

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra analytické chemie

**STUDIUM VAJEČNÝCH PROTILÁTEK JAKO
PROSTŘEDKU PASIVNÍ IMUNIZACE**

Diplomová práce

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza

Praha 2006

Zdeňka Sobotková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. Dr. Petra Hodka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....18. 8. 2006.....

.....*Jelka Zelenka*.....

podpis

Děkuji zejména vedoucímu diplomové práce Doc. Dr. Petru Hodkovi, CSc., za cenné rady a pomoc při této práci. Také zde chci vyjádřit dík svému otci a L. Maděrovi za podporu nejen při studiu.

Seznam použitých zkratk

BSA	hovězí sérový albumin
CFA	kompletní Freundovo adjuvans
ELISA	enzyme linked-immunosorbent assay
IgY	slepičí imunoglobulin
KLH	„keyhole-limpet hemocyanin“- hemocyanin z plže
M	mol/l
MgCl₂	chlorid hořečnatý
M_r	relativní molekulová hmotnost
NaN₃	azid sodný
NFA	nekompletní Freundovo adjuvans
PAGE	„polyakrylamide electrophoresis“- elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový pufr
p.n.pp	p-nitrofenyfosfát (4-nitrophenyl phosphate disodium salt)
RIA	Radioimmunoassay
RPM	„rotation per minute“- otáčky za minutu
SDS	dodecyl sulfát sodný
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
Tris	1,1,1,1-tris(hydroxymethyl) aminoethan
% v/v	objemová procenta
% w/v	hmotnostní procenta

Obsah:

1 Teoretický úvod	7
1.1 Protilátky	7
1.1.1 Charakteristika protilátek	7
1.1.2 Struktura imunoglobulinů	8
1.1.3 Slepíčí protilátky	9
1.1.4 Rozdíl mezi savčími a slepičími protilátkami	9
1.1.5 Využití protilátek IgY	10
1.1.6 Produkce a purifikace protilátek	10
1.2 Úloha protilátek v souvislosti s onemocněním Cystická fibróza	12
1.2.1 Vybrané mikroorganismy pro pasivní imunizaci	13
2 Cíl práce	15
3 Materiál a metody	16
3.1 Příprava a purifikace protilátek IgY	16
3.1.1 Sběr vajec	16
3.1.2 Imunizace slepice	16
3.1.3 Purifikace protilátek	16
3.1.4 Účinky protilátek na lidský organismus	17
3.1.5 Stabilizační látky	17
3.1.6 Studium stability IgY	18
3.2 Analytické metody	19
3.2.1 Stanovení koncentrace proteinů	19
3.3 Imunochemické metody	20
3.3.1 ELISA	20
3.4. Elektrochemické metody	21
3.4.1 ELFO	21
3.5 Mikrobiologické techniky	24
3.5.1 Izolace subcelulární frakce bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.5.2 Ovlivnění růstu <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.6 Použité chemikálie	26
3.7 Použité přístrojové vybavení a pomůcky	26

4 Výsledky	28
4.1 Izolace a charakterizace protilátek IgY	28
4.1.1 Imunizace slepice a izolace protilátek	28
4.1.2 Stanovení specifických protilátek proti modelovému peptidu ELISA testem	30
4.1.3 Stanovení specifických protilátek po imunizaci suspenzí bakteriálních buněk ELISA testem	30
4.2 Sledování stability protilátky IgY	32
4.2.1 Teplotní vlivy na aktivitu protilátky IgY	32
4.2.2 Vlivy stabilizačních látek na aktivitu protilátky IgY	35
4.3 Sledování účinku IgY při jejím podávání na lidský organismus	37
4.4 Ovlivnění růstu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a <i>Burkholderia cepacia</i> v přítomnosti specifické protilátky	39
4.5 Ověření izolace subcelulární frakce bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
5 Diskuse	41
6 Souhrn	46
7 Použitá literatura	47

1 Teoretický úvod

1.1 Protilátky

1.1.1 Charakteristika protilátek

Živé organismy mají obranné mechanismy, které je chrání před napadením viry, bakteriemi a před působením cizorodých makromolekulárních látek (toxiny) a konečně i před vlastními patologicky změněnými poškozenými či infikovanými buňkami. Existují dva mechanismy této obrany:

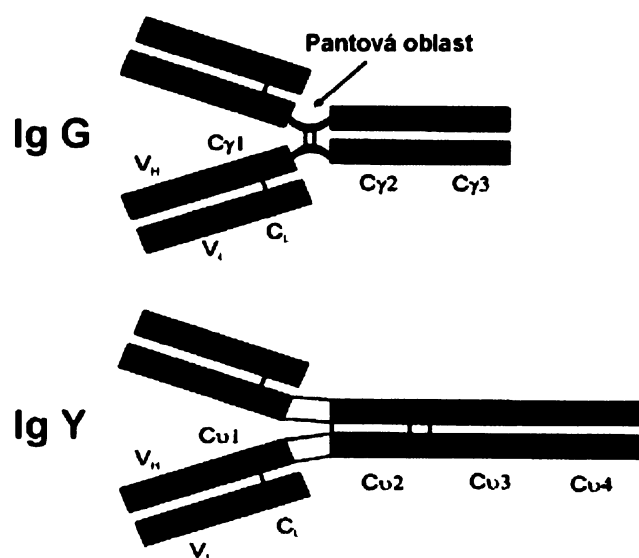
1) Nespecifická, neadaptivní ochrana zajišťovaná fagocyty, „natural killer“ (NK buňkami), systémem komplementu, interferony a cytokiny. Tento typ obrany je charakteristický pro všechny mnohobuněčné organismy. Buňky a molekuly zajišťující nespecifickou obranu jsou v organismu připraveny předem před vniknutím cizího agens do organismu, a proto reagují na přítomnost škodlivin rychle. Na rozdíl od specifických složek nemají tzv. imunologickou paměť. Velmi důležitou úlohu má i kožní a slizniční bariéra se svými mechanickými, chemickými a mikrobiálními (normální bakteriální mikroflóra) obrannými mechanismy.

2) Specifická adaptivní ochrana je zajišťovaná protilátkami (humorální imunita) a T-lymfocyty (buněčná imunita). Vyskytuje se až u obratlovců, odpověď je pomalejší, ale disponuje imunologickou pamětí. Humorální imunitní reakce je charakteristická produkcí sérových imunoglobulinů, zvaných protilátky, B-lymfocyty v kostní dřeni.

Protilátka reaguje s antigenem, tím ho označuje a případně neutralizuje. V závislosti na specifitě protilátky vůči antigenu, rozlišujeme protilátky monospecifické (reagují pouze s jedním antigenním místem) a polyspecifické (reagují s řadou antigenů nebo antigenních determinant jednoho antigenu). Polyspecifické protilátky lze získat z krve imunizovaných zvířat, z kolostra savců nebo z vaječného žloutku ptáků.

1.1.2 Struktura imunoglobulinů

Protilátky jsou tvořeny dvěma těžkými H a dvěma lehkými L řetězci, které jsou vzájemně kovalentně propojeny cystinovými můstky. Těžký řetězec obsahuje tři nebo čtyři konstantní domény (C) a jednu variabilní doménu (V). Lehký řetězec se skládá z jedné konstantní domény (C) a jedné domény variabilní (V). Těžké řetězce jsou spojeny s tzv. pantovou oblastí, která dodává molekule větší flexibilitu (viz. Obr.1). Těžké řetězce jsou v tzv. Fc části glykosilovány¹. Imunoglobuliny jsou tedy glykoproteiny. Dle typu těžkého řetězce (μ , δ , γ , α , ϵ) dělíme imunoglobuliny do pěti tříd (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE). Každý z pěti typů H řetězce se může kombinovat s jedním ze dvou typů L řetězce (κ , λ). Majoritní zastoupení v krvi savců má IgG.



Obr.1. Rozdíl mezi IgG savců a IgY ptáků

1.1.3 Slepíčí protilátky

Než slepice snese vajíčko, sekretuje do vaječného žloutku krevní imunoglobuliny typu IgG spolu s některými dalšími proteiny (slepíčí sérový albumin, α_2 -glykoprotein) i lipoproteiny (LDL, HDL) a naopak imunoglobuliny IgA a IgM spolu s dalšími proteiny (např. ovalbumin) do bílku. Koncentrace protilátek ve žloutku je dokonce 1,3 – 1,9 x vyšší než v krvi slepice². Po vylíhnutí kuřete přejdou imunoglobuliny ze žloutku do jeho krve, zatímco IgA a IgM z bílku zajišťují pasivní imunizaci trávicího traktu.

1.1.4 Rozdíl mezi savčími a slepičími protilátkami

Ptačí imunoglobuliny, izolované z vaječných žloutků a označované IgY, se v poslední době těší stále větší oblibě. Mají oproti savčím protilátkám řadu výhod.

První výhodou je menší stres experimentálního zvířete. Slepici se totiž jen odebere snesené vajíčko, kdežto u savců se protilátky získávají odběry krve či dokonce srdeční punkcí vedoucí ke smrti zvířete. Druhou výhodou je až 30 x vyšší výtěžnost slepičích imunoglobulinů (IgY) oproti získávání protilátek z krve králíka³. Přestože je koncentrace IgY ve vaječném žloutku menší než v krvi savců je slepice schopna vyprodukovat až 25 g protilátek za rok, neboť vajíčka obsahující 70-150 mg IgY v jednom žloutku jsou slepicí snášena téměř denně. Dále, vzhledem k velké fylogenetické vzdálenosti ptáků a savců, slepice mnohem citlivěji reaguje na aplikovaný savčí antigen produkcí protilátek, a to i proti vysoce konzervovaným savčím proteinům, na které by u králíka byla nízká či nulová imunitní odpověď. Dalším klinicky významným faktem je nereaktivnost IgY s reumatoidním faktorem, s reumatoidními receptory a systémem komplementu savců⁴. Při použití savčích protilátek se díky těmto interakcím objevovaly falešně pozitivní výsledky, čemuž se použitím IgY předejde.

Ptačí imunoglobuliny se od savčích liší i dalšími parametry. U ptáků byly nalezeny jen tři třídy imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM). Ptačí IgG a IgA mají o jednu konstantní doménu těžkého řetězce více než savčí IgG a IgA (viz Obr.1, str. 8) Ptačí

protilátky naopak nemají pantovou oblast. Tyto dvě skutečnosti mají za následek menší míru precipitace komplexů antigen-IgY než u imunokomplexů se savčími protilátkami. S vyšším počtem konstantních domén u IgY souvisí i poměrně vysoký obsah sacharidů, zejména manózy, na těžkém řetězci. Ptačí imunoglobuliny jsou však oproti savcím poněkud labilnější. IgY mají asi o 3°C nižší termální stabilitu než savčí IgG. Rovněž stálost v kyselém prostředí je u IgY nižší, což zřejmě souvisí s hodnotou pI, která je posunuta o jednotku pH do kyselé oblasti ve srovnání s IgG⁵.

1.1.5 Využití protilátek IgY

Slepičí protilátky IgY mají široké použití a jejich uplatnění se stále zvětšuje. V klinické praxi se užívají např. při RIA či ELISA, kdy se stanovují např. vlastní protilátky (Ab α HIV, IgE při atopii) nebo proteiny vypovídající o patologickém stavu (nádorové markery). Důležité je též jejich použití jako antidota např. proti hadímu jedu, botulotoxinu či tetanotoxinu, pro pasivní imunizaci (proti hepatitidě A, vzteklině, tetanu) nebo k substituční léčbě intravenózními imunoglobuliny (u pacientů s poruchou tvorby protilátek).

Ve vědeckovýzkumné praxi lze IgY použít k přípravě imunosorbentu k izolaci či zakoncentrování studovaných látek. Při imunoafinitní chromatografii se využívají slepičí protilátky imobilizované na gelové matici. Imobilizovaná protilátka specificky rozpoznává, váže a působením elučních pufrů i uvolňuje daný antigen. Dále k detekci a stanovení nízko- i vysokomolekulárních biomolekul (imunodifuze, ELISA, „Western-blotting“).

1.1.6 Produkce a purifikace protilátek

K navození produkce protilátek specifických pro určitý antigen slouží imunizace. Tento proces je založen na podání antigenu imunizovanému organismu subkutánně (perorálně, intradermálně, intramuskulárně). Pro zvýšení produkce protilátek se antigen podává v kombinaci s látkami (např. deaktivované mikroorganismy či jejich složky), které nespecificky stimulují imunitní odpověď organismu. Nejúčinnějším

imunostimulačním prostředkem u slepic je Freundovo adjuvans. Antigen se slepicím podává ve formě vodné emulze s Freundovým adjuvans⁶. Po imunizaci proteinem se během 4-6 týdnů ustálí hladina produkovaných protilátek na hodnotě, která je většinou konstantní po dobu nejméně šesti měsíců, než se začne postupně snižovat. Po imunizaci peptidem je situace odlišná. Nejdříve dochází k prudkému nárůstu tvorby protilátek a následně k rychlému poklesu, to vše během tří až čtyř měsíců (Hodek; osobní sdělení).

V současnosti je známo několik metod izolace slepičích protilátek. Jednotlivé metody se liší jak v náročnosti postupu, tak i v množství a čistotě připravené protilátky. Při srovnání čtyř metod⁷ využívajících dextran sulfát⁸, polyethylenglykol⁹, metodu zřed'ování¹⁰ a xantánovou gumu¹¹ se jeví jako nejefektivnější (z hlediska množství výtěžku, čistoty, náročnosti izolace) metoda zřed'ovací. Izolace slepičích protilátek zřed'ovací metodou je založena na oddělení vodorozpustných proteinů od vaječného žloutku v slabě kyselém prostředí za snížené teploty. K následné purifikaci se využívá centrifugace, vysolování nebo iontoměničová chromatografie.

Při výběru peptidu pro imunizaci je přihlíženo k tomu, aby vybraný úsek aminokyselin nebyl součástí sekundární struktury (α -helix, β -skládaný list), tedy je vybíráno místo tzv. „ohybu“. Dalším kritériem je antigenicita, přičemž platí, že příliš hydrofobní peptid, je poměrně málo antigenní. Dále je rozhodováno mezi jedinečností struktury peptidu, či naopak sekvenční podobností (identitou). Zde záleží na účelu následných experimentů. Vybraná sekvence musí být také dobře přístupná (povrchový peptid). Po výběru vhodného sekvenčního úseku a jeho syntéze se ještě musí peptid vhodně upravit (zvětšit), aby byl efektivně rozpoznáván imunitním systémem slepice. To lze provést několika způsoby:

1. Navázání peptidu SH skupinou cysteinu na některé jiné proteiny (např. plží „Keyhole-limpet hemocyanin“ - KLH či hovězí sérový albumin - BSA)
2. Syntéza peptidu na TENTA gel \rightarrow n x peptid
3. Metodou MAP - „Multi Antigen Peptide“. Při tomto postupu vzniká tzv. lysinový strom s osmi rameny, na nichž je syntetizován příslušný peptid. Relativní molekulová hmotnost celého MAPu je v závislosti na délce peptidu 9 až 10 tisíc.

V mé práci byl použit jako imunogen formaldehydem usmrcené bakterie sbírkových kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* a kmen *Pseudomonas aeruginosa* izolovaný z dýchacích cest pacientů s cystickou fibrózou, kterými byly slepice imunizovány. A také modelový peptid o sekvenci (LDRRVPIPVDRSCGG), navázaný pomocí glutaraldehydu na KLH tzn. konjugát. Tímto antigenem byly imunizovány další slepice.

1.2 Úloha protilátek v souvislosti s onemocněním cystická fibróza

Cystická fibróza je závažné genetické onemocnění, kdy mutace v genu jsou přenášeny autosomálně recesivním způsobem. Projevuje se změnou ve složení a fyzikálně chemických vlastnostech hlenu na povrchu sliznic, čímž narušuje normální funkci orgánů (např. na povrchu epitelu dýchacích cest se v důsledku změn hlenu mění periciliární tekutina z normální hypotonické na isotonickou a neschopnou baktericidie)¹².

Pacienti postižení touto nemocí trpí opakovanými respiračními infekcemi, jejichž chronická podoba je nejčastější příčinou jejich úmrtí. Mezi nejčastější infekce tohoto druhu patří chronický zánět plic způsobený bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*¹³. Tyto bakterie jsou velice rezistentní na antibiotika, vykazují ochranu před fagocytózou a komplementem¹⁴. Současné možnosti léčby spočívající v podávání vysokých dávek antibiotik, inhalování látek na zředování hlenu či transplantaci plic neposkytují uspokojivé výsledky, proto je snaha o nalezení jiných prostředků léčby.

Pozornost je soustředěna na prevenci těchto infekcí, což může představovat aktivní či (s přihlédnutím na zdravotní stav pacientů) zejména pasivní imunizaci. U pacientů s cystickou fibrózou, potenciálních hostitelů *Pseudomonas aeruginosa*, se však většinou nevyskytuje příliš zdravých jedinců schopných dobré imunitní odpovědi¹⁵. Také u pacientů, které je možno v některých případech podrobit aktivní imunizaci (především v mladším věku a ty jedince, kteří ještě nepřišli do styku s *Pseudomonas aeruginosa*), tento způsob očkování způsobuje zdravotní oslabení. Právě proto by pro pacienty s cystickou fibrózou byla vhodná pasivní imunizace. V případě

tohoto onemocnění by pasivní imunizace mohla být používána k přímé léčbě jako vhodná alternativa k ne příliš účinné antibiotické léčbě.

K pasivní imunizaci jsou však dnes používány protilátky (často králičí), které mají velice podobnou strukturu a tudíž i funkci jako protilátky lidské, důsledkem čehož i u imunizace pasivní dochází shodně jako u aktivní imunizace k aktivaci komplementu a následné tvorbě imunokomplexů, které jsou příčinou zánětlivé reakce i zahušťování hlenu u pacientů s cystickou fibrózou.

Existuje však velký potenciál ve slepičích protilátkách, které nejsou doposud pro tyto účely příliš využívány ačkoliv skýtají mnohé možnosti. Slepičí protilátky získané z vajec mají srovnatelné či v některých ohledech i lepší vlastnosti než savčí protilátky. Slepičí imunoglobuliny jsou značně odlišné od lidských IgG z důvodu větší evoluční vzdálenosti. Slepičí imunoglobulin obdobný lidskému IgG, který se označuje IgY na rozdíl od lidského IgG neaktivuje komplement a tak nenavozuje zánětlivé reakce. Právě proto se slepičí protilátky jeví jako vhodný prostředek pro pasivní imunizaci lidského organismu¹⁶.

1.2.1 Vybrané mikroorganismy pro pasivní imunizaci

Pseudomonas aeruginosa a *Burkholderia cepacia* jsou aerobní gramnegativní bakterie, které se největší měrou podílejí na těžkých plicních onemocněních u osob s cystickou fibrózou.

Pseudomonas aeruginosa může působit infekce různé závažnosti: od kolonizace plic, která nevyvolá imunitní odpověď, až k těžké nekrotizující bronchopneumonii a vzniku chronické infekce¹⁷.

Burkholderia cepacia byla původně známá hlavně jako příčina hniloby cibule (odtud její název), teprve později byl odhalen její poměrně závažný podíl na infekcích při cystické fibróze, který se soustavně zvyšuje¹⁸. Před lety byla prevalence odhadována na 10%, ale dnes se blíží až 40%. Tyto infekce se u některých pacientů liší od pseudomonádových infekcí rychlostí vývoje plicního postižení, výjimkou není septikémie nebo nekrotizující pneumonie¹⁹.

Tak jako jiné bakteriální druhy i *Pseudomonas aeruginosa* má více antigenů, které jsou přímo spojeny s nějakým virulenčním faktorem bakterie²⁰. Mnohé antigeny jsou spojeny s adhesní schopností bakterie, za což jsou zodpovědné povrchové struktury bakterie jako flagella a pili nebo lektiny²¹. Nejvýznamnějšími adhesiny u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (a i u mnohých dalších) jsou flagella a pili. Tyto adhesiny jsou zodpovědné až za 90% adhesivní činnosti bakterie. Schopnost bakterie dobře se adherovat na epiteliální buňky poškozené tkáně je první a základní předpoklad k rozvoji bakteriální infekce následované kolonizací a patologickými změnami hostitelské tkáně. S ohledem na skutečnosti konstatované v tomto odstavci vyplývá, že blokováním důležitých adhečních faktorů zodpovědných za vazebnou schopnost *Pseudomonas aeruginosa* můžeme zabránit adhesi bakterie na cystickou fibrózou poškozené epiteliální buňky.

Na základě současných znalostí o *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* a vzhledem k nesnázím doprovázejících současnou léčbu těchto infekcí, se pasivní imunizace jeví právě jako možný způsob terapie.

2 Cíl práce

Navodit maximální produkci IgY proti bakteriálním imunogenům a vyhodnotit možnosti jejich stabilizace a bezpečnosti jejich použití.

K tomu bylo třeba splnit následující úkoly:

1. Izolovat IgY a v časové závislosti na imunizačních dávkách studovat pomocí metody ELISA produkci specifických protilátek.
2. Se specifickými protilátkami IgY proti *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* studovat ovlivnění růstu těchto bakterií na pevném médiu.
3. Na IgY proti modelovému peptidovému antigenu studovat stabilitu a konzervační chemické prostředky
4. Studovat snášenlivost a imunitní odpověď lidského organismu po nasální a perorální dlouhodobé aplikaci IgY.

3 Materiál a metody

3.1 Příprava a purifikace protilátek IgY

3.1.1 Sběr vajec

Slepice byly chovány v separátních klecích za řízeného osvitového režimu. Vejce byla sbírána každý den a skladována při teplotě 5°C. Před první imunizací byla sebrána kontrolní vejce pro stanovení bazální hladiny protilátek (získána kontrolní frakce).

3.2.1 Imunizace slepice

Slepice byla imunizována třemi dávkami antigenu (0.5ml emulze tvořené CFA či NFA a konjugátem peptidu s KLH rozpuštěným v PBS; připraveno P. Hodkem) vždy po 100µg v týdenních intervalech. V případě imunizace pomocí formaldehydem usmrcených bakterií byly slepice nejprve imunizovány vždy příslušným bakteriálním kmenem ve třech dávkách (vždy 10^{10} buňek/ 0,5 ml PBS) v týdenních intervalech, poté byla imunizace opakována vždy jednou dávkou antigenu v rozmezí 4; 7; 8 a 14-ti měsících od doby první imunizace.

3.1.3 Purifikace protilátek

Jednotlivé frakce protilátek byly připraveny z 2–10 vajec. Žloutek byl oddělen od bílku na separátoru a pod tekoucí vodou dokonale očištěn. Objem získaných žloutků byl odečten v polyethylenovém válci. Žloutky byly v polyethylenové nádobě zředěny 10-ti násobným objemem destilované vody a rozmíchány pomocí magnetického míchadla. Poté bylo pH roztoku sníženo na 5,1 přidávkem 0,1 M HCl. Homogenát byl přes noc zmražen při -20°C. Druhý den byl homogenát rozmražen a filtrován v nálevce přes filtrační papír do odměrného válce. V získaném filtrátu byl rozpuštěn NaCl do výsledné koncentrace 8,76% (w/v) a pH bylo upraveno na hodnotu 4,0 1M HCl. Roztok byl míchán 30 minut na magnetické míchačce a ponechán precipitovat ještě 2

hodiny²². Centrifugací (centrifuga Janetzky K 70D, výkyvný rotor 4x 800 ml) 20 minut při 3000 RPM byl získán sediment. K jeho rozpuštění byl použit pufr PBS (s 0,1% NaN_3), přibližně n ml na 1 žloutek. Získaný roztok protilátek byl skladován při 5°C nebo byl zmražen.

3.1.4 Účinky protilátek na lidský organismus

Frakce těchto protilátek byla připravena z 50 konzumních vajec. Protilátky byly připraveny purifikací (dle bodu 3.1.3, vyjma stabilizace pomocí NaN_3). Takto získané protilátky o koncentraci 19,5 mg/ml byly poté v alikvotech zmraženy. Tyto protilátky byly určeny k přímému podávání v dávkách 20 mg/den v případě nazálního a 50 mg/den v případě perorálního způsobu podání. Nazální podávání probíhalo po dobu 12-ti týdnů, perorální po 4 týdny. Po ukončení užívání IgY byla metodou ELISA sledována přítomnost specifického IgG ve vzorcích odebraných z lidského séra před aplikací IgY a následně po ukončení aplikace IgY.

3.1.5 Stabilizační látky

Všechny látky použité v této práci ke stabilizaci patří do skupiny antiseptik. Antiseptika (remedia) jsou látky zabraňující vývoji a množení mikrobů. Remedia, dnes užívaná jako desinfekční prostředky, je snaha používat relativně netoxická a minimálně dráždivá. K chemické desinfekci se používají organické kyseliny a zásady, organické látky jako jsou alkoholy, aldehydy a ketony, deriváty fenolu a krezolu, deriváty halogenů, sloučeniny těžkých kovů, kvarterní amonné báze²³.

Námi vybrané stabilizační látky byly²⁴:

- kyselina benzoová, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, jednosytná organická kyselina
- kyselina sorbová $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$ (kyselina 2,4 – hexadienová)
- Septonex, $\text{C}_{12}\text{H}_{44}\text{BrNO}_2$ [1-(ethoxykarbonyl) pentadecyl] trimethyamoniumbromid, organická sloučenina, patří mezi skupinu tenzidů (kvarterních amoniových bází), působí jako povrchově aktivní desinfekční látka

- Ajatin, $C_{21}H_{38}BrN$, N,N-dimethyl-N-benzyl-N-dodecylamoniumbromid, organická sloučenina, patří mezi skupinu tenzidů (kvarterních amoniových bází), působí jako povrchově aktivní desinfekční látka
- Lysozym- relativně malý enzym patřící do skupiny hydroláz štěpících peptidoglykan (štěpí polysacharidové složky buněčných stěn respektive štěpí glykosidickou vazbu mezi N-acetylglukosaminem a N-acetylmuramidovou kyselinou), bývá izolován z vaječných bílků, je složen z jednoho polypeptidového řetězce o 129 AMK, jeho $M_r=14\ 600$
- methyl-paraben, $C_8H_8O_3$ (methylester kyseliny 4-hydroxybenzoové), organická sloučenina
- azid sodný, NaN_3 - tlumí oxidativní fosforylaci bakterií
- Thiomersal, $C_9H_9HgNaO_2S$, 2-(ethylmerkuri-thio)benzoan sodný, patří mezi organické sloučeniny rtuti, nejčastěji je užíván ke konzervaci očkovacích sér, jeho nevýhodou je toxicita zapříčiněná přítomností Hg
- kyselina boritá, H_3BO_3 (kyselina trihydrogenboritá)

3.1.6 Studium stability IgY

Stabilita izolované protilátky, byla posuzována z více směrů. Jedním z hledisek bylo pozorování změny aktivity IgY vlivem působení lyofylizace, zmražení a teplot ($37^\circ C$, $5^\circ C$) při dlouhodobých expozicích.

Druhým hlediskem bylo posuzování aktivity IgY při dlouhodobém uchovávání v přítomnosti různých stabilizačních látek.

Pro tyto experimenty byla používána „zásobní“ protilátka IgY získaná spojením frakcí č.1 a č.2 (viz. tabulka 1., str. 29), o výsledné koncentraci 20 mg/ml. Tato protilátka nebyla stabilizována azidem. Ze „zásobní“ IgY byly připraveny vzorky s obsahem 0,1% azidu (přidán pevný NaN_3), které byly umístěny do termostatu ($37^\circ C$), lednice ($5^\circ C$), zmrazeny a lyofylizovány. Pro srovnání byly ze „zásobní“ IgY odebrány vzorky (neobsahující azid), umístěné do termostatu ($37^\circ C$) a lednice ($5^\circ C$). Ve zvolených intervalech (v průběhu 1-28 dní) byly u těchto vzorků sledovány aktivity IgY metodou ELISA .

Pro sledování dlouhodobých expozií IgY v přítomnosti stabilizačních látek byla použita „zásobní“ IgY po lyofylizaci (1g IgY odpovídá 1,9g lyofylizátu). K roztoku IgY připravenému z lyofylizované IgY (20mg IgY v 10ml PBS-ELISA) byly přidány roztoky stabilizačních látek, jejichž pH bylo upraveno na hodnotu 7,2. Koncentrace roztoku IgY a stabilizačních látek byly připraveny ve dvojnásobné koncentraci, tak aby po jejich vzájemném smísení v poměru 1:1 byla získána IgY o koncentraci 10mg/ml a koncentrace stabilizačních látek jak je uvedeno níže:

- kyselina benzoová - 0,2 %
- Septonex - 0,05%
- kyselina sorbová - 0,08%
- Ajatin - 0,5%
- lysozym - 1mg/ml
- methylparaben - 3g/ml
- azid - 0,1%
- Thiomersal - 0,01%
- kyselina boritá - 1,7%

Koncentrace stabilizačních látek (kromě azidu sodného) byly voleny, tak aby odpovídaly koncentracím běžně užívaným v humánní medicíně či potravinách.

3.2 Analytické metody

3.2.1 Stanovení koncentrace proteinů

Vzorek IgY (cca 200 μ l) byl centrifugován 5 min. při 13000 otáčkách (centrifuga SANYO). 50 μ l supernatanu bylo zředěno 2,5 ml PBS pufru. Z absorbance měřené při 280 nm proti PBS byla určena koncentrace proteinu (K) ve vzorku podle vzorce:

$$K = A_{280} \cdot n \cdot 1,094$$

kde n je zředění.

3.3 Imunochemické metody

3.3.1 ELISA

Jedná se o imunochemickou metodu založenou na specifické interakci mezi protilátkou a antigenem zakotveném na nosiči. Po vzniku komplexu antigen protilátka se na protilátku váže sekundární protilátka s kovalentně vázaným enzymem (alkalickou fosfatázou nebo peroxidázou), který reaguje s chromogenním substrátem a poskytuje barevný produkt.

Jako antigen byl buď použit modelový peptid o sekvenci (LDRRVPIPVDRSCGG), nebo formaldehydem usmrcené bakteriální buňky či IgY. Antigen (modelový peptid) byl naředěn imobilizačním pufrem (13 mM Na₂CO₃, 25 mM NaHCO₃, pH = 9,6) na koncentraci 4 µg/ml.

Antigen (formaldehydem usmrcené bakteriální buňky) byl připraven tzv. metodikou CELISA (suspenze bakteriálních buněk byla naředěna imobilizačním pufrem na koncentraci 10⁷ buněk/ml, takto zředěný roztok antigenu byl po 100 µl aplikován do každé jamky, poté byla mikrotitrační deska centrifugována (Centrifuga Janetzky- K 70 D) 15 minut při 2 000 RPM, po přidání 150 µl CH₃CH₂OH do každé jamky byla deska centrifugována při stejných otáčkách 10 minut, po centrifugaci byl CH₃CH₂OH odstraněn a místo něj bylo do jamek aplikováno 150 µl CH₃OH, deska pak byla naposledy centrifugována při 2 000 RPM. Po odstranění CH₃OH z jamek vyklepnutím byla mikrotitrační deska sušena 30 minut při laboratorní teplotě). Takto byla deska připravena k dalšímu použití.

Poté bylo do každé jamky aplikováno 100 µl zředěného roztoku antigenu a přes noc ponecháno při 5°C. Druhý den byl antigen odstraněn a jamky byly promyty pětkrát po sobě 200 µl PBS-Tween 20 (PBS obsahující 0,1% (v/v) Tween 20). Poté byla každá jamka blokována 150 µl blokovacího roztoku (2% (w/v) řídký bílek v PBS-Tween 20) a inkubována 1 hodinu při 37°C. Po odstranění blokovacího roztoku byly jamky pětkrát promyty 200 µl PBS-Tween 20. Vzorke protilátek byly naředěny PBS-ELISA pufrem (134 mM NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 0,4 mM Na₂H₂PO₄ x 12 H₂O). Pro stanovení aktivity protilátek v jednotlivých frakcích byly vzorky naředěny

geometrickou řadou na koncentrace v rozmezí 90-0,1 µg/ml. U ELISY, kdy byly jako antigen použity usmrcené bakterie, byly vzorky naředěny na koncentraci 30 µg/ml. V případě ELISY, kdy byla jako antigen použita IgY, byly ředěny vzorky lidského séra v poměru 1:1, 1:10, 1:100 a 1:1000.

Do příslušných jamek se aplikovalo 100 µl naředěné protilátky. Inkubace probíhala 2 hodiny při 37 °C. Po odstranění protilátky a důkladném promytí jamek (pětkrát PBS-Tween 20) byla do všech jamek aplikována sekundární protilátka (Rabbit IgG Anti-Chicken, konjugát s alkalickou fosfatázou, od firmy Sigma) naředěná PBS-ELISA pufrem v poměru 1 : 1500 a v případě IgY antigenu (zvířecí protilátka anti-IgG, konjugát s peroxidázou, od firmy VIDIA) naředěná PBS- ELISA pufrem v poměru 1:101. Po hodinové inkubaci při 37 °C byla odstraněna sekundární protilátka a každá jamka opět 5 krát promyta PBS-Tween 20. Poté bylo do všech jamek aplikováno 100 µl čerstvě připraveného vyvolávacího roztoku (30 mM NaHCO₃, 20 mM Na₂CO₃, 1 mM MgCl₂, 0,1% v/v p-nitrofenylfosfát). Vyvolávací roztok o složení (0,2 M Na₂HPO₄, 0,1 M C₅H₆O₅COOH, 0,25 ml 30% H₂O₂, 0,001% v/v 2,2'-azino-bis(3-ethylenbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)) byl použit pro peroxidázou značenou sekundární protilátku. Mikrotitrační deska byla inkubována přesně 15-30 minut při laboratorní teplotě a poté byla reakce přerušena přidávkem 50 µl 3 M NaOH (v případě ELISY s IgY antigenem přidávkem 50 µl 1% SDS). Nakonec byla změřena absorbance při 405 nm proti vzorku v jamce, která neobsahovala primární protilátku (blank). Měření bylo prováděno na čtečce ELISA(EL_x800) s filtrem 405 nm. Titr odpovídá koncentraci protilátky, při níž lze ještě naposledy odlišit vyvolané zbarvení v jamce od pozadí (kontrolní protilátky).

3.4 Elektrochemické metody

3.4.1 Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis- elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecyl sulfátu sodného

Elektroforéza je metoda pro dělení proteinů za použití elektrického pole na polyakrylamidovém gelu jako podporném mediu a dodecyl sulfátu sodného jako

aniontového detergentu. SDS denaturuje proteiny a uděluje polypeptidu negativní náboj. Tudíž, migrace proteinů není závislá na okamžitém náboji polypeptidu, ale na jeho molekulové hmotnosti²⁵.

Před vlastní elektroforézou byly připraveny tyto roztoky:

Pufr A: 0,375 M Tris; pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS

Polymerační roztok A: 30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) BIS, v pufru A

Pufr B: 0,125 M TRIS; pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,0006% (w/v) bromfenolová modř

Polymerační roztok B: 30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) BIS, v pufru B

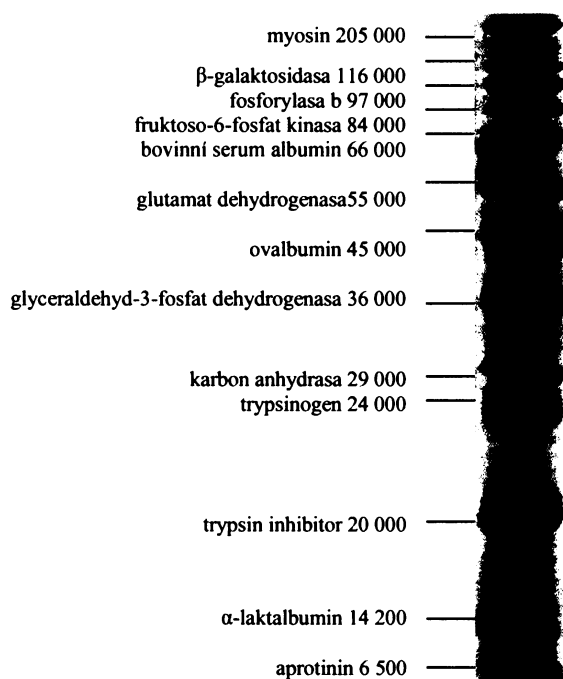
Vzorkový pufr: 0,063 M Tris, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-merkaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0,003% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

Elektrodový pufr: 0,129 M glycin, 0,025 M Tris; pH 8,3; 0,1% (w/v) SDS

Barvicí lázeň: 1,25 g Coomassie brilliant blue R-250, 270 ml ethanol, 45 ml octová kyselina, destilovaná voda do 500 ml

Odbarvovací lázeň: 500 ml ethanol, 200 ml octová kyselina, destilovaná voda do 2 l

SigmaMarker Wide Range (širokého rozpětí): (viz. Obr. 2)



Obr. 2 - SigmaMarker Wide Range (širokého rozpětí)

Separáčnı gel 7,5%: 12 ml pufr A, 4 ml polymeračnı pufru A, 10 μ l TEMED, 3 mg persıran sodnı

Velkopórovı gel 4%: 9 ml pufr B, 1ml polymeračnı roztok B, 10 μ l TEMED, 3 mg persıran sodnı

Sada dvou skleněných destiček (10x10,5 cm) se sadou spacerů (síly 1 mm) umístěných mezi skla. Separáčnı gel byl aplikován mezi obě skla, ihned převrstven destilovanou vodou a nechán stát 30 minut při pokojové teplotě.

Voda byla po zpolymerování gelu odstraněna a na separáčnı gel byl nalit polymeračnı roztok B pro přípravu 4% velkopórového gelu. Mezi skla byl vsunut zásuvnı pásek pro přípravu aplikačnıch jamek, tak aby ve velkopórovém gelu nevznikly bublinky. Po zpolymerování gelu byl hřeben vyndán a skleněné desky s gelem se umístily do elektroforetické vany. Do hornıho a spodnıho elektrodového prostoru vany byl nalit elektrodovı pufr.

Jednotlivé vzorky se naředily vzorkovım pufrı v poměru 1:1 a po dobu 5 minut byly inkubovány při teplotě 100 °C.

Do každé jamky vzniklé použitım hřebenu (obsahujıcı elektrodovı pufr) bylo podvrstvenım aplikováno po 20 μ l naředěného vzorku nebo SigmaMarkeru.

Po nanesenı všech vzorků byla elektroforetická vana připojena ke zdroji stejnosměrného napětı (150 V). Elektroforéza probıhala přibližně po dobu 2 hodin. V momentě kdy čelo bromfenolové modře doputovalo ke spodnımu okraji desky, byla elektroforéza ukončena. Skleněné desky s gelem byly vyjmuty z elektroforetické vany a gel se opatrně přenesl na 1 hodinu do barvıcı lázně. Poté se gel přenesl do odbarvovací lázně, kde byl ponechán přes noc.

3.5 Mikrobiologické techniky

3.5.1 Izolace subcelulární frakce bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Subcelulární frakce bakterií *Pseudomonas aeruginosa* byla připravena z 20 ml suspenze formaldehydem usmrcených bakterií. Suspenze byla v kádince zředěna 9-ti násobným objemem pufru PBS bez přídavku azidu. Poté byla mixována po dobu 1 minuty (se 4 přestávkami) v mixéru. Homogenát byl centrifugován (centrifuga Janetzky K 24) 15 minut při 13 000 RPM (otáčky za minutu). Takto získaný supernatan byl ještě dále centrifugován (centrifuga Beckmann Coulter™, Optima™ LE- 80K) 3 hodiny při 40 000 RPM. Ultracentrifugací získaný sediment byl rozsuspendován s minimálním množstvím pufru PBS. Získaný vzorek subcelulární frakce byl zmražen při -20°C.

3.5.2 Ovlivnění růstu *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*

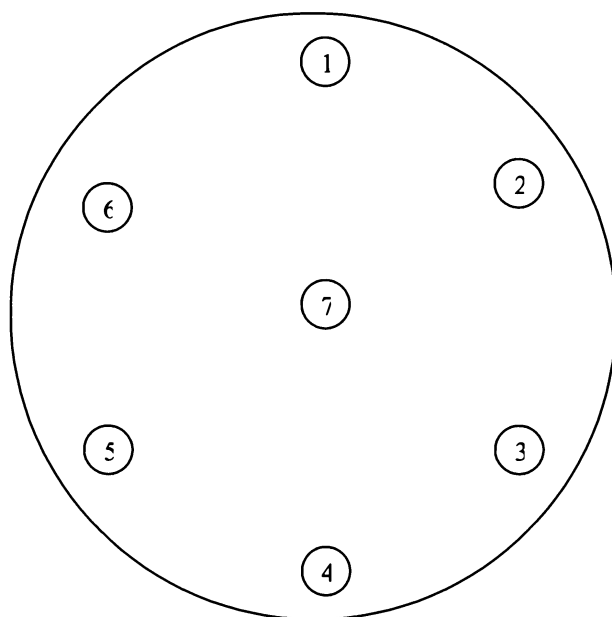
Bylo sledováno ovlivnění růstu bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* specifickými protilátkami IgY.

Pro tyto účely byly použity IgY vykazující nejvyšší obsah specifických protilátek vůči odpovídajícímu bakteriálnímu kmenu (viz. Obr.3, str.31). Tyto protilátky byly získány po předchozí imunizaci slepice pomocí formaldehydem usmrcených bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (sbírkový kmen), *Burkholderia cepacia* a bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (získané od pacienta s cystickou fibrózou).

Všechny protilátky byly stabilizovány azidem sodným a proto musely být dialyzovány, aby byl eliminován případný vliv samotného azidu na bakteriální růst. Současně s protilátkami byl dialyzován i roztok azidu sodného (pufr PBS s 0,1% NaN₃), jehož výchozí koncentrace byla shodná s koncentrací azidu sodného, kterou obsahovaly IgY ke své stabilizaci. Dialýza probíhala v pufru PBS (dialyzačním pufru) po dobu 24 hodin, přičemž v průběhu dialýzy došlo k jedné výměně pufru.

Koncentrace každé z těchto protilátek byla po dialýze převedena na výslednou koncentraci 10 mg/ml a pomocí sterilního bakteriálního filtru o velikosti pórů 0,22 µm přefiltrována.

Před vlastním pokusem byly bakterie přeočkovány na agarové plotny. Z takto připraveného inokula (exponenciální růst) byly odebrány vzorky pro sledování růstu bakterií na pevném živném médiu. Jako pevné živné médium byly použity bakteriální plotny s agarem (v 1L média: 16g peptonu, 10g enzymatického kaseinového hydrolyzátu, 10g K_2SO_4 , 1,4g $MgCl_2$, 11g agaru, 4g glukózy), které byly pomocí bakteriální hokejky pokryty po celé své ploše suspenzí příslušného bakteriálního kmene. Do agaru takto připravené plotny byly vytvořeny jamky, do nichž byla aplikována vždy příslušná IgY o koncentraci 10 mg/ml v objemu 0,05 ml, 0,1 ml a 0,2 ml. Jako kontrola byla vždy do jedné jamky nanесena IgY, která byla získána ještě před imunizací slepice (kontrolní frakce protilátek), dále jedna jamka zůstala prázdná a do posledních dvou byl nanесen roztok retinátu azidu sodného či dialyzátu (pufr PBS z dialýzy) v objemu 0,1 ml (viz. Obr. 4). Po nanесení všech vzorků do jamek, byly plotny inkubovány v termostatu při 37°C po dobu 48 hodin.



Obr. 4 - Bakteriální plotna s nanесenými vzorky

- | | |
|--|---|
| 1- IgY o objemu 0,05 ml | 5- roztok dialyzátu PBS o objemu 0,1 ml |
| 2- IgY o objemu 0,1 ml | 6- kontrolní IgY o objemu 0,15 ml |
| 3- IgY o objemu 0,2 ml | 7- prázdná jamka |
| 4- roztok retinátu NaN_3 o objemu 0,1 ml | |

3.6 Použité chemikálie

Kyselina benzoová - Kulich OTR, Hradec Králové, ČR

Methyl-paraben - Kulich OTR, Hradec Králové, ČR

Septonex – Galena a.s., Opatov-Komárov, ČR

Kyselina sorbová - Hlubna, Brno, ČR

Ajatin - Profarma-Produkt s.r.o., ČR

Azid sodný - Fluka, Germany

Tween 20 - Fluka, Germany

Coomasie Brilliant Blue G- 250 - Fluka, Germany

4-nitrophenyl phosphate disodium salt - Fluka, Germany

Akrylamid, N,N-methyl-bis akrylamid, Triton X-100, TEMED – Serva, Germany

IgG, Anti Chicken Antibody developed in rabbit, konjugát s alkalickou fosfatázou - Sigma, USA

Anti- IgG, zvířecí protilátka proti lidskému IgG, konjugát s peroxidázou- VIDIA s.r.o., ČR

2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid), tablety - Sigma, USA

Kompletní a nekompletní Freundovo adjuvans - Sigma, USA

SigmaMarker™ (Wide Range) - Sigma, USA

Sodium merthiolate - Ubichem Limited, USA

Lysozym – izolován Doc.RNDr. Hodkem, PřF UK.

Chlorid sodný, hydroxid sodný, kyselina boritá, hydrogen fosforečnan sodný, dihydrogen fosforečnan sodný, chlorid hořečnatý, kyselina citronová, síran – všechny tyto chemikálie byly od firmy Lachema, Brno, ČR.

3.7 Použité přístrojové vybavení a pomůcky

Immuno Modules, mikrotitrační deska Maxisorb - NUNC, Dánsko

Immuno Modules, mikrotitrační deska Polysorb - NUNC, Dánsko

Spektrofotometr HP 8453 E - Hewlett Packard

Spektrofotometr EL_x 800 (čtečka mikrotitračních desek) - BioTek

Spektrofotometr Sunrice remote (čtečka mikrotitračních desek) - TEKAN, Austria

Elektrické míchadlo MS 2 Minishaker - IKA®

Míchačka Variomag - Monotherm

Inkubátor, Incubator Gallenkamp - SANYO, UK

Centrifuga MS - SANYO, UK

Ultrazvuk, Ultrasonic compact cleaner - TESLA, ČR

Analytické váhy 40 SM - PESA

Předvážky EW 600 - KERN

pH metr model 370 - ATI Orion

Mixér ETA 0010 - ETA, ČR

Centrifuga K 70 D – JANETZKY, Germany

Ultracentrifuga BECKMAN COULTER™- Optima™ LE- 80K Ultracentrifuge, USA

Spritzenfilter - ROTILABO®, sterilní antimikrobiální filtr PVDF – Carl Roth GmbH + Co KG, Germany

4 Výsledky

4.1 Izolace a charakterizace protilátek IgY

4.1.1 Imunizace slepice a izolace protilátek

Z vajec získaných před imunizací byla vždy izolována kontrolní frakce protilátek s cílem připravit frakci v níž se ještě nepromítne reakce na podaný antigen. Poté byla slepice subkutánně imunizována třemi dávkami v týdenním intervalu obsahujícími vždy 100µg peptidového konjugátu nebo 10^{10} usmrcených bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*. V případě bakteriálních antigenů byla imunizace 4-krát opakována, vždy jednou dávkou antigenu, v rozmezí 4; 7; 8 a 14-ti měsíců od doby první imunizace. Vejce byla rozdělena do příslušných frakcí (viz. tabulka 1 a 2, str. 29). Z každé frakce byla popsáním způsobem izolována IgY a stanovena celková koncentrace proteinu dle změřené absorbance při 280 nm. Po imunizaci peptidovým konjugátem byly získány 3 frakce (1 kontrolní) IgY (viz. tabulka 1, str. 29). Po imunizaci usmrcenými bakteriálními kmeny bylo celkem získáno (za dobu 23 měsíců) 8 frakcí (z čehož 1 kontrolní) po imunizaci *Pseudomonas aeruginosa* (sbírkovým kmenem), 8 frakcí (z čehož 1 kontrolní) po imunizaci *Pseudomonas aeruginosa* (izolovaná z plic pacienta s cystickou fibrózou) a 8 frakcí (z čehož 1 kontrolní) po imunizaci *Burkholderia cepacia* (viz. tabulka 2, str. 29).

Z konzumních vajec byla izolována frakce, která obsahovala 4,8 g protilátky IgY o koncentraci 19,53 mg/ml. Dále byla využita k dalším experimentům (ke sledování účinků při užívání IgY).

Tabulka 1: Imunizace slepice pomocí peptidového konjugátu a izolace protilátek IgY

frakce	datum sběru vajec	koncentrace Ig Y [mg/ml]
kontrolní	15.5.- 22.5.	6,5
č. 1	8.7.- 31.7.	23,5
č. 2	5.8.- 31.8.	16,5

Legenda: Imunizace byla provedena 22.5., 29.5., 5.6..

Tabulka 2: Imunizace slepice bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* a izolace protilátek IgY

Frakce	PA		BC		PA-CF	
	datum sběru vajec	koncentrace IgY [mg/ml]	datum sběru vajec	koncentrace IgY [mg/ml]	datum sběru vajec	koncentrace IgY [mg/ml]
kontrolní	5.2003	41,6	5.2003	31,2	5.2003	13,5
č. 1	9.2003	27,8	8.2003	30,2	9.2003	29,8
č. 2	12.2003	59,5	12.2003	55,7	12.2003	38,7
č. 3	4.2004	41,8	4.2004	47,8	4.2004	28,8
č. 4	6.2004	24,1	6.2004	42,4	7.2004	32,4
č. 5	10.2004	29,9	10.2004	43,7	10.2004	36,3
č. 6	1.2005	50,8	1.2005	62,7	1.2005	66,7
č. 7	8.2005	28,1	8.2005	33,5	8.2005	47,2

Legenda: Imunizace byla provedena 22.5.03, 29.5.03, 5.6.03 a dále 14.10.03, 14.1.04, 27.2.04, 10.8.04.

PA- imunizace slepice pomocí sbírkového kmene *Pseudomonas aeruginosa*

BC- imunizace slepice pomocí bakteriálního kmene *Burkholderia cepacia*

PA-CF- imunizace slepice pomocí kmene *Pseudomonas aeruginosa* izolovaného z dýchacích cest pacienta s cystickou fibrózou

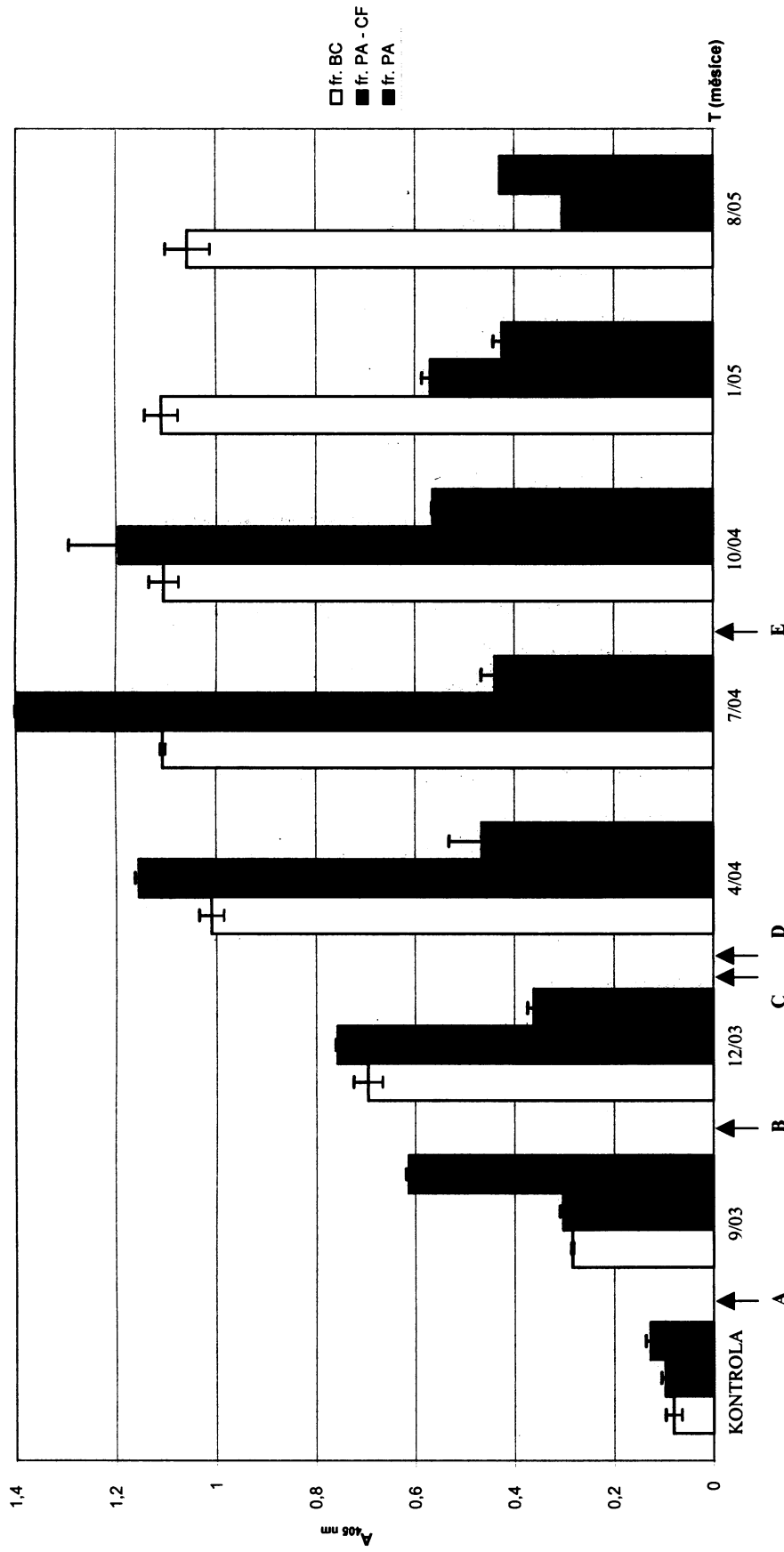
4.1.2 Stanovení specifických protilátek proti modelovému peptidu ELISA testem

Přítomnost specifické protilátky IgY v izolovaných frakcích č.1 a č.2 byla ověřena metodou ELISA, při ředění IgY v intervalu koncentrací 9,0-0,1 μ g/ml. Za těchto podmínek byl stanoven titr jako nejnižší koncentrace IgY, při níž je ještě možno reaktivitu specifické protilátky odlišit od pozadí (kontrolní protilátka). Titr frakce č.1 byl 0,3 μ g/ml, titr frakce č.2 byl 1 μ g/ml. Z toho vyplývá, že imunitní odpověď v čase klesá.

Na základě titru lze konstatovat, že obě frakce obsahují dostatečné množství specifické protilátky IgY. Tudíž mohly být pro další experimenty spojeny. Tato spojená frakce obsahovala 780 mg protilátky IgY o koncentraci 20 mg/ml.

4.1.3 Stanovení specifických protilátek po imunizaci suspenzí bakteriálních buněk ELISA testem

Přítomnost specifické protilátky IgY v triádě izolovaných frakcích č.1 až č.7 získaných v průběhu 23 měsíců byla ověřena metodou ELISA, při počáteční koncentraci ředění IgY 30 μ g/ml pro aplikaci na mikrotitrační desku. Za těchto podmínek bylo možno vysledovat změny v aktivitě izolované protilátky IgY na základě použitého antigenu a jeho schopnosti vyvolat tvorbu protilátek u imunizovaného zvířete (slepice) v průběhu daného časového období. Výsledek ELISA testu je na obrázku 3, strana 31.



Obrázek č. 3: Sledování obsahu specifických IgY s ohledem na použitý antigen (bakteriální kmen) a době imunizace metodou ELISA

fr. BC – aktivita frakce IgY po imunizaci bakterií *Burkholderia cepacia*

fr. PA-CF – aktivita frakce IgY po imunizaci bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (z dýchacích cest pacienta s cystickou fibrózou)

fr. PA – aktivita frakce IgY po imunizaci bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (sbírkového kmene)

Koncentrace antigenu použitého na ELISA byla 10^7 buněk/ml Koncentrace IgY nanášených na desku byla $30\mu\text{g/ml}$.

KONTROLA – preimunní IgY; A – 6/03 podána 1. imunizační dávka (udržovací); B – 10/03 podána 2. imunizační dávka (udržovací); C – 1/04 podána 3.

imunizační dávka (udržovací); D – 2/04 podána 4. imunizační dávka (udržovací); E – 8/04 podána 4. imunizační dávka (udržovací).

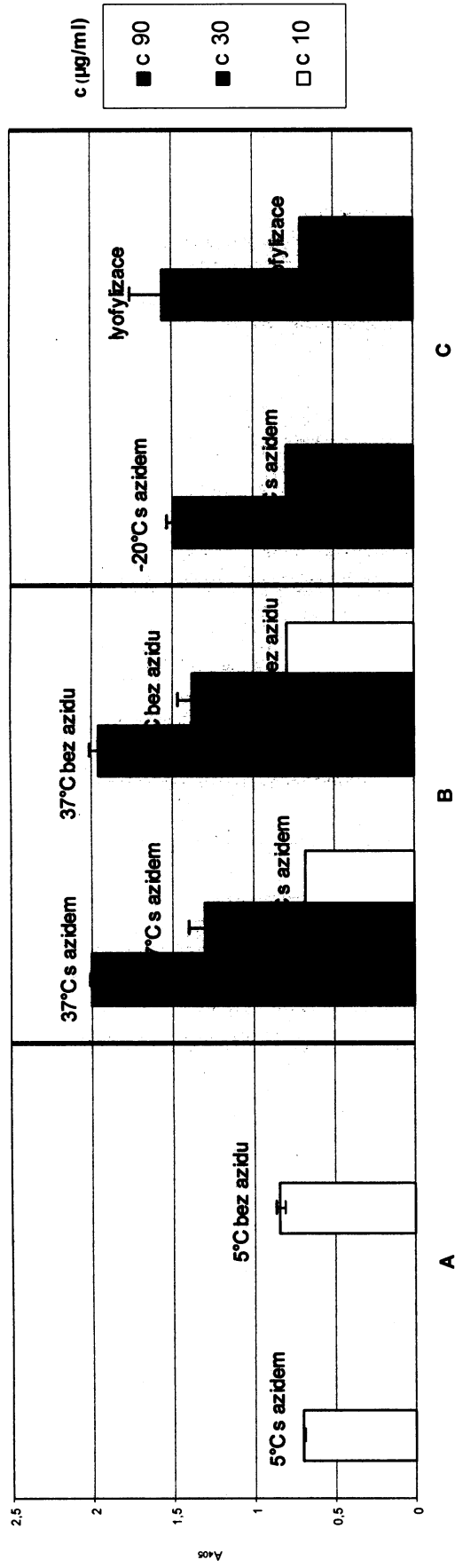
4.2 Sledování stability protilátky IgY

Stabilita izolované protilátky byla posuzována z více směrů. Jedním z hledisek bylo pozorování změny aktivity protilátky IgY vlivem zmražení, lyofylizace a působení teplot při dlouhodobých expozicích (37°C, 5°C). Druhým hlediskem bylo posuzování stability protilátky IgY při jejím dlouhodobém uchování v přítomnosti různých stabilizačních látek. Aktivita IgY byla sledována metodou ELISA.

4.2.1 Teplotní vlivy na aktivitu protilátky IgY

Při této studii byl porovnáván rozdíl ve stabilitě protilátky IgY za antimikrobiálního působení azidu a v nepřítomnosti této látky při vystavení teplotním vlivům. V první části (fázi) byla protilátka zmrazena, lyofylizována nebo ponechána po dobu dvou dní při teplotách (5°C či 37°C). Poté byla její aktivita zjišťována metodou ELISA (ředění IgY bylo v intervalu koncentrací 90-10µg/ml). Výsledek ELISA testu je znázorněn na obrázku 5, strana 33.

V druhé fázi experimentů byly protilátky (s azidem a bez této stabilizační látky) umístěny do termostatu (37°C) a v průběhu 28 dní (respektive 2.,3.,7. a 28. den) byly odebírány vzorky IgY. Po dobu mezi odebráním posledního vzorku IgY byly vzorky uchovávány zmrazené. Nakonec byla u všech vzorků sledována aktivita IgY pomocí metody ELISA. Protilátky byly nanášeny v rozmezí 90-3,3µg/ml. Výsledek testu je na obrázku 6, strana 34.



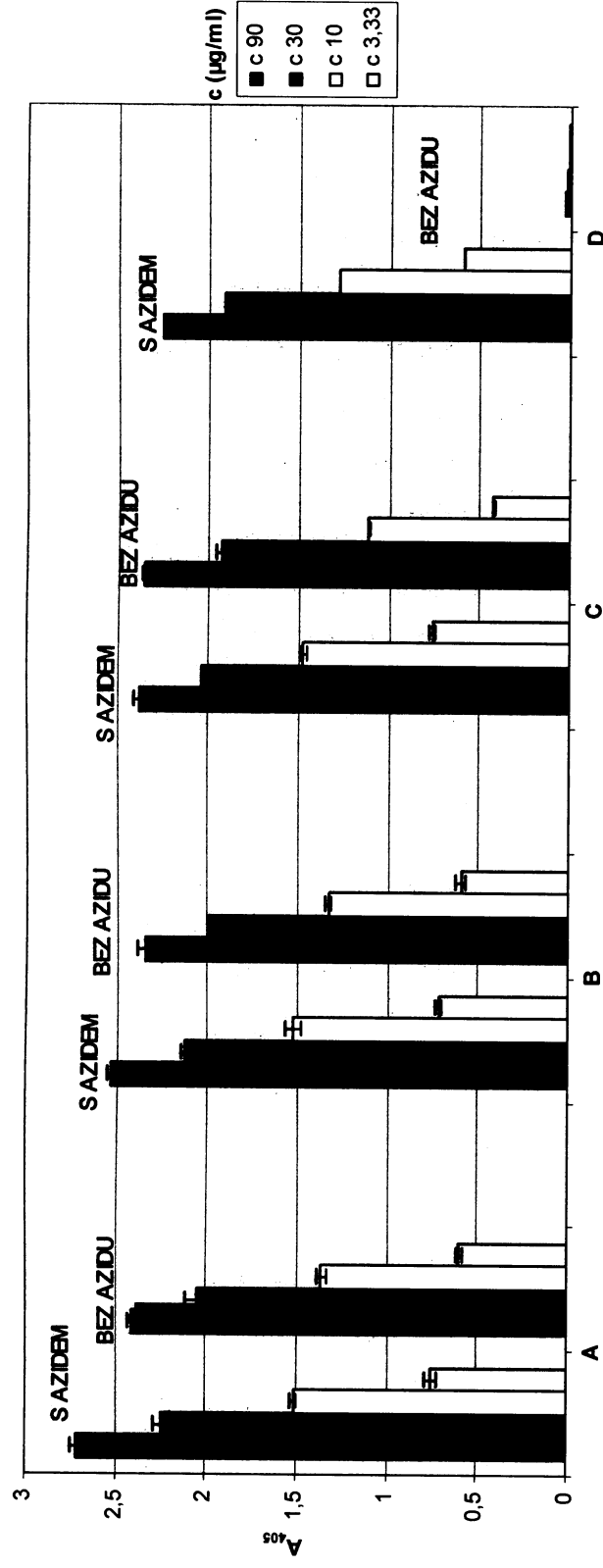
Obrázek č. 5: Sledování aktivity IgY (za přítomnosti či nepřítomnosti azidu sodného) při působení teplotních vlivů metodou ELISA

A – aktivita IgY po 2 dnech uchovávání při 5°C

B – aktivita IgY po 2 dnech uchovávání při 37°C

C – aktivita IgY po lyofylizaci či po 2 dnech uchovávání při -20°C

Od uvedených hodnot je již odečtena absorbance kontrolní frakce . Koncentrace použitého antigenu byla 4µg/ml.



Obrázek č. 6: Sledování aktivity IgY v průběhu 28 denní inkubace při 37°C (za přítomnosti azidu sodného nebo bez něj) metodou ELISA.

A – aktivity IgY po 2 dnech inkubace v 37°C

B – aktivity IgY po 3 dnech inkubace v 37°C

C – aktivity IgY po 7 dnech inkubace v 37°C

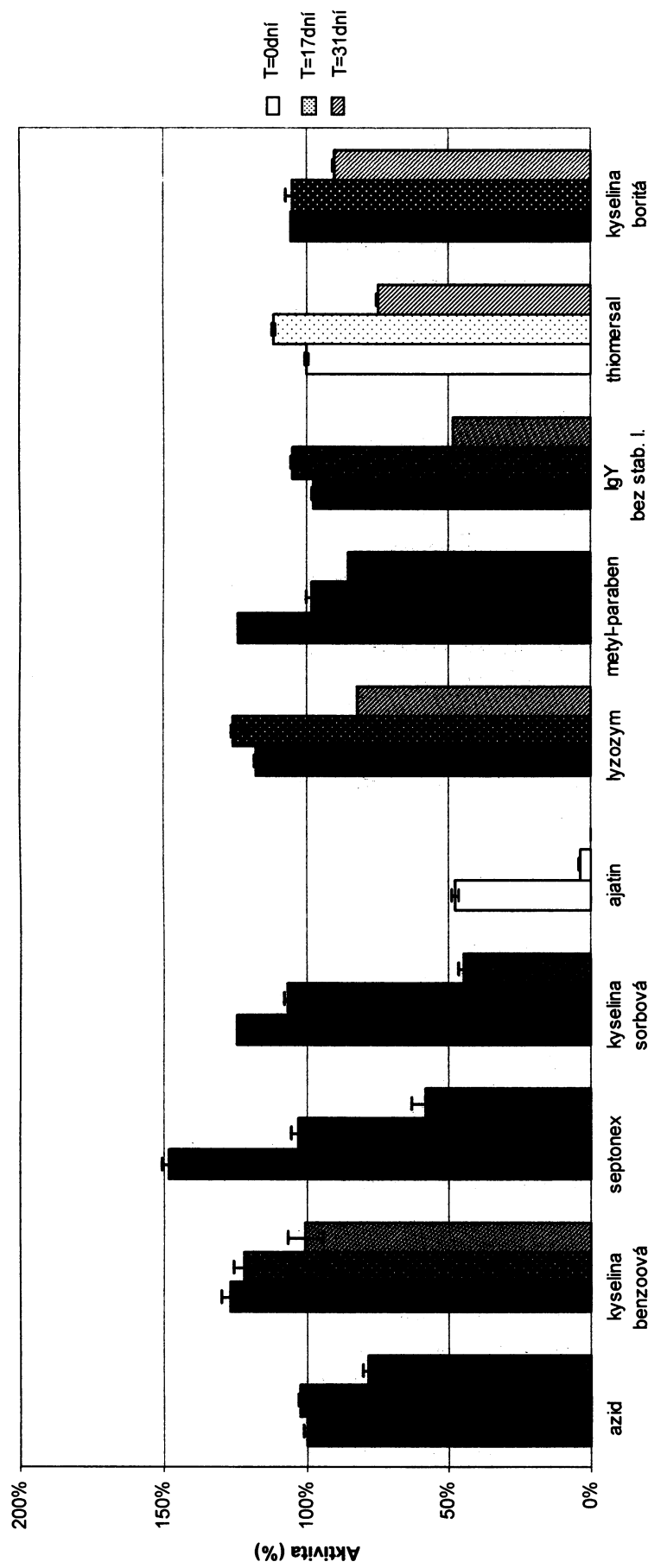
D – aktivity IgY po 28 dnech inkubace v 37°C

Od uvedených hodnot je již odečtena absorbance kontrolní frakce. Koncentrace použitého antigenu byla 4 µg/ml.

4.2.2 Vlivy stabilizačních látek na aktivitu protilátky IgY

Zde byl porovnáván vliv různých stabilizačních látek na aktivitu protilátky IgY při jejím dlouhodobém uchování v termostatu při 37°C. Jako standard pro všechna ELISA stanovení byla používána protilátka stabilizovaná azidem, která byly v alikvotech zmrazena a uschována při -20°C. Aktivita tohoto roztoku byla považována za 100% a k ní byly aktivity všech vzorků přepočítávány.

Před uložením IgY s příslušnými stabilizačními látkami (roztok IgY a stabilizační látky) do termostatu bylo od všech vzorků odebráno po 50 μ l (vzorky z T = 0 dní) a uschováno při -20°C. Další vzorky IgY byly odebrány 17. a 31.den po umístění do termostatu. V odebraných vzorcích byly metodou ELISA sledovány změny aktivity protilátky IgY s ohledem na použitou stabilizační látku a dobu inkubace. Odebrané vzorky IgY byly nanášeny v rozmezí 90-10 μ g/ml na mikrotitrační destičku. Výsledek ELISA testu je na obrázku 7, strana 36. Jako nejvhodnější byla pro porovnávání aktivity IgY mezi jednotlivými vzorky (odebranými 0., 17., a 31. den inkubace) zvolena koncentrace IgY 10 μ g/ml.



Obrázek č. 7: Sledování změny aktivity IgY s ohledem na použitou stabilizační látku a dobu inkubace (při 37°C) metodou ELISA.

T = 0 dní – aktivita IgY 0 dní po inkubaci

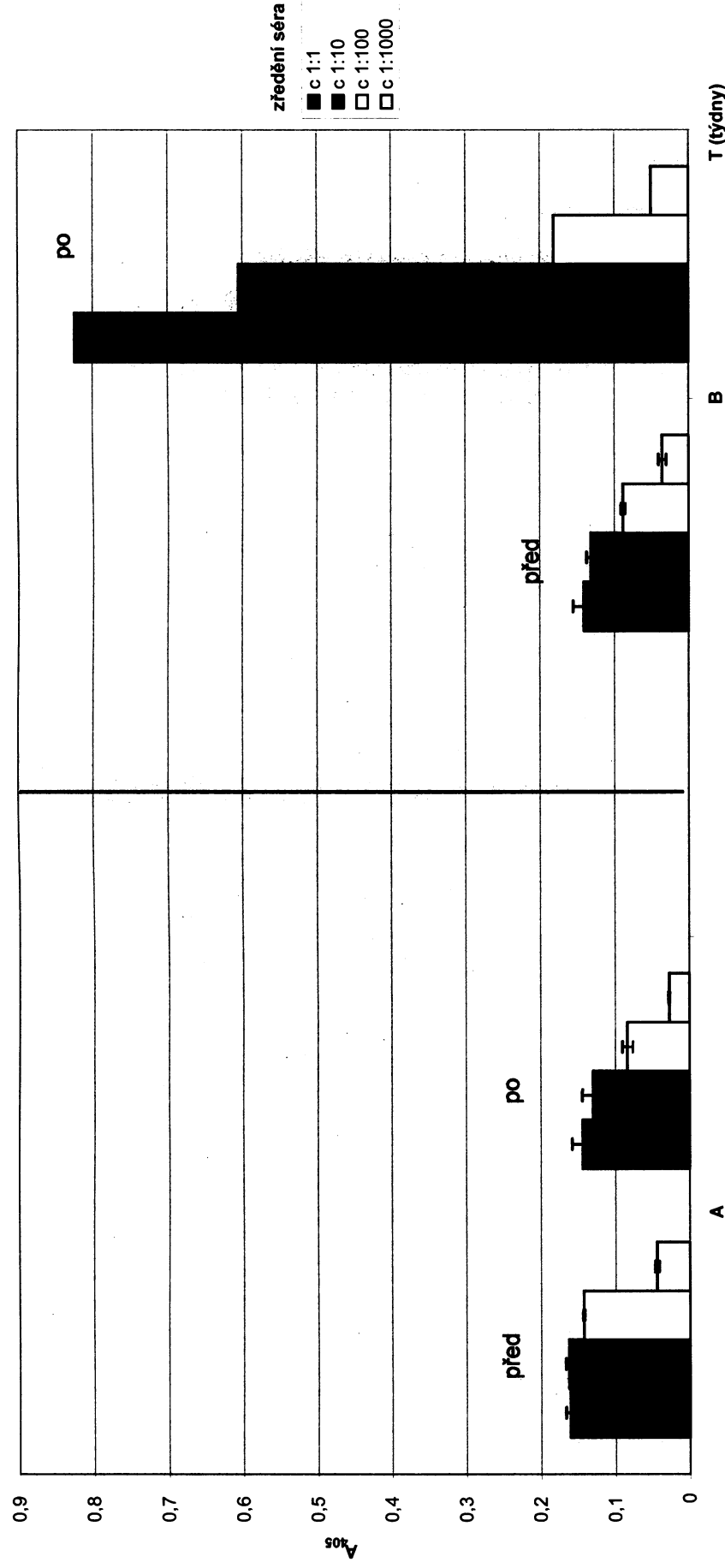
T = 17 dní – aktivita IgY 17 dní po inkubaci

T = 31 dní – aktivita IgY 31 dní po inkubaci

Od uvedených hodnot je již odečtena absorbance kontrolní frakce. Koncentrace použitého antigenu byla 4µg/ml. Jako standard pro všechny ELISA testy byl použit roztok IgY a azidu, jehož aktivita byla vždy stanovena jako 100% a k ní byly aktivity všech vzorků přepočítávány.

4.3 Sledování účinku IgY při jejím podávání na lidský organismus

Pro posouzení vlivu podávané slepičí protilátky IgY na tvorbu specifické protilátky IgG jako imunitní odpovědi lidského organismu na pasivní imunizaci byla použita metoda ELISA. Ve vzorcích lidského séra před a po pasivní imunizaci byla sledována aktivita specifické protilátky lidské IgG. Zvýšení hladiny specifických protilátek IgG bylo pozorováno ve vzorku séra testovaného dobrovolníka, který se podrobil nazálnímu podávání IgY. Výsledek ELISA testu je uveden na obrázku 8, strana 38.



Obrázek č. 8: Sledování aktivity specifické IgG před a po užívání IgY metodou ELISA.

A před – aktivita IgG před perorálním užíváním IgY

A po – aktivita IgG po perorálním užíváním IgY

B před – aktivita IgG před nazálním užíváním IgY

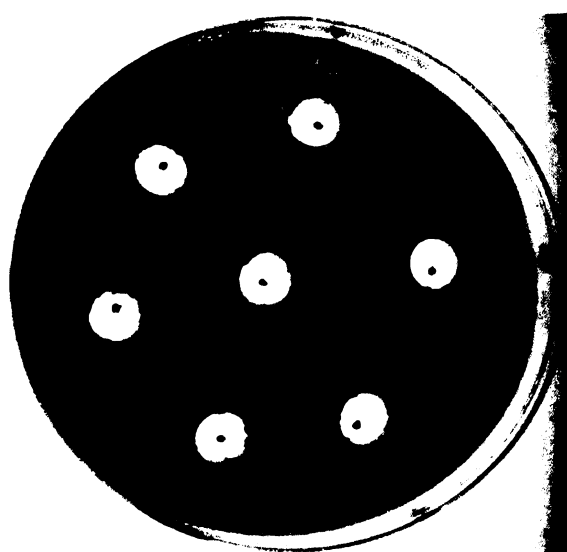
B po – aktivita IgG po nazálním užíváním IgY

Koncentrace použitého antigenu byla 4 $\mu\text{g/ml}$.

4.4 Ovlivnění růstu *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* v přítomnosti specifické protilátky

Zde bylo sledováno zda (při kultivaci) v přítomnosti specifických protilátek IgY dojde k omezení či zastavení růstu bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (sbírkového kmene i kmene získaného z dýchacích cest pacienta s cystickou fibrózou) a *Burkholderia cepacia*. Kultivace probíhala na pevné kultivační půdě (agaru). Po kultivaci (48 hodinách) byly vizuálně zhodnoceny výsledky.

Plotny byly kompletně přerostlé bakteriemi, aniž by v okolí nanesených specifických protilátek došlo k vytvoření zón, které by značily omezení růstu mikroba. Tento jev byl shodný pro všechny použité bakteriální kmene, pro ilustraci je uveden výsledek kultivace *Pseudomonas aeruginosa* izolované z plic pacienta s cystickou fibrózou (viz. Obr. 9).

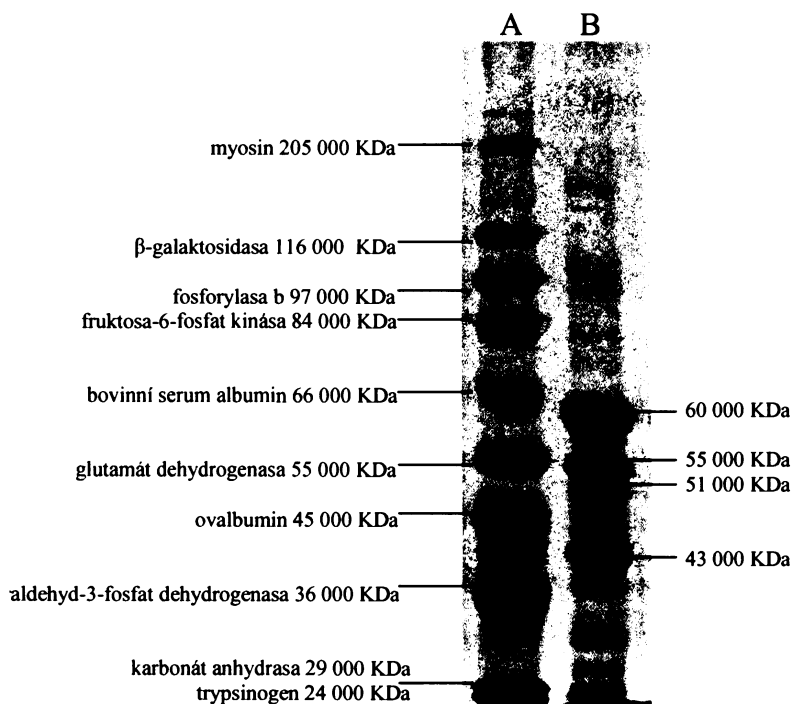


- 1) IgY o objemu 0,05 ml
- 2) IgY o objemu 0,1 ml
- 3) IgY o objemu 0,2 ml
- 4) roztok retinátu NaN_3 o objemu 0,1 ml
- 5) roztok dialyzátu PBS o objemu 0,1 ml
- 6) kontrolní IgY o objemu 0,15 ml
- 7) prázdná jamka

Obr. 9 - *Pseudomonas aeruginosa* (kmen získaný z dýchacích cest pacienta s cystickou fibrózou) po kultivaci s IgY

4.5 Ověření izolace subcelulární frakce bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Ke studiu proteinového složení izolované subcelulární frakce bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla použita SDS-PAGE elektroforéza. Při elektroforéze byl nanesen vzorek subcelulární frakce a standardu SigmaMarker Wide Range (širokého rozpětí). Gel byl po elektroforéze obarven. Po elektroforéze byla v gelu zaznamenána přítomnost 4 zón. Dvě majoritní zóny byly nalezeny v oblasti 60 a 43 tisíc KDa, další dvě minoritní zóny se pohybovali v oblasti okolo 55 a 51 tisíc KDa. V publikacích věnujících se obdobnému tématu je uváděno, že oblast okolo 50 tisíc KDa přísluší flagellové frakci *Pseudomonas aeruginosa*.²⁶ Výsledek elektroforézy je na obrázku 10.



Obrázek 10 - SDS-PAGE elektroforéza subcelulární frakce *Pseudomonas aeruginosa* (7,5% gel) v redukujícím prostředí.

A - standard: *SigmaMarker Wide range* (viz. Obr. 2, str. 22)

B – subcelulární frakce *Pseu*

5 Diskuse

Podáním peptidického antigenu se podařilo navodit imunitní odpověď ve slepičím organismu projevující se produkcí specifické protilátky IgY. Tato imunitní odpověď (schopnost tvořit IgY po podání antigenu) v čase klesá. ELISA testem byla potvrzena vyšší koncentrace IgY v izolované frakci č. 1 (kratší časový interval od doby imunizace) oproti koncentraci IgY ve frakci č. 2 (delší časový interval od imunizace). Tento jev je běžný a zejména v případě použití peptidických antigenů je dobře patrný.

Při použití bakteriálních antigenů se podařilo navodit imunitní odpověď ve slepičím organismu následovanou produkcí specifických protilátek IgY. Ale intenzita imunitní odpovědi (koncentrace tvořených protilátek) se lišila v závislosti na použitém bakteriálním kmenu (jako antigenu) a době od imunizace. Jak je patrné z obrázku 3 (str. 31), frakce specifických IgY po imunizaci kmenem *Burkholderia cepacia* vykazují velice dobrou aktivitu. Po první imunizaci jejich koncentrace roste a po dalších podpůrných imunizačních dávkách pozvolně stoupá. Po dosažení svého maxima si tuto aktivitu uchovávají.

Ve frakcích IgY získaných imunizací slepice kmenem *Pseudomonas aeruginosa* (izolované z plic pacienta s cystickou fibrózou) došlo k pozvolnému nárůstu koncentrace IgY až k dosažení maxima (které bylo ze všech tří získaných specifických IgY nejvyšší). Pokud však nedocházelo k opakování imunizačních dávek, tak jejich aktivita začala opět zvolna klesat.

Koncentrace IgY ve frakcích získaných imunizací pomocí sbírkového kmene *Pseudomonas aeruginosa* po první imunizaci značně vzrostla a dosáhla svého maxima ve velice krátkém časovém intervalu od doby imunizace. Ale následné imunizační dávky již nevyvolali další nárůst aktivity. Tento jev je možné pozorovat při použití peptidických antigenů.

Při použití všech bakteriálních antigenů bylo nutno podat až 3 udržovací dávky, aby bylo možno dosáhnout maximální imunitní odpovědi.

Pokud můžeme ze srovnávání pouze tří experimentálních objektů vyvodit nějaké závěry, vyplývá z nich, že *Burkholderia cepacia* je jako antigen schopná vyvolat dostatečně vysokou produkci protilátek i s delším časovým odstupem od provedení

imunizace. Proto se jeví jako antigen s nejlepšími vlastnostmi pro dlouhodobou přípravu protilátek. Naopak antigen *Pseudomonas aeruginosa* (izolovaná z plic pacienta s cystickou fibrózou) vyvolá v krátkém časovém intervalu nejvyšší produkci IgY od provedení imunizace. Ale vzhledem k tomu, že s prodlužujícím se časovým intervalem od doby imunizace klesá (koncentrace) produkce IgY se jeví jako antigen vhodný pro přípravu protilátek v krátkém časovém intervalu od imunizace.

Sbírkový kmen *Pseudomonas aeruginosa* se pro své antigenní vlastnosti (malá produkce IgY v krátkém i delším časovém období od imunizace) ukazuje jako antigen, který je schopen vyvolat velmi dobrou imunitní odpověď jen záhy po imunizaci.

Při sledování růstu bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* na pevném médiu se nepodařilo prokázat, že v přítomnosti specifických protilátek IgY (proti těmto bakteriím) bude jejich růst nějak ovlivněn. Po kultivaci byly plotny přerostlé, aniž by v okolí specifických protilátek byla přítomna zóna značící jejich antimikrobiální působení (viz. Obr. 9, str. 39).

Z toho vyplývá, že tento stav mohl být způsoben přímým působením proteolytických enzymů sekretovaných bakteriemi do media, které mohly protilátku rozštěpit ještě dříve než započal její účinek nebo tyto specifické protilátky nebrání růstu bakterií.

Výše uvedené naznačuje potřebu využívání specifických antigenů, které mohou již přímým působením na určité mechanismy zabránit činnosti bakterií.

Předpokládáme, že specifické protilátky proti bičíkům *Pseudomonas aeruginosa* (flagelinové bílkovině) by mohli zabránit adhezenci této bakterie na epiteliální buňky sliznic dýchacích cest. Jelikož flagella patří mezi adheziny, které jsou zodpovědné až za 90% adhesivní činnosti bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* byla snaha o izolaci subcelulární frakce, v níž se tato struktura nachází.

Proto byla z bakteriální suspenze *Pseudomonas aeruginosa* izolována subcelulární frakce této bakterie. Metodou SDS-PAGE elektroforéza byla v této frakci potvrzena přítomnost 4 (proteinů) zón (viz. Obr. 10, str. 40) v oblasti okolo 50 000 KDa, která je uváděna pro flagellové proteiny. V publikaci Allisona, a spol. (1985) je uváděna hmotnost flagellinu kmene *Pseudomonas aeruginosa* 53000 KDa^{cit 26}. Oblast o

této hmotnosti byla nalezena, ale bez sekvenace izolovaného proteinu není možné s jistotou potvrdit, že byl izolován právě flagellin.

Flagella jako jeden z nejlepších adhezínů bakterie *Pseudomonas aeruginosa* by tak mohl být použit jako výborný antigen. V případě pasivní imunizace pomocí jeho specifických protilátek by mohl přispět významnou měrou při terapii cystické fibrózy.

Pro volbu způsobu stabilizace IgY je prvním kritériem čas, po který má být izolovaná IgY uchovávána. Pro velmi krátké uchovávání IgY není třeba přidávat žádné stabilizační látky. Jak ukazuje obr. 5, str. 33, při uchovávání IgY po dobu 2 dní v 5°C či 37°C nedocházelo k poklesu aktivity IgY ani v jednom z případů. Pro dlouhodobé uchování protilátek je vhodné použít zamražení nebo lyofylizaci, které shodně vedou k jednorázové ztrátě aktivity přibližně z 65%.

Při dalším posuzování stability IgY byly voleny delší intervaly při uchování vzorku IgY. Při uchovávání vzorku IgY v inkubátoru (37°C) byl sledován v průběhu 28 dní rozdíl mezi aktivitami vzorků v přítomnosti a nepřítomnosti azidu. V časovém intervalu 2-7 dní nedocházelo k žádným výrazným změnám aktivit mezi IgY s obsahem či bez obsahu azidu, avšak v období po 28 dnech došlo k výrazné změně a nakonec až ke ztrátě aktivity IgY u vzorku bez obsahu azidu. Z toho vyplývá, že pro delší uchování (obzvláště při vyšších teplotách) IgY je pro udržení aktivity IgY nutná stabilizace antibakteriálním agens, např. azidem.

Protože ke ztrátě aktivity IgY dochází po několika týdenním uchovávání a také i po jejím zmražení či lyofylizaci bylo nutné najít vhodnou stabilizační látku. S ohledem na to, že IgY by měli být určeny k přímému podávání lidskému organismu, je nutné vybírat (volit mezi) chemické látky, které jsou biokompatibilní. Doposud se jako velmi vhodná stabilizační látka používá azid sodný. Proto byl pro porovnání účinků vybrané široké škály chemických stabilizačních látek použit azid. Použité stabilizační látky a jejich účinek je uveden v tabulce 3, str. 44.

Tabulka 3: Chemické stabilizační látky a jejich vliv na aktivitu IgY

	A	B	C
Azid sodný	-22%	30%	/ %
Kyselina benzoová	-26%	52%	22%
Septonex	-90%	10%	-21%
Kyselina sorbová	-80%	-4%	-34%
Ajatin	-48%	-48%	-78%
Lysozym	-35%	34%	3%
Methyl-paraben	-39%	37%	6%
IgY bez stab. látek	-49%	/ %	-30%
Thiomersal	-25%	27%	-4%
Kyselina boritá	-15%	42%	12%

Legenda: **A - aktivita za 31 dní** - udává pokles aktivity IgY po inkubaci (37°C) 31 dní za použití uvedených stabilizačních látek vůči standardní protilátce (100%).

B - aktivita vůči „IgY“ - udává rozdíl mezi aktivitou IgY bez použití stabilizačních látek a IgY s různými stabilizačními látkami.

C - aktivita vůči „azidu“ - udává pokles či nárůst aktivity IgY při použití různých stabilizačních látek vůči aktivitě IgY za stabilizace azidem.

Jak z výše uvedené tabulky vyplývá stabilizační látky jako ajatin či kyselina sorbová se jeví pro stabilizaci IgY jako nevhodné. Aktivita IgY při použití těchto látek klesne ještě níže než má samotná IgY bez použití stabilizačních látek. Látky jako Septonex, Thiomersal, lysozym a methyl-paraben převyšují svou aktivitou aktivitu IgY bez použití stabilizačních látek, ale významně nepřevyšují aktivitu IgY stabilizovanou azidem. Nejsou tedy vhodnějším stabilizačním činidlem než azid sodný. Oproti tomu kyselina benzoová a boritá se zdají být z hlediska stabilizace aktivity IgY nejvhodnějšími látkami, protože prokázaly dokonce lepší schopnost stabilizovat aktivitu IgY než azid sodný.

V případě tohoto experimentu (viz Obr. 7, str. 36) nedošlo u IgY bez stabilizačních látek ani po dlouhodobé inkubaci (31 dní) při 37°C k úplné ztrátě její aktivity oproti předchozímu experimentu, kdy dlouhodobá inkubace protilátky při 37°C bez použití stabilizačních látek (viz. Obr. 6, str. 34) vedla již po 28 dnech k úplné ztrátě

aktivity protilátek. Tento zdánlivý rozpor byl pravděpodobně způsoben lyofylizací IgY, čímž mohlo dojít ke zničení či omezení životaschopnosti bakteriální kontaminace vzorku.

Při posuzování vlivu užívané IgY (isolované z konzumních vajec) na lidský organismus byl volen nazální a perorální způsob podání. Nazální vakcinace je jedním ze způsobů imunizace. Nazální imunizací (může) dochází k tvorbě specifických protilátek lidské anti-IgG.^{27,28,29}

Po ukončení užívání (viz. Obr. 8, str. 38) IgY byla testem ELISA potvrzena zvýšená aktivita specifické protilátky (lidské IgG) ve vzorku lidského séra testovaného dobrovolníka, který IgY užíval nazálně. U jedince, který tuto IgY užíval perorálním způsobem, sérum neprokázalo zvýšený obsah (koncentraci) specifické protilátky lidské IgG.

Z toho vyplývá, že již samotné podávání IgY vyvolává v lidském organismu imunitní odpověď. A způsob podání má rozhodující vliv na efektivitu pasivní imunizace. Po dobu trvání celého experimentu nebyly zaznamenány při perorálním ani nasálním podávání žádné nežádoucí účinky ani subjektivní změny.

6 Souhrn

- Byly izolovány protilátkové frakce IgY z vaječných žloutků slepice imunizované modelovým peptidem. S těmito protilátkami byly provedeny stabilizační studie.
- Při krátkodobém uchování IgY vykazují dobrou stabilitu i při 37°C, takže není nutná jejich chemická stabilizace.
- Jako nejvhodnější stabilizační látky pro střednědobé uchování IgY se jeví kyseliny boritá a benzoová, které vykazují srovnatelné výsledky jako běžně užívaný azid sodný.
- Byly izolovány protilátkové frakce specifických IgY z vaječných žloutků slepic imunizovaných usmrcenými kmeny vybraných bakterií.
- Metodou ELISA byl prokázán obsah specifických protilátek proti použitým antigenům v dvouletém období v závislosti na udržovacích dávkách antigenu.
- Byly izolovány protilátkové frakce IgY z vaječných žloutků konzumních vajec.
- Metodou ELISA byl prokázán obsah specifických protilátek IgG u dobrovolníka po nasálním užití.
- Byla izolována subcelulární frakce bakterií a pomocí SDS – ELFO prokázána přítomnost 4 proteinů.

7 Použitá literatura

1. Hořejší V., Bartůňková J., *Základy imunologie*, Imunitní reakce založené na protilátkách; Triton, Praha 1998
2. Sunwoo H.H., Nakano T., Dixon W.T., Sim J.S., *Poultry Sci.* 75, p. 342, (1996)
3. Hatta H., Tsuda K., Akachi S., Kim M., Yamamoto T., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57, p. 450-454, (1993)
4. Ntakarutimana V., Demedts P., van Sande P. Scharpé S., *Journal of Immunological Methods* 153, p. 133, (1992)
5. Hatta H., Tsuda K., Akachi S., Kim M., Yamamoto T., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57, p. 450-454, (1993)
6. Bollen L.S., Crowley A., Stodulski G., Hau J., *Journal of Immunological Methods* 191, p. 113-120, (1996)
7. Akita E.M., Nakai S., *Journal of Immunological Methods* 160, p. 207, (1992)
8. Jensenius J.C., Anderson I., Hau J., Crone M., *Journal of Immunological Methods* 46, p. 63, (1981)
9. Polson A., Maass R., Vandermerwe K.J., *Immunological Investigations* 17, p. 465-489, (1988)
10. Akita E.M., Nakai S., *Journal of Immunological Methods* 155, p. 164, (1992)
11. Hatta H., Kim M., Yamamoto T., *Agricultural and Biological Chemistry* 54, p. 2531-2535, (1990)
12. Vávrová V. a kol. centra CF Motol., *Cystická fibróza* (příručka pro nemocné, jejich rodiče a přátele), Professional Publishing, Praha 2000
13. Vávrová V. a kol., *Cystická fibróza v praxi*, Kreace s.r.o., Praha 1999
14. Hauser A. R., Sriram P., *Medicína po promoci, těžké infekce vyvolané bakterií Pseudomonas aeruginosa*, p. 23, (2005)
15. Walker R.I., Blanchard T., Braun J.M., Cebra J.J., Gross A.S., Fattom A., Giannasca P.J., Holder I.A., *Vaccine* 22, p. 801-804, (2004)
16. Kollberg H., Carlander D., Olesen H., Wejaker P., Johannesson M., Larsson A., *Pediatric Pulmonology* 35, p. 433-440, (2003)

17. Scharfman A., Arora K.S., Delmotte P., Van Brusel E., Mazurier J., Ramphal R., Roussel P., *Infection and Immunity*, Vol. 69, No. 9, p. 5243-5248, (2001)
18. Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. a kol., *Lékařská mikrobiologie (bakteriologie, virologie, parazitologie)*, Marvil, Praha 1996
19. <http://www.zdrava-rodina.cz/med/0201/med/0228.html> (13.7.2005)
20. Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. a kol., *Lékařská mikrobiologie (bakteriologie, virologie, parazitologie)*, Marvil, Praha 1996
21. Hahn H.P., *Gene* 192, p. 99-108, (1997)
22. Hodek P., Trefil P., Šimůnek J., CZ Patent 281298, (1996)
23. Zahradnický J. a kol., *Mikrobiologie a epidemiologie*, Avicenum, Praha 1987
24. *Československý lékopis*, svazek I;II;III; Avicenum, Praha 1987
25. Laemmli U.K., *Nature* 227, p. 680-685, (1970)
26. Allison J.S., Dawson M., Drake D., Montie T.C., *Infection and Immunity*, Vol. 49, No. 3, p. 770-774, (1985)
27. Zuercher A.W., Horn M.P., Wu H., Song Z.J., Bundgaard C.J., Johansen H.K., Hoiby N., Marcus P., Lang A.B., *Vaccine* 24, p. 4333-4342, (2006)
28. Zuercher A.W., Horn M.P., Que J.U., Ruedeberg A., Schoeni M.H., Schaad U.B., Marcus P., Lang A.B., *Fems Immunology and Medical Mikrobiology* 47, p. 302-308, (2006)
29. Giri P.K., Verma I., Khuller G.K., *Fems Immunology and Medical Mikrobiology* 47, p. 233-241, (2006)