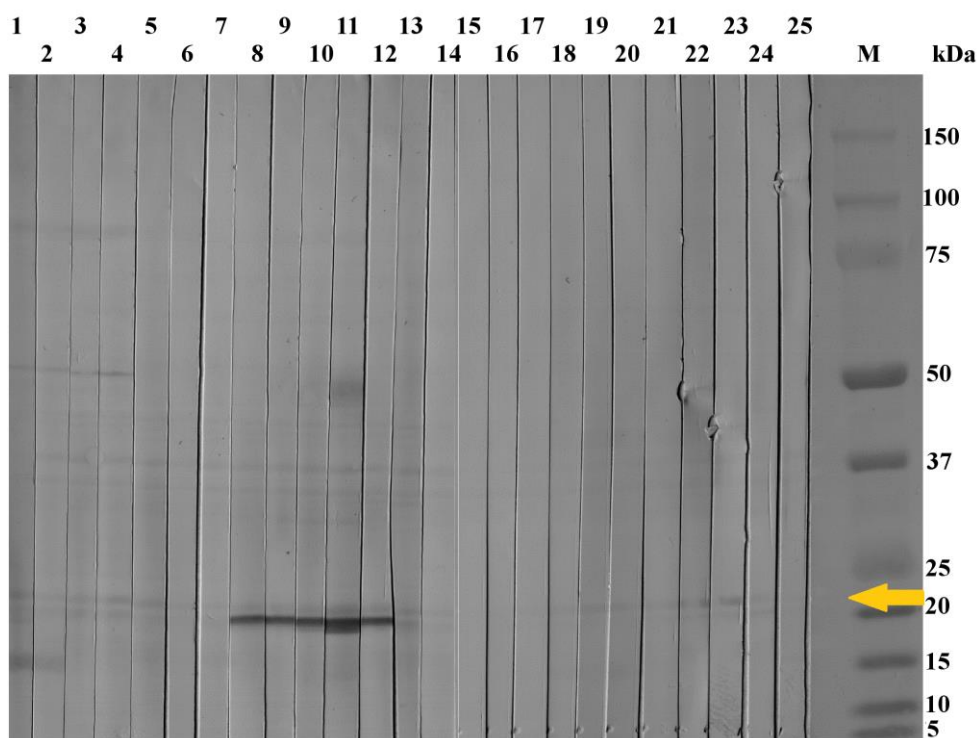
**Obrázok 7.** Imunoblot so sérom myši (TS4) nakazenej *T. szidati* s antigénom TShc. IgG protilátky špecificky rozpoznávali antigény v oblasti 26 kDa v rôznych dňoch po infekcii (d.p.i.)

(M – markery; **1** – negatívne sérum; **2** – kontrola sekundárnej protilátky IgG na väzbu s TShc; **3** – sérum TS4 100 d.p. IV. reinfekcii; **4** – TS4 60 d.p. IV. reinfekcii; **5** – TS4 40 d.p. IV. reinfekcii; **6** – TS4 30 d.p. IV. reinfekcii; **7** – TS4 20 d.p. IV. reinfekcii; **8** – TS4 10 d.p. IV. reinfekcii; **9** – TS4 10 d.p. III. reinfekcii; **10** – TS4 10 d.p. II. reinfekcii; **11** – TS4 10 d.p. I. infekcii)

#### 4.2.3 Antigény *T. regenti*, *T. szidati* a *S. mansoni* rozpoznávané protilátkami IgG z heterológnych sér

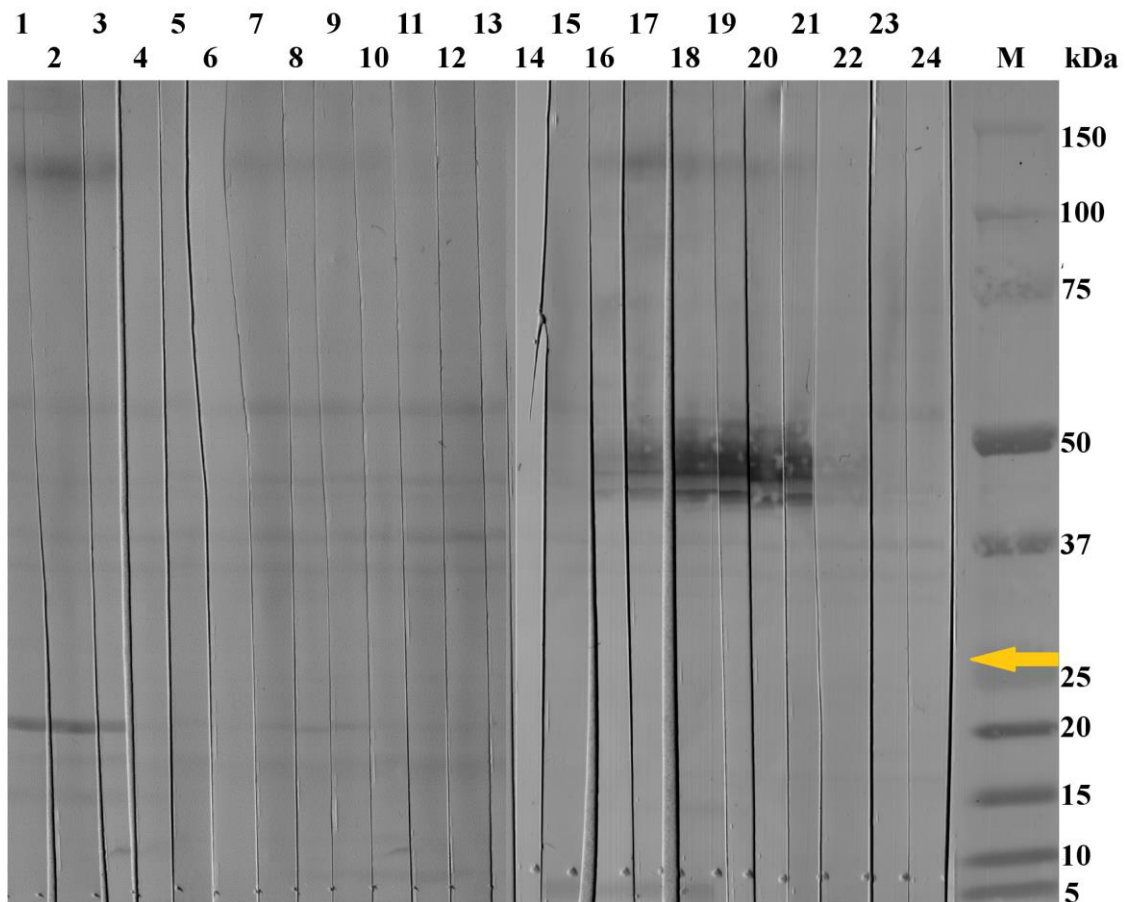
Na základe zistených skrížených reakcií v ELISA sme sa rozhodli detegovať konkrétne skrížene reagujúce antigény. Testovali sme väzbu IgG na antigény TRhc, TShc a SMhc. Protilátky IgG zo sér myši nakazených *T. szidati* rozpoznávali antigény TRhc v oblastiach 21 kDa a 22 kDa (viď Obrázok 8). Jedná sa o skríženú reakciu, lebo rovnaká reakcia s antigénmi bola zaznamenaná aj u sér myši infikovaných *T. regenti*. U niektorých infikovaných myši bola zaznamenaná reakcia v oblastiach 35, 37 a 50 kDa.

Ďalším testovaným antigénom bol TShc. Len niektoré séra myší nakazených *T. regenti* rozpoznávali antigény 21, 35, 37 a 46 kDa. Žiadna reakcia nebola zaznamenaná v oblasti 26 kDa ako je vidieť na obrázku 9. To značí o tom, že IgG protilátky v sére myší infikovaných *T. regenti* sa skrížené neviazali na antigén TShc. Taktiež bola testovaná skrížená reaktivita sér myší nakazených *T. regenti* a *T. szidati* s antigénom SMhc. Výsledkom bola skrížená reakcia, pretože protilátky IgG z heterológnych a homológnych testovaných sér rozpoznávali antigén 28 kDa. Táto reakcia je znázornená na obrázku 10.



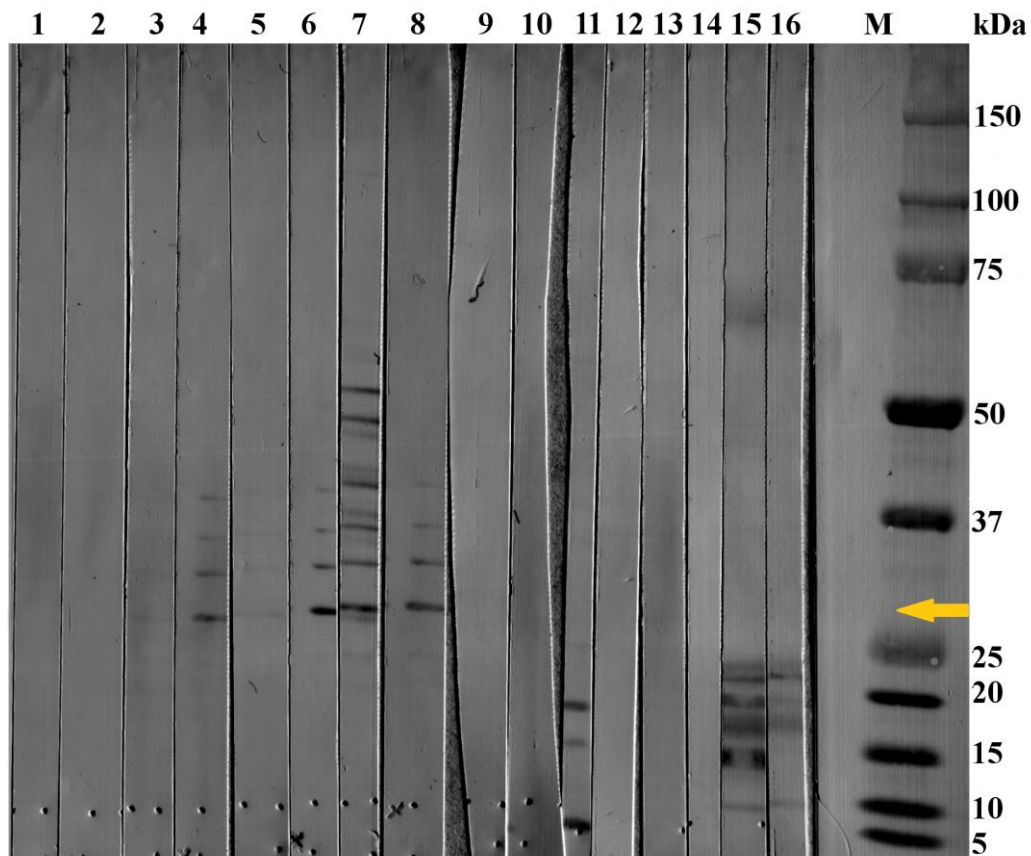
**Obrázok 8.** Imunoblot so sérami myší (TS1, TS2 a TS3) nakazených *T. szidati* s antigénom TRhc. IgG protilátky rozpoznávali antigény v oblasti 21 a 22 kDa v rôznych dňoch po infekcii (d.p.i.);

(M – markery; **1** – TS2 40 d.p. IV. reinfekcii; **2** – TS2 30 d.p. IV. reinfekcii; **3** – TS2 20 d.p. IV. reinfekcii; **4** – TS2 10 d.p. IV. reinfekcii; **5** – TS2 10 d.p. III. reinfekcii; **6** – TS2 10 d.p. II. reinfekcii; **7** – TS2 10 d.p. I. infekcii; **8** – TS1 40 d.p. IV. reinfekcii; **9** – TS1 30 d.p. IV. reinfekcii; **10** – TS1 20 d.p. IV. reinfekcii; **11** – TS1 10 d.p. IV. reinfekcii; **12** – TS1 10 d.p. III. reinfekcii; **13** – TS1 10 d.p. II. reinfekcii; **14** – TS4 10 d.p. I. infekcii; **15** – kontrola sekundárnej protilátky IgG na väzbu s TShc; **16** – negatívne sérum 2; **17** – TS3 100 d.p. IV. reinfekcii; **18** – TS3 60 d.p. IV. reinfekcii; **19** – TS3 40 d.p. IV. reinfekcii; **20** – TS3 30 d.p. IV. reinfekcii; **21** – TS3 20 d.p. IV. reinfekcii; **22** – TS3 10 d.p. IV. reinfekcii; **23** – TS3 10 d.p. III. reinfekcii; **24** – TS3 10 d.p. II. reinfekcii; **25** – TS3 10 d.p. I. infekcii)



**Obrázok 9.** Imunoblot so sérami myší (TR3, TR4 a TR5) nakazeného *T. regenti* s antigénom TShc. IgG protilátky nerozpoznávali antigény v oblasti 26 kDa v rôznych dňoch po infekcii (d.p.i.);

(M – markery; **1** – TR3 30 d.p. IV. reinfekcii; **2** – TR3 20 d.p. IV. reinfekcii; **3** – TR3 10 d.p. IV. reinfekcii; **4** – TR3 10 d.p. III. reinfekcii; **5** – TR3 10 d.p. II. reinfekcii; **6** – TR3 10 d.p. I. infekcii; **7** – TR5 40 d.p. IV. reinfekcii; **8** – TR5 30 d.p. IV. reinfekcii; **9** – TR5 20 d.p. IV. reinfekcii; **10** – TR5 10 d.p. IV. reinfekcii; **11** – TR5 10 d.p. III. reinfekcii; **12** – TR5 10 d.p. II. reinfekcii; **13** – TR5 10 d.p. I. infekcii; **14** – kontrola sekundárnej protilátky IgG na väzbu s TShc; **15** – negatívne sérum; **16** – sérum TR4 100 d.p. IV. reinfekcii; **17** – TR4 60 d.p. IV. reinfekcii; **18** – TR4 40 d.p. IV. reinfekcii; **19** – TR4 30 d.p. IV. reinfekcii; **20** – TR4 20 d.p. IV. reinfekcii; **21** – TR4 10 d.p. IV. reinfekcii; **22** – TR4 10 d.p. III. reinfekcii; **23** – TR4 10 d.p. II. reinfekcii; **24** – TR4 10 d.p. I. infekcii)

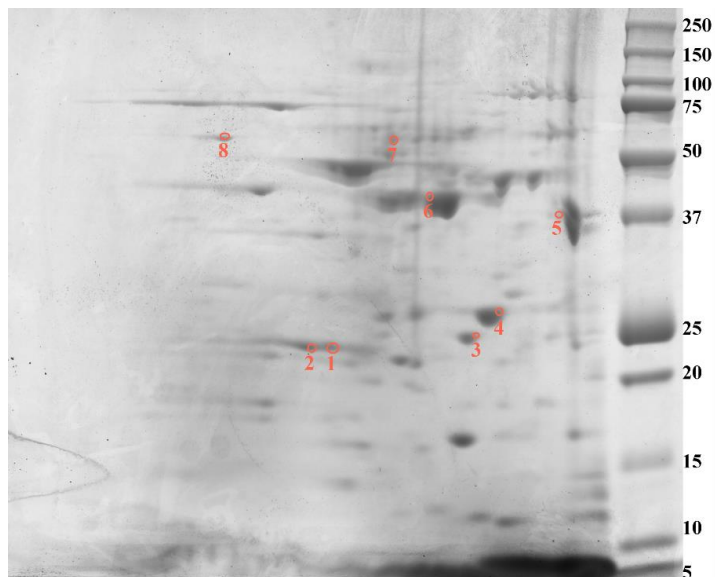


**Obrázok 10.** Imunoblot s heterológnymi a homológnymi sérami myši s antigénom SMhc. IgG protilátky rozpoznávali antigény v oblasti 28 kDa v rôznych dňoch po infekcii (d.p.i.); (M – markery; **1** – negatívne sérum; **2** – sérum SM<sub>m3</sub> 40 d.p.i.; **3** – SM<sub>m2</sub> 40 d.p.i.; **4** – TR3 30 d.p. IV. reinfekcii; **5** – TR5 30 d.p. IV. reinfekcii; **6** – TR1 30 d.p. IV. reinfekcii; **7** – TR4 10 d.p. II. reinfekcii; **8** – TS3 20 d.p. IV. reinfekcii; **9** – TS2 30 d.p. IV. reinfekcii; **10** – TS4 20 d.p. IV. reinfekcii; **11** – TS4 20 d.p. IV. reinfekcii; **12** – kontrola sekundárnej protilátky IgG na väzbu s TShc; **13** – negatívne sérum; **14** – kontrola sekundárnej protilátky IgG na väzbu s TRhc; **15** – TR3 30 d.p. IV. reinfekcii; **16** – TR5 30 d.p. IV. Reinfekcii)

### 4.3 Identifikácia rozpoznávaných antigénov z 2D blotu pomocou hmotnostnej spektrometrie

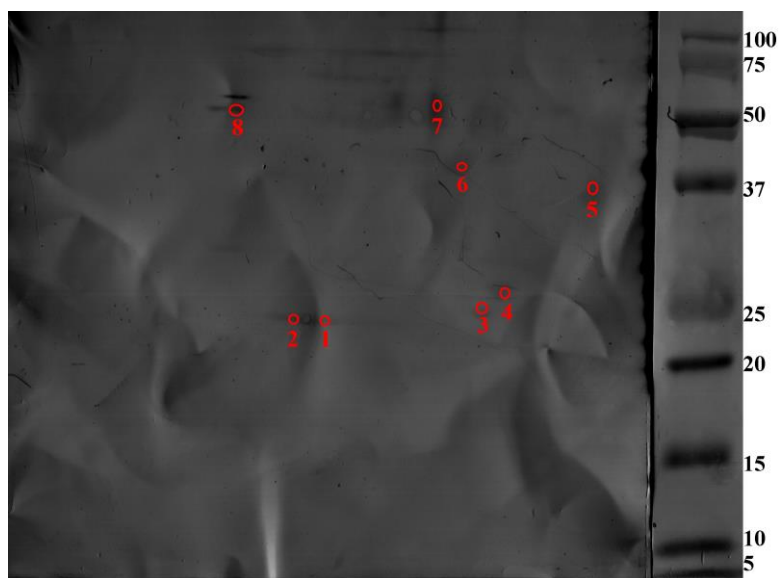
Pomocou 2D elektroforézy bol homogenát cercárií rozdelený najskôr podľa pI a potom podľa molekulovej veľkosti. Po prekrytí imunoblotu s gélom v programe GIMP boli zhodné spoty z gelu vyrezané a zaslané na analýzu do Laboratória hmotnostnej spektrometrie (PřF UK). Spoty zaslané na analýzu sú vyznačené na obrázkoch 11 a 12. V Laboratóriu hmotnostnej spektrometrie bola spravená analýza sekvencií získaných zo spotov voči transkriptómu *T. regenti*. Následne tieto získané sekvencie boli nami porovnané tiež s

databázou NCBI (BLASTp). V tabuľkách 14 a 15 sú uvedené všetky proteíny, ktoré sa nám podarilo pomocou protilátok IgG identifikovať z TRhc a TShc. V niektorých spotoch bolo nájdených viac proteínov.



**Obrázok 11.** Gél 2D elektroforézy (homogenát cercárií TRhc) s vyznačenými spotmi poslanými na hmotnostnú spektrometriu.

(1 – 8 označenie jednotlivých spotov)



**Obrázok 12.** Imunoblot z 2D elektroforézy s vyznačenými spotmi zhodujúcimi sa s gélom z 2D.

**Tabuľka 1.** Proteíny rozpoznávané IgG protilátkami z TRhc a ich identifikácia pomocou hmotnostnej spektrofotometrie.

(*S. mansoni* (SM), *S. haematobium* (SH), *S. japonicum* (SJ). Percentuálna zhoda sekvencie proteínu voči transkriptomu a voči databáze BLASTp.)

Názov spotu	Naša molekulová veľkosť (kDA)	% zhoda s transkriptomom <i>T. regenti</i>	Identifikovaný proteín	% zhoda v BLASTp
1	22	30%	Septín 7	71% SM
2	22	55%	DNAJC7	84 - 87 % SM, SH
3	25	40%	Hypotetický proteín	50 - 59 % SM, SH
4	26	26%	EIF3	83 - 84 % SM, SJ
4	26	82%	trojoso fosfát isomeráza	80 - 86 % SM, SJ
5	36	63%	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza	86 - 88 % SM, SJ
5	36	80%	malát dehydrogenáza	83 - 86 % SM, SJ
5	36	65%	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza	89 - 90 % SM, SJ, SH
6	38	72%	fruktóza-1,6-bisfosfátu aldolázy	90 - 92 % SM, SJ, SH
6	38	80%	fruktóza-1,6-bisfosfátu aldolázy	89 - 90 % SM, SJ, SH
6	38	74%	fruktóza-1,6-bisfosfátu aldolázy	92 - 93 % SM, SJ, SH
6	38	58%	aldoláza	91 % SJ

7	60	39%	aldoláza	91 - 92 % SM, SJ
7	60	32%	disulfid	68 - 69 % SM, SJ
			isomeráza	
7	60	43%	aldoláza	89 - 91 % SM, SJ
7	60	47%	leucín aminopeptidáza cytosol aminopeptidáza	83 % SJ 83% SJ, SM
			leucín aminopeptidáza cytosol aminopeptidáza	83 % SJ 83 % SJ, SM
8	60	37%	disulfid isomeráza	71 - 72 % SM, SJ
8	60	52%	disulfid isomeráza	74 - 75 % SM, SJ

**Tabuľka 25.** Proteíny rozpoznávané IgG protilátkami z TShc a ich identifikácia pomocou hmotnostnej spektrofotometrie.

(*S. mansoni* (SM), *S. haematobium* (SH), *S. japonicum* (SJ). Percentuálna zhoda sekvencie proteínu voči transkriptomu a voči databáze BLASTp.)

Názov spotu	Molekulová hmotnosť	% zhoda s transkriptomom <i>T. regenti</i>	Identifikovaný proteín	% zhoda v BLASTp
2	60	40%	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza	86 - 88 % SM, SJ
2	60	56%	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza	89 - 90 % SM, SJ
3	22	21%	synaptotagmín	67 - 75 % SM, SH
3	22	44%	protein C14orf153	46 % SM
4	22	16%	Endoribonucleáza	64 % SM, SH

4	22	36%	Antigén Sm21.7	77 % SJ
4	22	60%	Antigén Sm21.7	77 % SJ
4	22	36%	Peroxiredoxín	85 - 86 % SM, SJ
5	26	43%	trojoso fosfát isomeráza	81 - 86 % SM, SJ, SH
5	26	24%	glutamín	73 % SJ, SH
5	26	36%	DNA topoizomeráza typ I	92 % SM
6	26	36%	PSMB2	93 % SM
7	27	54%	fosfoglycerátmutáza	94 % SM
7	27	49%	trojoso fosfát isomeráza	82 - 86 % SM, SH, SJ
7	27	26%	Glutamín 2	73 % SJ
8	27	18%	Metionín,tyrozin fosfatáza	66 - 69 % SM, SH 64 % SJ
8	27	42%	Troponín T	85 – 86 % SJ, SM, SH
8	27	14%	Hypothetický proteín Smp_132520	62 % SM

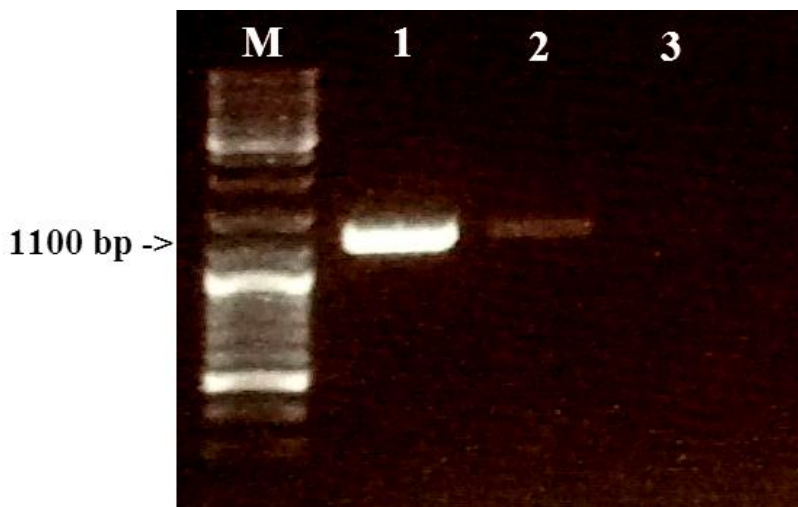
#### 4.4 Molekulárna diagnostika

Metódou PCR, nested PCR a semi-nested PCR bola amplifikovaná parazitárna DNA a to s použitím primerov COX1schist, ITS1 a s primermi pre tandemovo repetitívne sekvencie.

##### 4.4.1 PCR

###### Primery COX1schist

Primermi pre gén COX1schist sme testovali amplifikáciu parazitárnej DNA. Najskôr sme otestovali senzitivitu PCR reakcie, ktorá je znázornená na obrázku 13. Najnižší limit detekcie bol 10 pg parazitárnej DNA. S týmito primermi sa nám vždy podarilo amplifikovať parazitárnu DNA z cercárií, ale nie zo séra alebo mozgomiešneho moku. Preto sme ďalej s týmito primermi nepokračovali.



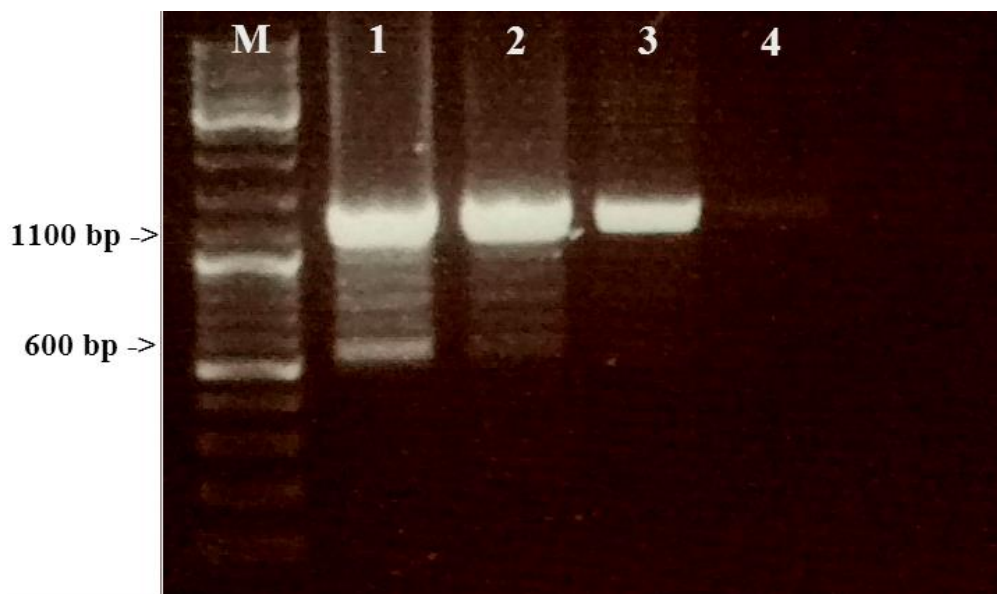
**Obrázok 13.** Senzitivita PCR s primermi COX1schist.

(M – marker, 1- 10 ng DNA z cercárií *T. regenti*; 2 – 100pg DNA z cercárií *T. regenti*; 3 – 10 pg DNA z cercárií *T. regenti*. Amplikon veľký 1100 bp)

### Primery ITS1

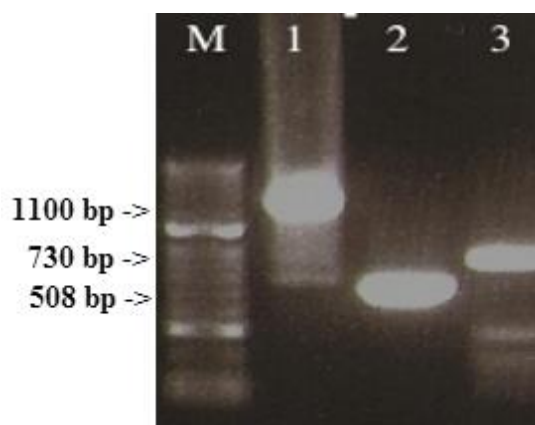
Univerzálne ale aj špecifické primery z ITS1 oblasti boli testované pomocou PCR. Primery, ktorými sa nám podarilo amplifikovať parazitárnu DNA z cercárií (viď obrázok 15) sme ďalej testovali na senzitivitu PCR. Na obrázku 14 je vidieť, že PCR s primermi ITS1 je o niečo citlivejšia ako s primermi COX1schist a dokáže amplifikovať až 100 fg parazitárnej DNA z cercárií. PCR s primermi, s ktorými vznikali nešpecifické amplikony sme ďalej podrobili gradientovej PCR. Ak sme nenašli ani potom žiadne špecifické amplikony DNA, ďalej sme sa s týmito primermi nezaoberali. Pokus o navrhnutie špecifických primerov pre odlišenie jednotlivých druhov trichobilharzií bol neúspešný z dôvodu neúspešnej amplifikácie parazitárnej DNA ako je vidieť na obrázkoch 16 a 17.

S primermi pre ITS1 oblasť sa nepodarila amplifikácia DNA zo séra ani mozgomiešneho moku. Pre zvýšenie senzitivity bola použitá nested PCR, kde sa taktiež nepodarilo amplifikovať parazitárnu DNA z vyzolovaného séra alebo likvoru. Od nested PCR bolo upustené z dôvodu opakovanej kontaminácie.



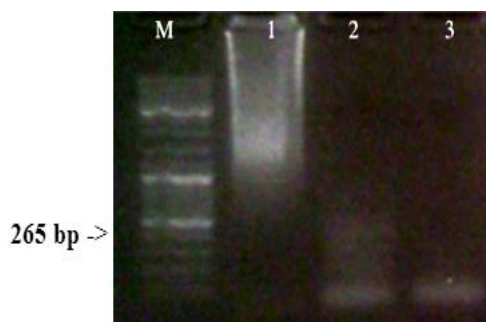
**Obrázok 14.** Senzitivita PCR s primermi pre ITS1.

(M – marker; 1- 10 ng DNA z cercárií *T. regenti*; 2 – 100pg DNA z cercárií *T. regenti*; 3 – 10 pg DNA z cercárií *T. regenti*; 4 – 100fg DNA z cercárií *T. regenti*. Amplikon veľký 1100 bp a nešpecifický amplikon z dôvodu repetícií a vysokej koncentrácie DNA 550 bp)

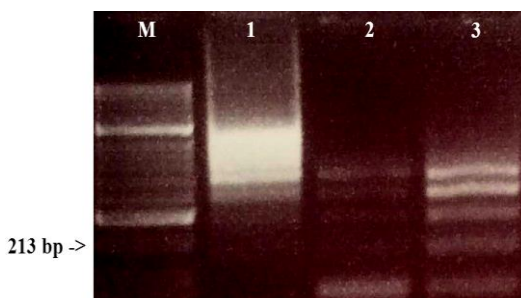


**Obrázok 1.** DNA aplikovaná s univerzálnymi primermi schITSv;

(M – marker; 1 - DNA *T. regenti*; (1100 bp) 2 – DNA *T. szidati* (508 bp); 3 – DNA *T. franki* (730 bp))



**Obrázok 16.**



**Obrázok 17.**

**Obr. 16 - Obr. 17:** DNA aplikovaná so špecifickými primery pre ITS1 TR ; Obr.16 - primery TR specif, ampikon veľký 265 bp a obr.17 – primery TR ITS specif, ampikon veľký 213 bp;

(M – marker; 1 - DNA *T. regenti*; 2 – DNA *T. szidati*; 3 – DNA *T. franki*)

### Primery T1323-1

PCR reakciou s primermi T1323-1 pre repetitívnu sekvenciu sa podarilo amplifikovať nízku koncentráciu parazitárnej DNA. Na obrázku 18 je vidieť, že najnižší detekčný limit PCR bol 1 fg DNA z cercárií *T. regenti* a 10 fg DNA z cercárií *T. szidati*. S primermi T1323-1 sa podarilo amplifikovať DNA zo sér a mozgomiešneho moku nakazených kačiek (viď obrázok 19), kde zachytiteľnosť bola 1 fg parazitárnej DNA obsiahnutej v sére infikovanej kačky. V tabuľke 16 sú zapísané vzorky, kde sa podarilo zachytiť parazitárnu DNA z kačiek.

Pre docielenie vyššej citlivosti boli vzorky testované aj semi-nested PCR, ale touto metódou sa ďalej nepokračovalo z dôvodu častých kontaminácií.



**Obrázok 18.** Senzitivita PCR s primermi T1323-1.

(M – marker, 1- 10 ng DNA z cercárií *T. regenti*; 2 – 100pg DNA z cercárií *T. regenti*;

**3** – 10 pg DNA z cercárií *T. regenti*; **4** – 100fg DNA z cercárií *T. regenti*; **5** – 10fg DNA z cercárií *T. regenti*; **6** – 1fg DNA z cercárií *T. regenti*; **7** – 100fg DNA z cercárií *T. szidati*; **8** – 10fg DNA z cercárií *T. szidati*.  
 Amplikon veľký 200 bp a 600 bp)



**Obrázok 19.** DNA aplifikovaná s primermi T1323-1.

(**M** – marker; **TR<sub>k</sub>** – DNA so séra z kačky nakazenej *T. regenti*, **TS<sub>k</sub>** – DNA zo séra z kačky nakazenej *T. szidati*. **1**- 100 fg DNA TR; **2** – 10 fg DNA TR; **3** – DNA negatívne sérum TR<sub>k</sub>; **4** – DNA TR<sub>k</sub> 6 d.p.i.; **5** – DNA TS<sub>k</sub> 3 d.p.i.; **6** – DNA TS<sub>k</sub> 23 d.p.i.; **7** – DNA TR<sub>k</sub> 5 d.p.i.; **8** – DNA TS<sub>k</sub> 5 d.p.i.; **9** – DNA TS<sub>k</sub> 5 d.p.i.; **10** – DNA TS<sub>k</sub> 5 d.p.i.; **11** – DNA TR<sub>k</sub> 5 d.p.i.; **12** – DNA TR<sub>k</sub> 5 d.p.i. Amplikon veľký 200 bp a 600 bp)

**Tabuľka 16.** Prehľad vzoriek, v ktorých bola detegovaná parazitárna DNA.

(TR<sub>k</sub> – sérum kačky nakazenej *T. regenti*, TS<sub>k</sub> – sérum kačky nakazenej *T. szidati*)

Séra kačiek nakazených TR, TS	Nákaza s počtom cercárii	Dni po infekcii	Materiál S - sérum, L - likvor
TR	-	6	S
TS	-	3	S
TS	1500	5	S
TR	1000	5	S
TR	1500	5	S
TS	1500	16	S
TR	1000	11	S
TR*	1500	7	S
TR*	1500	12	S

TR**	1000	10	L
TR**	1000	22	L
TR	1000	10	S
TR	1500	11	S
TR	1000	22	S
TR	1500	2	S
TR	5000	5	S

## 5 Diskusia

### ELISA a imunoblot

Pomocou ELISA a imunoblotu sme testovali séra myší experimentálne nakazených *T. regenti* a *T. szidati* v rôznych dňoch po infekcii. Za antigén sme zvolili homogenát cercárií *T. regenti* (TRhc), *T. szidati* (TShc) a *S. mansoni* (SMhc), pretože sme z myší získali len malý objem séra a nemohli byť testované ďalšie vytipované antigény (homogenát schistosomul, rekombinantný katepsín CB2 a CB1.1)

ELISA metódou sme zisťovali zmenu hladiny protilátok IgM a IgG voči antigénom TRhc (*T. regenti*) a TShc (*T. szidati*) po expozícii hostiteľov infekčným agens. Lichtenbergová a kol. (2008) sa zaoberali protilátkovou odpoveďou anti-TRhc IgM protilátok zo sér myší infikovaných *T. regenti*. Zistili, že nárast hladiny anti-TRhc IgM bol detegovateľný už od 10 dní po prvej infekcii. Progresívny nárast hladiny IgM protilátok bol zaznamenaný po každej novej infekcii až do 10 dní po štvrtej reinfekcii, potom bol evidovaný pokles hladiny IgM protilátok, ktoré v 120. d.p. štvrtej reinfekcii boli porovnateľné s neinfikovanými myšami.

Podobný priebeh vývoja produkcie IgM bol zaznamenaný aj u našich sér z myší infikovaných *T. regenti* a *T. szidati*. Pomocou ELISA bolo zistené, že nárast hladiny protilátok anti-TRhc IgM a anti-TShc IgM môže byť pozorovaný v homológnom sére už od 10 dní po prvej (d.p.) infekcii a až po 10. d.p. štvrtej reinfekcie, kde bol sledovaný pokles hladiny IgM. Tento priebeh protilátkovej odpovede nebol u všetkých testovaných sér rovnaký.

Ďalej sme sa zaoberali IgG protilátkovou odpoveďou proti antigénom TRhc a TShc. Výsledkom bol nárast IgG protilátok v homológnom sére myší od 10 d.p. druhej reinfekcii s následným poklesom po 10. d.p. štvrtej reinfekcii. Avšak u sér TR3, TR4 aj TS4 bol pokles hladiny IgG zaznamenaný až od 20. – 30. d.p. štvrtej reinfekcii.

Podobné hodnoty zaznamenali aj Kouřilová a kol. (2004), kde nárast anti-TRhc IgG1 protilátok asociovaných s Th2 odpoveďou bol pozorovaný od druhej a tretej reinfekcie.

Lichtenbergová a kol. (2008) tiež preukázali nárast hladiny anti-TRhc IgG1 od druhej reinfekcie a okrem toho aj od tretej a štvrtej reinfekcie. Pokles hladiny IgG1 nastal až v neskorších dňoch po štvrtej reinfekcii. Podobný vývoj produkcie protilátok IgM a IgG bol rovnaký skoro u všetkých sér infikovaných myší. Výnimku tvorili viaceré séra, kde boli pozorované odchýlky v ich sledovaných hladinách IgM a IgG. Tieto rozdiely mohli byť spôsobené tým, že cercárie nepenetrovali v rovnakom množstve do jednotlivých myší. Aj napriek tomu, že sme mali k dispozícii inbredný kmeň myší C57BL/6 rovnaký, aký bol použitý Lichtenbergovou a kol. (2008), boli zmeny v hladine protilátok odlišné.

Watkins-chow a Pavan (2008) zistili u myší C57BL/6J rozdielny počet kópii génu a taktiež rozdiel v génovej expresii. To značí o tom, že aj inbredné myši nie sú vždy izogénne. Tieto rozdiely by podľa autorov mohli ovplyvniť interpretáciu fyziologických a biomedicínskych experimentov. Preto by bolo vhodné tieto pokusy ešte zopakovať na väčšej skupine infikovaných myší a vzniknuté odchýlky vyhodnotiť pomocou štatistickej analýzy. Ďalšou možnosťou je v budúcich infekciách použiť iné inbredné kmene myší.

Naším ďalším krokom bolo metódou ELISA otestovať skríženú reaktivitu medzi *T. regenti* a *T. szidati*. Boli pozorované skrížené reakcie u IgG a IgM protilátkovej odpovedi proti heterológnym antigénom TRhc a TShc. Taktiež boli zaznamenané odchýlky v hodnotách hladín IgM aj IgG u jednotlivých sér v priebehu infekcie. Tiež sme zistili, že TShc antigen je atraktívnejší než TRhc antigen hlavne čo sa týka IgG odpovedi sér myší nakazených *T. regenti*. Tieto výsledky boli obdobné s výsledkami Kolářovej a kol. (1994), kde zistili, že *T. szidati* antigén je pri testovaní heterolognych sér viac atraktívny než *S. mansoni* antigén.

Podľa Ishida a kol. (2003) táto skrížená reaktivita vzniká najmä medzi fylogeneticky príbuznými druhmi helmintov, lebo zdieľajú rovnaké antigénne zložky. Imunoblotom by preto bolo možné získať lepšie výsledky, lebo táto metóda je citlivejšia ako ELISA z dôvodu rozpoznávania jednotlivých antigénov protilátkami.

Metódou Western blot sme chceli zistiť, aké antigény sú rozpoznávané protilátkami zo sér infikovaných myší v priebehu infekcie (od 10. d.p. prvej infekcie – 100. d.p. štvrtej reinfekcie). Testovali sme väzbu IgM a IgG protilátok zo séra infikovaných myší na antigen homogenátu cercárií *T. regenti* (TRhc). Protilátky IgM a IgG vo všetkých testovaných homológnych sérach rozpoznávali antigény z TRhc v oblasti 21 kDa a 22 kDa, a to

v rovnakom čase po infekcii ako v ELISA. U niektorých sér boli tiež zaznamenané reakcie v oblastiach 17, 32, 35, 46, 49 a 65 kDa.

Taktiež bola testovaná väzba IgM a IgG protilátok zo séra infikovaných myší na antigén homogenátu cercárií *T. szidati* (TShc). IgM protilátky u homológneho séra sa viazali na antigén TShc v oblasti 32 kDa a 52 kDa, zatiaľ čo IgG protilátky sa u týchto sér viazali na antigény v oblasti 26 kDa. Ďalšie rozpoznávané antigény IgG protilátkami boli 21, 35, 38, 56 a 90kDa, ktoré sa vyskytovali len ojedinele u niektorých sér. Naše výsledky nekorešpondujú s výsledkami Lichtenbergovej a kol. (2008), ktorí popísali reakciu IgG1 protilátok s TRhc zo sér myší reinfikovaných *T. regenti* v oblastiach 14,7; 17; 25; 28; 34 a 50 kDa. Jednou z možností je, že veľkosti našich rozpoznávaných antigénov sa nezhodujú kvôli použitiu 1D elektroforézy za redukujúcich podmienok, zatiaľ čo u Lichtenbergovej a kol. (2008) prebiehala 1D elektroforéza za neredukujúcich podmienok.

Western blot metódou sme sa na základe skrížených reakcií v ELISA snažili detegovať konkrétne skrížene reagujúce antigény. Na antigén TShc sa protilátky IgG heterológnych sér neviazali v rovnakej oblasti 26 kDa ako homológne séra. Protilátky IgG u heterológnych sér sa viazali na antigén TRhc v rovnakej oblasti 21 kDa a 22 kDa ako homológne séra. Skríženú reakciu sme zaznamenali aj pri testovaní väzby IgG u heterológnych (*T. regenti* a *T. szidati*) a homológnych (*S. mansoni*) sér myší na SMhc antigén. Vo všetkých heterológnych aj homológnych sérach bol rozpoznávaný rovnaký antigén v oblasti 28 kDa. Podľa Marikovského a kol. (1990) sa jedná o serínovú proteázu.

Výsledky z Western blotu ukazujú, na možné využitie antigénu k medzidruhovému odlíšeniu *T. regenti* a *T. szidati*. Protilátky IgG z heterológneho séra nerozpoznávali antigén 26 kDa z homogenátu cercárií *T. szidati*, ktorý bol rozpoznávaný len homológnymi sérami.

Vzhľadom na výsledky z Western blotu je možné využitie homogenátu cercárií k diagnostike vtáčich schistosom. Séra z myší infikovaných *T. regenti* nerozpoznávali antigén 26 kDa z homogenátu TShc. A taktiež homológne séra myší nakazených *T. regenti* a *T. szidati* nerozpoznávali antigén 28 kDa.

Použitím 2D elektroforézy sme sa rozhodli identifikovať antigény, ktoré boli rozpoznávané IgG protilátkami v sére infikovaných myší. Všetky proteínové spoty z TRhc a

TShc, ktoré boli rozpoznávané na imunoblote IgG homológnyimi protilátkami sme vyhľadali na 2D gély a poslali na rozbor do Laboratória hmotnostnej spektrometrie. Získané sekvencie neznámych proteínov sme porovnávali s databázou BLASTp a zisťovali sme podobnosť našich sekvencií so sekvenciami iných organizmov v databáze. Niektoré identifikované proteíny slúžia ako diagnosticky významné antigény u ľudských schistosom. Spoty 26 kDa a 27 kDa boli identifikované ako trioso-fosfát-isomeráza (TPI), ktorá sa podieľa na glykolýze a bola testovaná ako DNA vakcína proti *S. japonicum* (SjCTPI) (Zhu a kol. 2006; Da'dara a kol. 2008). Ďalšími spotmi boli proteíny 36 kDa a 60 kDa, ktoré boli analyzované ako glyceraldehyd-3 fosfát dehydrogenáza (GAPDH). GAPDH bola označená ako možný kandidát na vakcínu proti *S. japonicum* (Waine a kol. 1997). Tallima a kol. (2003) imunizovali myši peptidom B GAPDH, a ich dáta ukazujú na silnú humorálnu odpoveď spojenú so snížením produkcie vajíčok páru *S. mansoni*. Je to ďalší kandidát na vakcínu proti *S. mansoni* a *S. japonicum*. Spoty 38 kDa a 60 kDa boli charakterizované ako fruktóza-1,6-bisfosfát aldoláza (FBPA). Tento proteín je nevyhnutný pre glykolýzu. Rekombinant FBPA *S. japonicum* by mohol byť použitý ako diagnostický marker pre detekciu protilátok proti *S. japonicum* (Peng a kol. 2008). Spot 22kDa bol identifikovaný ako antigén Sm 21.7, ktorý je kandidátom na vakcínu (Ahmed a kol. 2006). Ďalším rozpoznávaným antigénom bol peroxiredoxín 22 kDa, ktorý je tiež kandidátom na vakcínu proti *S. japonicum* (Kumagai a kol. 2009). Spot 27 kDa bol identifikovaný ako proteín fosfoglycerátmutáza, ktorý sa podľa Zhang a kol. (2015) javí v rekombinantnej forme ako vhodný marker pre diagnostiku *S. japonicum*. Určite by bolo vhodné tieto proteíny pripraviť v rekombinantnej forme a otestovať ich spoľahlivosť v diagnostike vtáčích schistosom.

### **Molekulárna analýza**

Izolácia DNA z rôznych biologických materiálov a naväzujúca PCR patria medzi rutinné metódy používané v laboratóriách k identifikácii patogéna. V našom prípade zatiaľ nebol vyvinutý spoľahlivý spôsob izolácie DNA *T. regenti* a *T. szidati* z biologického materiálu infikovaných kačiek (sérum, mozgomiešny mok) a myši (sérum). Naším cieľom bolo otestovať rôzne metódy izolácie DNA zo séra a mozgomiešneho moku a nájsť vhodné primery pre amplifikáciu DNA použitím PCR, nested PCR a semi-nested PCR. Zo všetkých skúšaných metód a komerčných kitov bola vybraná HotSHOT extrakčná metóda. Dôvodom

bola jednoduchšia manipulácia, lebo celá reakcia prebieha v jednej mikroskúmavke, a tým môžeme redukovať kontamináciu vzoriek spôsobených ľudským faktorom.

Boli použité primery pre gény *cox1*, ITS1 a primery pre tandemovo repetitívnej sekvencie (ToSau3). Primery pre *cox1* boli vybrané pre schopnosť odlišenia jednotlivých druhov schistosom. Tieto primery boli použité na diagnostiku niektorých helmintov, napríklad na detekciu parazitárnej DNA zo séra ľudí a myši infikovaných *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mekongi* a *T. solium* (Kato-Hayashi a kol. 2010; Ramahefarisoa a kol. 2010). Nám sa však nepodarilo dosiahnuť podobných výsledkov. Amplifikácia parazitárnej DNA zo séra a mozgomiešneho moku infikovaných kačiek sa použitím týchto primerov nepodarila, aj keď najnižšia možná detegovateľná koncentrácia DNA *T. regenti* bola 10 pg.

Ďalšie použité primery pre detekciu DNA trichobilharzií boli navrhnuté pre ITS1 oblasť. Táto časť rDNA bola vybraná pre vysoký stupeň medzidruhovej variability. Podľa autorov Dvořák a kol. (2002) by mohli tieto sekvencie slúžiť k navrhnutiu špecifického markeru pre diagnostiku. Vonkajšie a vnútorné univerzálne primery (sch ITS1v, sch ITS1n, sch vonk) boli navrhnuté tak, aby veľkosti jednotlivých amplikónov bolo možné odčítať z gélu pod UV. Taktiež boli navrhnuté špecifické primery (TR specif, sch nested trtf, sch nested ts, TR ITS specif) pre amplifikovanie iba jedného druhu trichobilharzií. Všetky novo navrhnuté primery boli testované pomocou gradientovej PCR na určenie optimálnej teploty nasadania primerov. Všetky uvedené primery pre ITS1 mali optimálnu teplotu 55 °C. Pomocou špecifických primerov sa nám nepodarilo amplifikovať ani parazitárnu DNA z cercárií *T. regenti*. V každej testovanej teplote dochádzalo k nešpecifickej PCR reakcií so vznikom "smearu". Univerzálne primery mali detekčný limit 100 fg DNA *T. regenti*, čo značí o tom, že PCR týmito primermi je omnoho citlivejšia ako pomocou primerov *cox1*. Aj napriek zachyteniu tak nízkej koncentrácie DNA sme neboli schopní amplifikovať DNA zo séra ani mozgomiešneho moku. Jedným z dôvodov môže byť až tak nízka koncentrácia parazitárnej DNA v sére a likvore, že sme ju neboli schopní zachytiť pomocou PCR s týmito primermi. Pri pokusoch s nested PCR sme nedocielili lepších výsledkov z dôvodov opakovanej kontaminácie vzoriek aj napriek zachovaniu čo najčistejších podmienok. Schets a kol. (2010) sa pokúšali potvrdiť prítomnosť vtáčich schistosom v prírodných jazerách. Pomocou PCR s primermi z oblasti ITS1 a ITS2 sa im nepodarilo amplifikovať DNA

trichobilharzií. Preto si myslíme, že primery z ITS oblasti sú vhodné na medzidruhové odlišenie trichobilharzií, ale nie z materiálov obsahujúcich nízku koncentráciu parazitárnej DNA.

Ďalším zvoleným diagnostickým markerom boli primery T1323-1 odvodené z tandemovo repetitívnej sekvencie *T. regenti* a *T. szidati*, ktorá tvorí 1,5 - 2 % genómu. Pre primery z tejto sekvencie sme sa rozhodli, pretože sú úspešne používané na PCR diagnostiku iných parazitov. Napríklad u *S. mansoni*, *S. haematobium* a *T. solium* slúži ako vhodný diagnostický marker pri zachytení parazitárnej DNA zo séra alebo mozgomiešneho moku infikovaných zvierat, alebo ľudí (Hamburgerom a kol. 2001; Michelet a kol. 2011). Hertel a kol. (2002) bol schopný primermi T1323-1 zachytiť 10 fg DNA *T. szidati*.

Nám sa však podarilo zachytiť 1 fg DNA *T. regenti* a 10 fg *T. szidati*. Rozdiel v senzitivite PCR s DNA jednotlivých trichobilharzií mohla byť spôsobená rozdielnym zastúpením repetitívnej sekvencie v genóme. Týmito primermi nie je možné medzidruhové odlišenie, pretože sekvencie *T. regenti* a *T. szidati* sú zhodné z 92 %. Použitím primerov T1323-1 sme boli schopní amplifikovať DNA *T. regenti* a *T. szidati* zo séra a mozgomiešneho moku infikovaných kačiek. Zo 111 pozitívnych testovaných vzoriek sa nám podarilo zachytiť parazitárnu DNA len u 16 z nich. Či bude DNA pomocou PCR amplifikovaná nezávisí zrejme od infekčnej dávky cercárií (1000 – 5000 cercárií), dní po infekcii (2 – 22 d.p.i.), ani od toho akú dlhú dobu boli vzorky po odbere uskladnené v - 20 °C (2012 - 2015). Túto nízku záchytnosť parazitárnej DNA pomocou PCR mohla spôsobiť nízka koncentrácia parazitárnej DNA v krvi a mozgomiešnom moku, alebo malé množstvo vstupného objemu séra na extrakciu DNA.

Taktiež sme vyskúšali pomocou PCR amplifikovať DNA *T. regenti* a *T. szidati* so séra infikovaných myší. Z DNA vyizolovanej z myších sér sa nám nepodarilo pomocou PCR amplifikovať parazitárnu DNA. Mohlo to byť zapríčinené aj tým, že v sére 10 dní po infekcii sa už nenachádzali žiadne červy ani ich fragmenty. Bolo by vhodné pokus zopakovať a to so sérami odobratými pár hodín, prípadne dní, po infekcii. Nami nastavený pokus nám nedovoľoval vykonať odbery skôr ako za 10 dní, lebo sa jednalo o odobratie veľkého množstva krvi (0,8 % z celkového objemu).

Taktiež by bolo vhodné zamerať sa na teoretický výpočet detekčného limitu. Zistiť koľko cercárií by sa mohlo vyskytovať v nami odobratej krvi z infikovaných kačiek a myši. Na základe týchto výsledkov by bolo vhodné zvážiť iné metódy extrakcie DNA (z väčšieho objemu materiálu) alebo extrakčnú metódu doplniť o nejakú koncentračnú metódu.

## 6 Záver

Táto práca sa zaoberala sérologickou a molekulárnou diagnostikou infekcií spôsobených vtáčimi schistosomami *T. regenti* a *T. szidati* u definitívnych (kačky) a náhodných (myši) hostiteľov. Metódami ELISA, Western blot a PCR boli testované séra infikovaných myši. Séra a mozgomiešny mok infikovaných kačiek bol testovaný metódou PCR. Medzi najdôležitejšie poznatky patrí:

- a) Sledovaním špecifických protilátok IgM a IgG sme dokázali, že hladina IgM a IgG protilátok stúpa s každou ďalšou reinfekciou a bez ďalšej expozície cercáriami hladina postupne klesá. Hladina špecifických protilátok je aj 100 dní po štvrtej reinfekcii stále vyššia ako u negatívnych sér.
- b) Zistili sme, že testovaný antigén (homogenát cercárií) nie je vhodný k diagnostike pomocou ELISA z dôvodu výskytu medzidruhových skrížených reakcií. Výsledky z Western blotu ukazujú, na možné využitie antigénu k medzidruhovému odlíšeniu *T. regenti* a *T. szidati*. Protilátky IgG z heterológneho séra nerozpoznávali antigén 26 kDa z homogenátu cercárií *T. szidati*, ktorý bol rozpoznávaný len homológnymi sérami.
- c) Medzi najvýznamnejšie antigény rozpoznávané špecifickými IgG protilátkami patrili podľa výsledkov z hmotnostnej spektrometrie fruktóza-1,6-bisfosfát aldoláza, peroxiredoxín, glyceraldehyd-3- fosfát dehydrogenáza, trioso-fosfát izomeráza, fosfoglycerátmutáza a Sm 21,7 (s membránou asociovaný proteín). Tieto antigény môžu poslúžiť ako vhodné markery k diferenciálnej diagnostike schistosom.

- d) S primermi T1323-1 pre tandemovo repetitívnu oblasť *T. regenti* sa pomocou PCR podarilo amplifikovať parazitárnu DNA zo séra a mozgomiešneho moku infikovaných kačiek. Primery T1323-1 sú vhodné pri rodovej diagnostike, nie však k medzi-druhovej.

Výsledky tejto práce by mohli v budúcnosti poslúžiť k vývoju vhodného diagnostického markera a to v serologickej ako aj v molekulárnej diagnostike vtáčích schistosom u definitívnych aj náhodných hostiteľov. Do budúca by bolo vhodné z vyššie uvedených proteínov pripraviť rekombinantné proteíny a otestovať ich na prípadné skrížené reakcie. Pre zvýšenie záchytnosti parazitárnej DNA by bolo vhodné nájsť lepšiu metódu izolácie DNA z biologického materiálu.

## 7 Zoznam použitej literatúry

**Acosta-Rodriguez E V, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007).** Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 8, 942–949.

**Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002).** The Adaptive Immune System., in: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.

**Carvalho GBF, da Silva-Pereira RA, Pacífico LGG, Fonseca CT (2011).** Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 837–843.

**Dalton J, Clough K, Jones M, Brindley P (1997).** The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 114, 105–112.

**Dolečková K, Kašný M, Mikeš L, Mutapi F, Stack C, Mountford AP, Horák P (2007).** Peptidases of *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) and its mollusc an host *Radix peregra* s lat (Lymnaeidae): Construction and screening of cDNA library from intramolluscan stages of the parasite. *Folia Parasitol. (Praha)*. 54, 94–98.

**Dvořák J, Delcroix M, Rossi A, Vopálenský V, Pospíšek M, Šedinová M, Mikeš L, Sajid M, Sali A, McKerrow JH, Horák P, Caffrey CR (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.

**Dvořák J, Vanáčová S, Hampl V, Flegr J, Horák P (2002).** Comparison of european *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences. *Parasitology* 124, 307–313.

**Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D (1998).** A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J. Immunol. Methods* 221, 35–41.

**Hamburger J, He-Na, Abbasi I, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel a (2001).** Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 907–911.

**Hamburger J, Turetski T, Kapeller I, Deresiewicz R (1991).** Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 73–80.

**Herwerden van L, Blair D, Agatsuma T (1998).** Intra- and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex. *Parasitology* 116 ( Pt 4, 311–317.

**Horák P, Dvořák J, Kolárová L, Trefil L (1999).** *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems. *Parasitology* 119 ( Pt 6, 577–581.

- Horák P, Kolářová L, Adema CM (2002).** Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Adv. Parasitol.* 52, 155–233.
- Horák P, Kolářová L, Dvořák J (1998).** *Trichobilharzia regenti* n sp (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite* 5, 349–357.
- Horák P, Kolářová LE (2001).** Bird schistosomes: Do they die in mammalian skin? *Trends Parasitol.* 17, 66–69.
- Horák P, Kovár L, Kolářová L, Nebesárová J (1998).** Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact. *Parasitology* 116 ( Pt 2, 139–147.
- Horák P, Mikeš L, Lichtenbergová L, Skála V, Soldánová M, Brant SV (2015).** Avian Schistosomes and Outbreaks of Cercarial Dermatitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 165–190.
- Hořejší V, Bartůňková J (2009).** *Základy imunologie*, 4. vydanie. ed, *Základy imunologie*. TRITON.
- Hrádková K, Horák P (2002).** Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *J. Helminthol.* 76, 137–141.
- 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.
- Chanová M, Vuong S, Horák P (2007).** *Trichobilharzia szidati*: The lung phase of migration within avian and mammalian hosts. *Parasitol. Res.* 100, 1243–1247.
- Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM (2008).** Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123, 326–338.
- Kane RA, Rollinson D (1994).** Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63, 153–156.
- Kapsenberg ML (2003).** Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 984–993.
- Kašný M, Lichtenbergová L, Kolářová L, Horák P (2009).** Identification and characterization of dominant antigens of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti*., in: *Abstract Book – 3rd Workshop on Bird Schistosomes and Cercarial Dermatitis*. p. 21.
- Kašný M, Mikeš L, Dalton JP, Mountford a P, Horák P (2007).** Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134, 1599–1609.

**Kidd P (2003).** Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* 8, 223–246.

**Kolarova L, Sykora J, Bah BA (1994).** Serodiagnosis of cercarial dermatitis with antigens of *Trichobilharzia szidati* and *Schistosoma mansoni*. *Cent. Eur. J. Public Health* 2, 19–22.

**Kolářová L, Horák P, Sítko J (1997).** Cercarial dermatitis in focus: schistosomes in the Czech Republic.pdf. *Helminthologia* 34, 127–139.

**Kolářová L, Horák P, Skírnisson K, Marečková H, Doenhoff M (2013).** Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 45, 63–74.

**Kouřilová P, Hogg KG, Kolářová L, Mountford AP (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.

**Kouřilová P, Syrůček M, Kolářová L (2004).** The severity of mouse pathologies caused by the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* in relation to host immune status. *Parasitol. Res.* 93, 8–16.

**Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser L a (2006).** Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203, 2271–2279.

**Lichtenbergová L, Horák P (2012).** Pathogenicity of trichobilharzia spp for vertebrates. *J. Parasitol. Res.* 2012.

**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.

**Littlewood DTJ, Lockyer AE, Webster BL, Johnston DA, Le TH (2006).** The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 452–67.

**Lockyer a E, Olson PD, Ostergaard P, Rollinson D, Johnston D a, Attwood SW, Southgate VR, Horák P, Snyder SD, Le TH, Agatsuma T, McManus DP, Carmichael a C, Naem S, Littlewood DTJ (2003).** The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858. *Parasitology* 126, 203–224.

- Marikovsky M, Arnon R, Fishelson Z (1990).** Schistosoma mansoni: localization of the 28 kDa secreted protease in cercaria. *Parasite Immunol.* 12, 389–401.
- Michelet L, Fleury A, Sciutto E, Kendjo E, Fragoso G, Paris L, Bouteille B (2011).** Human neurocysticercosis: Comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 49, 195–200.
- Moore MS, Kuenzel WJ, Mench JA (1994).** A technique for cannulating the Cisterna magna and sampling cerebrospinal fluid from socially housed birds. *Poult. Sci.* 73, 556–563.
- Ott Joslin J (2009).** Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals. *J. Exot. Pet Med.* 18, 117–139.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005).** A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6, 1133–1141.
- Pontes LA, Oliveira MC, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A (2003).** COMPARISON OF A POLYMERASE CHAIN REACTION AND THE KATO-KATZ TECHNIQUE FOR DIAGNOSING INFECTION WITH SCHISTOSOMA MANSONI. *Am J Trop Med Hyg* 68, 652–656.
- Rudbeck L, Dissing J (1998).** Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques* 25, 588–592.
- Skelly PJ, Shoemaker CB (2001).** Schistosoma mansoni proteases Sm31 (cathepsin B) and Sm32 (legumain) are expressed in the cecum and protonephridia of cercariae. *J. Parasitol.* 87, 1218–1221.
- Turvey SE, Broide DH (2010).** Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S24–S32.
- W Haas and U Pietsch (1991).** Migration of Trichobilharzia ocellata schistosomula in the duck and in the abnormal murine host. *Parasitol. Res.* 77, 642–644.
- Watkins-chow DE, Pavan WJ (2008).** Genomic copy number and expression variation within the C57BL / 6J inbred mouse strain. 60–66.
- Webster BL, Rudolfová J, Horák P, Littlewood DTJ (2007).** The complete mitochondrial genome of the bird schistosome Trichobilharzia regenti (Platyhelminthes: Digenea), causative agent of cercarial dermatitis. *J. Parasitol.* 93, 553–561.