

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra biologických disciplín

Studijní program: N4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Protilátková odpověď vrubozobých ptáků proti ptačím schistosomám

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Markéta Havelková

České Budějovice, 2019

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně pouze s využitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích 15.4. 2019

Bc. Markéta Havelková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli RNDr. Liboru Mikešovi, Ph.D. za odborné vedení a veškerou pomoc s dokončením této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Libuši Turjanicové za rady při práci v laboratoři a poskytnutí vlastních materiálů. Děkuji Vaškovi za bezmeznou důvěru, trpělivost a podporu, a děkuji Honzovi za azyl při cestách do Č. Budějovic.

Abstrakt

Motolice rodu *Trichobilharzia* jsou typicky dvouhostitelští parazité využívající vodní plže jako mezihostitele a ptáky jako definitivní hostitele. Infekční stádia volně plovoucí ve vodě jsou však schopná penetrovat i kůži savce, včetně člověka, a tím vyvolávat hypersenzitivní reakci známou jako cercáriová dermatitida. Infekce neurotropním druhem *T. regenti* vyvolává u kachen zvýšení hladiny protilátek třídy IgY specificky rozpoznávajících určité parazitární antigeny. V této práci byly stanoveny tyto parametry u dvou dalších příbuzných, viscerálních druhů, *T. szidati* a *T. franki*, a současně byly charakterizovány zkřížené reaktivity protilátek v sérech nakažených kachen vůči heterologním antigenům pomocí ELISA a Western blotu. Protilátky kachen nakažených *T. szidati* vykazovaly velmi nízkou reaktivitu s antigeny všech tří parazitárních druhů, na rozdíl od protilátek kachen nakažených *T. franki* i *T. regenti*. Dříve identifikované silně imunogenní antigeny *T. regenti* byly zhodnoceny jako druhově nespecifické pro všechny hodnocené druhy trichobilharzie, avšak použitelné pro diagnostiku nákazy ptačími motolicemi u volně žijících jedinců.

Klíčová slova: *Trichobilharzia*, antigen, protilátka, kachna, ELISA, Western blot

Abstract

Flukes of the genus *Trichobilharzia* are typical parasites using aquatic gastropods as intermediate hosts and birds as definitive hosts. However, infectious stages in open water are able to penetrate the skin of a mammal, including humans, and thereby induce a hypersensitivity reaction known as swimmer's itch. Infection with neurotropic species *T. regenti* in ducks induces an increase in level of IgY antibody which recognize certain parasitic antigens. In this work, these parameters in two other relative but visceral species, *T. szidati* and *T. franki*, and cross-reactivity of antibodies in serum of infected duck against heterologous parasitic antigen by ELISA and Western blot were characterized. Antibodies of ducks infected with *T. szidati* showed very low reactivity with all three parasitic antigens in compare to ducks infected with *T. franki* or *T. regenti*. The previously identified strongly immunogenic *T. regenti* antigens have been evaluated as species non-specific for all trichobilharzia species studied, but useful for avian fluke infection in wild individuals diagnosis.

Keywords: *Trichobilharzia*, antigen, antibody, duck, ELISA, Western blot

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
2. ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	8
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
3.1. Schistosomatidae	10
3.1.1 Životní cyklus rodu <i>Trichobilharzia</i>	10
3.1.2 <i>Trichobilharzia</i> spp. v ČR	13
3.1.2.1 Monitorování výskytu ptačích schistosom.....	13
3.1.2.2 Možnosti kontroly	15
3.2. Patologie nákazy schistosomami	16
3.2.1 Cerkáriová dermatitida.....	20
3.3. Diagnostika schistosomatidóz	21
3.3.1 Mikroskopické vyšetření.....	22
3.3.2 Molekulární metody.....	23
3.3.3 Imunologické metody	23
3.3.3.1 Detekce parazitárních antigenů	24
3.3.3.2 Detekce protilátek hostitele.....	24
3.3.3.3 Imunogenní struktury	26
3.4. Ptačí protilátky – imunoglobuliny	27
3.5. Modelové organismy.....	30
4. MATERIÁL A METODIKA	32
4.1 Modelové organismy.....	32
4.1.1 Plži	32
4.1.2 Cerkárie	33
4.1.3 Kachny	33
4.1.3.1 Infekce kachen	33
4.1.3.1 Odběry kachních sér	34
4.2 Kontrola nákazy; udržování cyklu.....	34
4.3 Parazitární antigen	36
4.3.1 Homogenizace cercárií	36
4.3.2 Měření koncentrace proteinů.....	36
4.3.3 Elektroforetická separace proteinů – SDS-PAGE.....	37
4.4 Western blot.....	37
4.5 ELISA	38
4.6 Vyhodnocení.....	39
5. VÝSLEDKY.....	40
5.1 Zavedení cyklu <i>T. franki</i>	40
5.2 Měření hladiny protilátek pomocí ELISA.....	40
5.2.1 Cerkariální antigen <i>T. regenti</i>	40
5.2.2 Cerkariální antigen <i>T. franki</i>	42
5.2.3 Cerkariální antigen <i>T. szidati</i>	43
5.2.4 Statistická průkaznost	44

5.3 Detekce cerkariálních antigenů pomocí Western blotu	46
5.3.1 Cerkariální antigen <i>T. regenti</i>	
5.3.1.1 Časový průběh protilátkové odpovědi při nákaze <i>T. regenti</i>	46
5.3.1.2 Zkřížené reakce protilátek z heterologních sér	47
5.3.1.3 Detekované antigeny.....	49
5.3.2 Cerkariální antigen <i>T. franki</i>	
5.3.2.1 Časový průběh protilátkové odpovědi při nákaze <i>T. franki</i>	49
5.3.2.2 Zkřížené reakce protilátek z heterologních sér	50
5.3.2.3 Detekované antigeny.....	51
5.3.3 Cerkariální antigen <i>T. szidati</i>	
5.3.3.1 Časový průběh protilátkové odpovědi při nákaze <i>T. szidati</i>	52
5.3.3.2 Zkřížené reakce protilátek z heterologních sér	52
5.3.3.3 Detekované antigeny.....	53
5.4 Western blot se séry divokých ptáků.....	54
6. DISKUSE.....	56
7. ZÁVĚR.....	64
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65
9. PŘÍLOHA Č. 1.....	77
10. PŘÍLOHA Č. 2	78

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DPI	dny po infekci
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
TGS	Tris-Glycine-SDS pufr pro elektroforézu
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline + Tween
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
OD450	optická denzita při vlnové délce 450 nm
kDa	kilo Dalton; atomová hmotnostní konstanta
PVDF	polyvinylidene difluoridová membrána
Ig	imunoglobulin
IgY	ptačí imunoglobulin třídy Y

2. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Motolice rodu *Trichobilharzia* jsou na našem území běžně se vyskytující parazité vodního ptactva, především řádu vrubozobí (Anseriformes). Jejich komplikovaný dvouhostitelský životní cyklus, zahrnující také akvatické plicnaté plže, je striktně vázaný na vodní prostředí, kde se s nimi může do kontaktu dostat i koupající či brodící se člověk. Infekční juvenilní stádia zvaná cercárie sice v lidské kůži pod tlakem imunitního systému hynou, vyvolané zánětlivé reakce však často vedou k bouřlivým alergickým a velmi nepříjemným projevům tzv. cercárieové dermatitidy. Kromě toho mohou infekce trichobilharziemi způsobovat poškození různých orgánů přirozených ptačích hostitelů, která mohou vést i k úhynu nebo ke snazšímu ulovení napadených jedinců predátory.

V přirozeném prostředí je velmi obtížné sledovat prevalenci těchto nákaz mezi definitivními hostiteli. Ptáci často nevykazují žádné zdravotní obtíže a využívané způsoby spolehlivé detekce probíhající infekce jsou pouze dva: vyšetření trusu na přítomnost vajíček parazita a pitva. Doposud nebyla vyvinuta spolehlivá, málo invazivní molekulární či imunologická metoda, kterou by bylo možné monitorovat výskyt těchto parazitů v ptácích na určité lokalitě, rozsáhlejším území či v jednotlivých sezónách.

Jednou z potenciálně možných použitelných metod je stanovení hladiny specifických protilátek v séru při určité naze, nebo přímo reakce protilátek z krve infikovaných jedinců s konkrétními parazitárními antigeny. Jedná se o málo invazivní metodu, která se běžně používá například při diagnóze různých infekčních onemocnění lidí.

Obecným cílem mé diplomové práce tedy bylo otestovat možnosti imunodiagnostiky trichobilharzióz u ptáků. Pro experimenty byly vybrány kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), jako přirození definitivní hostitelé trichobilharzií, a 3 nejběžnější druhy těchto parazitů, se kterými se lze na území České republiky setkat – *Trichobilharzia regenti*, *Trichobilharzia szidati* a *Trichobilharzia franki*. Životní cyklus prvních dvou druhů je udržován v laboratoři Katedry parazitologie PřFUK. Díky znalosti lokalit a kontaktům s majiteli či provozovateli přírodních koupališť bylo možné začlenit do pokusů i *T. franki*, která je běžným druhem v přírodních podmínkách

Pro posouzení potenciálu detekce nález trichobilharziemi pomocí imunodiagnostických metod byly stanoveny tyto cíle:

1. Studium časového průběhu protilátkové odpovědi experimentálně nakažených kachen proti vybraným druhům schistosom rodu *Trichobilharzia* vyskytujících se v ČR (*T. regenti*, *T. szidati*, eventuelně *T. franki*) pomocí metod ELISA a Western blot.

2. Studium zkřížené reaktivity protilátek kachen infikovaných jednotlivými druhy trichobilharzií s antigeny cercárií všech tří druhů parazitů.

3. Detekce protilátek proti antigenům trichobilharzií v krvi divoce žijících vrubozobých (např. labutí).

4. Vyhodnocení imunodiagnostického potenciálu antigenů cercárií ptačích schistosom reagujících se séry ptáků na imunoblotech.

5. Případná identifikace specifických a senzitivních antigenů ptačích schistosom s potenciálem pro imunodiagnostiku pomocí proteomických metod.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Motolice čeledi Schistosomatidae

Motolice (Trematoda: Digenea) jsou výhradně parazitickou skupinou živočichů kmene Platyhelminthes (ploštěnci), jejichž životní cyklus vždy zahrnuje alespoň jednoho mezihostitele (Obr. 1). Mezihostitelem je, až na výjimku čeledi Aporocotyliidae, měkkýš, nejčastěji plž. Definitivním hostitelem je pak, až na výjimku podtřídy Aspidogastrea, obratlovec. Čeď Schistosomatidae patří mezi dvouhostitelské motolice s cykly vázanými na vodní prostředí. Jejich mezihostiteli jsou vodní plži a definitivními hostiteli ptáci či savci, tedy výlučně teplokrevní obratlovci.

Tyto motolice jsou výjimečné jednak tím, že mají rozlišené pohlaví, a jednak se v dospělosti nalézají především v krevním systému obratlovčího hostitele. Mezi savčími zástupci těchto parazitů nalézáme krevničky (rod *Schistosoma*), významné lidské patogeny tropů a subtropů způsobující závažné onemocnění zv. schistosomóza. Celá čeď zahrnuje 14 rodů, pták jako definitivní hostitel figuruje u deseti z nich. Jsou to rody *Allobilharzia*, *Anserobilharzia*, *Austroilharzia*, *Bilharziella*, *Dendroilharzia*, *Gigantilharzia*, *Jilinoilharzia*, *Macroilharzia*, *Ornithilharzia* a *Trichilharzia* (Horák *et al.*, 2014).

Rod *Trichilharzia* způsobuje u ptáků, zejména vrubozobých z čeledi Anatidae (kachnovití) obdobné onemocnění jako *Schistosoma* u lidí (Wojcinski *et al.*, 1987; Bolhuis *et al.*, 2004), nicméně je z medicínského hlediska významný i pro savce, včetně člověka, kvůli působení kožní alergické reakce, tzv. cercáriové dermatitidy a potenciální schopnosti pronikat i do dalších orgánů (Horák *et al.*, 2008; Horák *et al.*, 2015; Macháček *et al.*, 2018).

3.1.1 Životní cyklus rodu *Trichilharzia*

Vajíčka uvolněná ze samičky motolice pronikají tkáněmi z krevního řečiště do lumen střeva, v případě nazálních druhů zůstávají v nosní sliznici (Horák *et al.*, 1998a). Zde dochází také ke kvantitativním ztrátám zachycením vajíček ve tkáni, kde jsou posléze indukovány zánětlivé reakce vedoucí k jejich eliminaci imunitním systémem (Horák *et al.*, 2002). Vajíčko obsahuje již vyvinutou larvu (miracidium), která jej opouští ve chvíli kontaktu s vodou. Životnost miracidí se pohybuje okolo 20 hodin (Neuhaus, 1952a), kdy musejí nalézt vhodného mezihostitele, přičemž tento výběr je druhově vysoce specifický, vymezený často na jeden konkrétní druh vodního plže, experimentálně někdy s nižší

afinitou i k druhům blízkým (Kock, 2001). Konkrétně se jedná o lymnaeidní plže, physidní plže a jeden případ pleuroceridního plže (pro *T. corvi* z Asie) (McMullen & Beaver, 1945).

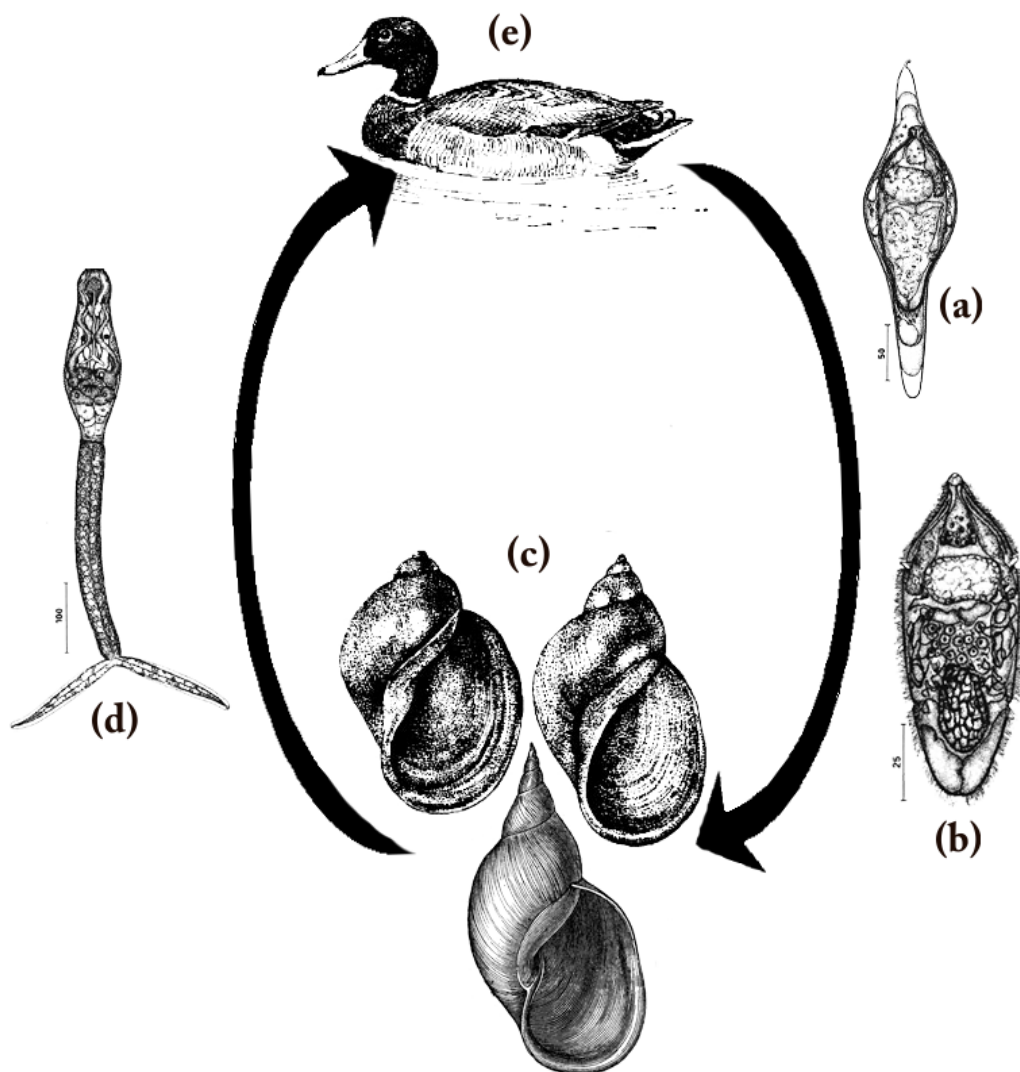
Uvnitř měkkýše se miracidium transformuje na mateřskou sporocystu. Ta produkuje následnou generaci dceřiných sporocyst nepohlavní cestou z pluripotentních zárodečných buněk. V dceřiných sporocystách posléze rovněž dochází k asexuálnímu množení a produkci dalších generací dceřiných sporocyst, které nakonec stejným způsobem produkují juvenilní stádia zvaná cercárie. Ty mezihostitele opouštějí do vodního prostředí. Prepatentní perioda infekce v plži je 3–10 týdnů, zejména v závislosti na druhu motolice a teplotě prostředí (Horák *et al.*, 2002). Denně se z jednoho plže uvolní průměrně přes 2 500 cercárií, v extrémních případech až téměř 30 000. Tato stádia velikosti necelého milimetru jsou tedy významnou součástí biomasy vodního prostředí (Soldánová *et al.*, 2013).

Cercárie pak aktivně vyhledávají vhodného definitivního hostitele prostřednictvím reakcí na fyzikální podněty (Feiler & Haas, 1988a) a chemické signály (Graczyk & Shiff, 2000; Feiler & Haas, 1988b), přičemž délka jejich života je asi 1–1,5 dne (Neuhaus, 1952a). Po penetraci kůže hostitele ztrácí cercárie silný glykokalyxový obal a ocásek a transformuje se na schistosomulum (Horák *et al.*, 1998b). V případě viscerálních druhů schistosomula migrují tělem hostitele až do plic, kde je lze nalézt ve vzdušném prostoru průdušek mezi 1. a 16. dnem po infekci (Bourns *et al.*, 1973; Ellis *et al.*, 1975; Haas & Pietsch, 1991; Horák & Kolářová 2000). Juvenilní červi opět vstupují do krevního řečiště a putují do dalších orgánů, dokud nedosáhnou své finální lokalizace. Při primoinfekcích lze ptáci i lidské schistosomy v kompatibilním hostiteli zaznamenat v játrech, ledvinách, i navracené do plic (Ellis *et al.*, 1975; Wilson & Coulson, 1986), při opakovaných infekcích se výskyt mimo plíce a finální lokalizaci zásadně snižuje (Ellis *et al.*, 1975).

V poslední fázi se dospělci nalézají v místě své konečné lokalizace a uvolňují vajíčka. Viscerální druhy lze nalézt v cévách oblasti trávicí soustavy a jater, nazální druhy se nacházejí v oblasti čichové sliznice. Dospělí červi mají nitkovité, drobné tělo (20–100 μm v průměru) o délce několik milimetrů (Horák *et al.*, 2002) Vajíčka viscerálních druhů těchto motolic se objevují v trusu ptáků od 9. dne po infekci, nejvíce mezi 14. a 19. dnem a nadále jejich množství klesá (Rau *et al.*, 1975). Celková délka života dospělců není jednoznačná a data pochází pouze z mála dlouhodobých experimentů, kdy například jedinci *T. ocellata* (= *T. szidati*, viz Rudolfová *et al.*, 2005) byli nalezeni v játrech kachen

i 370 dní po infekci (Bourns *et al.*, 1973). Vajíčka jsou vylučována pouze v krátkém rozmezí několika dní (Meuleman *et al.*, 1984; Horák *et al.*, 2002).

Oproti tomu neurotropní nazální motolice *T. regenti* migrují v těle po penetraci kůže periferními nervy a míchou až do mozku a 13. den po infekci dosahují oblasti sliznice nosní dutiny. Jejich životnost je 23–25 dní (Horák *et al.*, 1999), nicméně detailní poznatky jsou založeny pouze na studiu *T. regenti* jako jediného známého druhu s touto specifickou migrační strategií.



Obr. 1. Obecné schéma životního cyklu motolice rodu *Trichobilharzia*. Z ptáka jsou do vodního prostředí uvolňována vajíčka (a), ze kterých se velmi rychle líhne larva miracidium (b). Miracidium aktivně vyhledává a penetruje druhově specifického mezihostitele, vodního plže (c). Po několika cyklech asexuálního množení se z plže začnou uvolňovat pohyblivá stádia, cercárie (d), které opět aktivně vyhledávají definitivního hostitele, vodního ptáka (e), kterým je zpravidla zástupce čeledi Anatidae. Uvedená měřítka jsou v μm. (upraveno podle Horák & Kolářová, 2001)

3.1.2 *Trichobilharzia* spp. v ČR

Motolice rodu *Trichobilharzia* Skrjabin & Zakharov, 1920 popisem *T. kossarewi*, jsou v rámci své čeledě nejčastěji nalézány druhy na území České republiky, zároveň se jedná o nejrozsáhlejší rod této čeledi a vzhledem k medicínskému významu a skutečnosti, že jsou u nás velmi rozšířené, i s nejvyšší preferencí výzkumu. Definitivními hostiteli jsou v podmínkách ČR vodní ptáci řádu vrubozobí (především čeledi kachnovití) a mezihostiteli vodní plži čeledi plovatkovití (Lymnaeidae). V globálním měřítku jsou spektra hostitelů širší (Horák *et al.*, 2002). Prevalence nákazy u mezihostitelů se pohybuje maximálně v jednotkách procent, ačkoliv se objevují extrémní případy (až 50 %). Oproti tomu u definitivních hostitelů je nákaza poměrně častá, prevalence v desítkách procent (Rudolfová *et al.*, 2002; Horák *et al.*, 2002; Horák & Kolářová, 2005), což znamená, že tyto ptačí motolice nejsou nijak vzácné. Také unikátní nález doposud nepopsaného druhu *Trichobilharzia* sp. v konipasu bílém (Rudolfová *et al.*, 2006) předpovídá, že seznam popsanych druhů zdaleka není kompletní. Takovéto ojedinělé nálezy v jiných, dosud nepopsaných hostitelích jsou ovšem velmi diskutabilní, dokud se jedná pouze o jednotlivé záchyty. Například nález jednoho miracidia v nosní sliznici lysky černé (Gruiformes) mohl být pouhou kontaminací z vnějšího prostředí (Rudolfová *et al.*, 2002).

Kromě tří nejčastějších druhů, *T. szidati*, Neuhaus, 1952, *T. franki*, Müller & Kimmig, 1994 a *T. regenti*, Horák, Kolářová & Dvořák, 1998, je u nás také nalézána *T. filiformis* při cílených pitvách labutí, nicméně životní cyklus tohoto druhu je třeba podrobněji prozkoumat.

3.1.2.1 Monitorování výskytu ptačích schistosom

Vzhledem k šíři záznamů o výskytu ptačích schistosom v rámci Evropy lze předpokládat, že se tyto parazité nalézají plošně bez zásadnějších omezení. Předpokladem pro výskyt na určité lokalitě je kromě vodního prostředí přítomnost vhodných hostitelů pro udržení životního cyklu. Některé druhy ptačích schistosom mají úzkou specifitu i k definitivnímu hostiteli, např. *T. filiformis* je nacházena výhradně u labutí. Protože je ale specifita k mezihostitelským plžům významně úzká, toto stádium cyklu je zřejmě nejzásadnější z hlediska možnosti setrvání druhu motolice v dané oblasti. Respektive určité druhy plžů na lokalitě určují potenciál výskytu příslušných druhů trichobilharzií.

Mobilita ptáků, definitivních hostitelů, hraje významnou roli v šíření infekce i v její redistribuci, a to nejen vlastním postavením v rámci životního cyklu parazita, pokud nesou nákazu a schopnost vylučovat infekční stádia, ale i zavlékáním infikovaných, případně

nových druhů plžů, například na končetinách nebo vodních rostlinách (Wesselingh *et al.*, 1999). Z hlediska spektra parazitů tedy mohou migrující ptáci zásadně ovlivňovat lokality na své tažné cestě. Genetické analýzy potvrzují souvislost šíření ptačích motolic s trasami ptáků mezi hnízdišti a zimovištěm (Lawton *et al.*, 2014).

Díky významu těchto motolic v humánní a veterinární medicíně je intenzivní monitoring i v zájmu široké veřejnosti. Kvůli jistým úskalím nálezu a identifikace původce onemocnění je proto třeba lépe porozumět ekologii potenciálních druhů a znát přesné životní cykly.

Pro přesný monitoring rozšíření ptačích motolic na daném území nelze podmínky zobecňovat na základě několika izolovaných záchytů. Rozšíření hostitelů je nerovnoměrné i v rámci jedné vodní plochy, roční doby, i mezi jednotlivými sezónami. Mapování pouze na základě vědeckých výzkumů je velmi nesystematické a nedostatečné a významně může pomoci spolupráce s komunitou lidí přicházejících do kontaktu s vodou formou dotazníků a lékařských či hygienických hlášení (Gordy *et al.*, 2018). Kontrola na lokalitě pak primárně zachycuje výskyt vodních plžů, které je možné testovat na přítomnost infekce vylučováním cercárií.

Cercárie rodu *Trichobilharzia* lze relativně snadno identifikovat jako ocelátní furkocercárie (La Valette, 1855). Kromě této typické, ne však zcela jedinečné charakteristiky jsou specifické například i stavbou penetračních žláz (Ligasová *et al.*, 2011), velikostí, nebo vlastními charakteristickými pohyby, ale v rámci rodu je určení založené pouze na základě morfologie díky velké uniformitě vzhledu téměř nemožné. V případně pozitivitu infekce u plže je pak původce často určen podle druhu mezihostitele (díky úzké hostitelské specifitě). Avšak kvůli nízké prevalenci infekce u mezihostitelů a možnosti infekce v prepatentní fázi je tato metoda velmi nespolehlivá. Riziko falešně negativního výsledku může snížit mikroskopické vyšetření hepatopankreatu (Curtis & Hubbard, 1990; Bei *et al.*, 2001) nebo odhalení parazitární DNA v hemolymfě plžů pomocí molekulárních metod (Šteiger, 2018).

Samotné cercárie lze také efektivně nacházet přímo ve vodním prostředí pomocí pastí s chemickými atraktanty (Shiff *et al.*, 1993; Graczyk & Shiff, 2000) nebo ze vzorku vody pomocí PCR (Hertel *et al.*, 2002; Jothikumar *et al.*, 2015). Tato metoda, přestože je velmi citlivá, je spolehlivá asi jen z 25 % vzhledem k nerovnoměrnému rozložení parazitů v celém objemu vodního tělesa v čase i prostoru (Schets *et al.*, 2009), ale v dnešní době doznává značného pokroku. Molekulární metody jsou také užitečným nástrojem pro

determinaci fylogenetických vztahů jednotlivých druhů (Jouet *et al.*, 2008), a lze tak odhalit i druhy nové, pokud se ke vzorku nenajde přesná shoda se známým referenčním druhem (Chrisanfova *et al.*, 2009).

Další možností je morfologická nebo molekulární identifikace dospělců či vajíček získaných pitvou ptáků, případně pouhé vyšetření jejich trusu na přítomnost vajíček, potažmo líhnoucích se miracií viscerálních motolic (Appleton, 1986). Definitivní hostitelé vykazují mnohem vyšší prevalenci nálezů, a tak patologické vyšetření poskytne pozitivní výsledek s větší pravděpodobností. V takovém případě však nelze určit místo původu nákazy, pouze přítomnost ve vyšetřovaném hostiteli, obzvláště, pokud se jedná o migrující druhy. Nemigrující ptáci obývající lokality s výskytem trichobilharzií, a tím pádem permanentně vystaveni možnosti nákazy, jsou infekcemi postiženi častěji a v mnohem větší míře (Horák *et al.*, 2002). Tato přímá detekce je však jednoznačně závislá na přítomnosti parazita, tedy na délce jeho života, případně na délce patentní periody.

3.1.2.2 Možnosti kontroly

Účinná kontrola výskytu ptačích motolic a jejich redukce je možná, zvláště pokud je znám přesný a kompletní životní cyklus parazita a jeho podmínky. Cílem boje proti nim pak je tento cyklus narušit či rovnou přetrnout, nebo neumožnit jeho stabilní udržování. Znamená to tedy, že je potřeba zasáhnout do vztahů populace hostitelů a mezihostitelů. Zbavení se vodních plžů a případná náhrada této složky ekosystému dané lokality alternativními druhy se zdá být snazší variantou, neboť ptáci se mezi lokalitami pohybují volněji ve větší míře a zásahy omezující jejich výskyt nejsou z hlediska ekologické stability prostředí přípustné a uskutečnitelné v legislativním rámci. Na druhou stranu i jediný nakažený plž může způsobit nepříjemné onemocnění pro plavce nebo nákazu celých populací ptáků na dané lokalitě.

Způsobů, jak eliminovat nákazu hostitelů, bylo vyvinuto mnoho. Od přirozených predátorů plžů, jako jsou některé moluscivorní ryby (třeba lín), nebo predátorů volně plovoucích stádií motolic, která mohou sloužit jako zdroj potravy pro celou škálu vodních živočichů (Berg, 1973), přes využívání chemie a léčiv, až po další způsoby biologického boje. V minulosti byl například v Michiganském jezeře hojně užíván síran měďnatý jako moluskocid (Blankespoor & Reiming, 1991). Po desítkách let aplikace však riziko cercariové dermatitidy stále přetrvávalo, začala se objevovat rezistence, a navíc množství měďnatých látek má nezanedbatelný dopad na životní prostředí. Nízká účinnost moluskocidních látek je způsobena vysokým reprodukčním a disperzním potenciálem

plžů a obtížností postihnout celou populaci v daném objemu vody. Jako mnohem účinnější se ukázala přímá průběžná léčba přítomných definitivních hostitelů, vodního ptactva, praziquantelem (Blankespoor *et al.*, 2001).

V biologickém boji lze využít kompetice mezi populacemi různých druhů plžů (Marszewska *et al.*, 2018), antagonismu mezi druhy parazitujících motolic v jednom mezihostiteli (Lim & Heyneman, 1972), nebo i jiných druhů parazitujících organismů, jako např. kroužkovec *Chaetogaster limnaei* žijící v určitém vztahu s některými druhy vodních plžů a ovlivňující jejich případnou infekci (Ibrahim, 2007). Dále také např. mikrosporidie napadající larvální stádia motolic v plžích (Berg, 1973) nebo spektrum toxických metabolitů bakterie *Bacillus thurigiensis* fungujících nejen proti hmyzím přenašečům jiných onemocnění, ale působících i na plže a uvolněné cercárie (Horák *et al.*, 1996). Kombinací různých způsobů lze docílit i maximální úspěšnosti; například na Martiniku v Karibiku byla lidská motolice *Schistosoma mansoni* zcela vymýcena prvotním vyhubením hostitelských plžů a následným nasazením nekompatibilního, konkurujícího druhu plže (Pointier & Jourdane, 2000).

Pro předcházení výskytu ptačích motolic v rekreačních oblastech je zásadní pravidelná péče o lokalitu. Účinné je například odstraňování vodních rostlin, víření hladiny motorovým člunem, přehrabování a rytí dna a zimní vypouštění, což má zásadní vliv na populace vodních plžů (Leighton *et al.*, 2000). A samozřejmě v neposlední řadě je významná spolupráce a informovanost veřejnosti. Informace podávané množstvím lidí přicházejících do kontaktu s potenciální nákazou mohou zásadně ovlivnit postoj biologů, vlastníků objektu i politiků vůči možným rizikům (Gordy *et al.*, 2018). Proto má i náš Státní zdravotní ústav na svých stránkách dotazník "Zdravotní problémy vzniklé v důsledku koupání nebo kontaktu s koupací vodou" (<https://1url.cz/BMGTC>), díky kterému zvyšuje dohled nad hygienickými požadavky veřejných koupališť i přírodních nádrží.

3.2 Patologie nákazy schistosomami

Z lékařského hlediska je diagnostika nálezů v rámci čeledě Schistosomatidae významná především u dvou rodů, a to *Schistosoma* a *Trichobilharzia*. Zástupci rodu *Schistosoma* jsou lidské krevní motolice vyskytující se v 78 zemích tropického a subtropického pásu, v závislosti na výskytu specifického mezihostitele (<https://1url.cz/jMkVx>). Nejzásadnější z epidemiologického hlediska jsou druhy *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* a *Schistosoma haematobium*. Primární lokalizace dospělců je vázána na oblast soustavy

trávicí (*S. mansoni*, *S. japonicum*), nebo urogenitální (*S. haematobium*). Hlavním patogenním agens jsou jejich vajíčka indukující zánět v tkáni ve svém okolí, ve které se vlivem imunitní reakce tvoří granulomy. Způsobují tak poškození orgánů a vyvolávají tím chronické onemocnění zvané schistosomóza.

Zástupci rodu *Trichobilharzia* se vyskytují celosvětově s výjimkou polárních oblastí (Hoeffler, 1982). Způsobují obdobné onemocnění u ptáků a pro člověka představují riziko jejich cercárie, které jsou schopné nespécificky penetrovat i do kůže savců a způsobovat kožní problémy (tzv. cercáriová dermatitida, více kap. 3.2.1). Opačná varianta motolice infikující nespécifického hostitele, tedy nákaza ptáka lidskými schistosomami, není zvlášť studována. Bylo však potvrzeno, že cercárie *S. mansoni* v ptačí pokožce umírají (Coutinho-Abath & Jampolsky, 1957 v Clegg, 1968). Lokalizace dospělců trichobilharzií, jak již bylo zmíněno, je buď gastrointestinální oblast či nasální sliznice. Z biologického hlediska mají ptačí trichobilharzie (hlavně viscerální druhy) a lidské schistosomy mnoho společného; jejich životní cykly a vliv na hostitele jsou velmi podobné.

Pro všechny druhy rodu *Trichobilharzia* se pro výzkum onemocnění využívá experimentální nákaza přirozených hostitelů, tedy nejčastěji kachen. Efekt infekce člověka lidskými schistosomami však obdobně nelze do přímých experimentálních nákaz aplikovat. Kromě *S. japonicum*, která přirozeně parazituje kromě u člověka i u 46 dalších savců (He & Salafsky, 2001), se vliv ptačích i lidských druhů schistosom na člověka, resp. savce odvozuje od charakterizací nákaz především u hlodavčích modelů. Přestože pro studium lidské *S. mansoni* je používán i kočkodanovitý primát makak rhesus (*Macaca mulatta*) (např. Smithers & Terry, 1967; Li Hsü *et al.*, 1969), von Lichtenberg *et al.* už v roce 1962 prokázali naprosto odlišné schopnosti přežívání a migrace těchto parazitů u různých savců, např. lišek, ondatr nebo svišťů. Proto experimentálně zjištěné patologie, obzvlášť při subklinických příznacích, popsané u nákazy myši lidskými i ptačími schistosomami, nelze automaticky aplikovat i na člověka.

Poté, co cercárie penetruje kůží svého hostitele, transformuje se na schistosomulum, což zahrnuje mj. odvržení výrazně imunoaktivizujícího glykokalyxu z povrchu (Pearce *et al.*, 1986; Horák *et al.*, 1998b) a produkci enzymů konvertujících polynenasycené mastné kyseliny v eikosanoidy, které hrají roli v imunosupresi a vasodilataci (Nevhutalu *et al.*, 1993). Průnik samotný tak vyvolává svědění, vyrážku a zarudnutí, přičemž reakce kompatibilního hostitele je mnohem mírnější než bouřlivé reakce imunizovaných nekompatibilních hostitelů (v případě nákazy savce ptačí trichobilharzií) (Basch, 1991 v Horák *et al.*, 2002).

Kožní fáze infekce vzbuzuje určitou reakci imunity na přítomnost patogenu v závislosti na tom, zda došlo k setkání s antigenem prvotně či opakovaně. V kůži myši prvně infikované *T. regenti* lze detekovat prozánětlivé cytokiny IL- β 1, IL-6 a IL-12p40, a také IFN- γ , což naznačuje kombinaci Th1 a Th2 imunitní odpovědi (Kouřilová *et al.*, 2004), zatímco kůže opakovaně exponovaná těmto penetrujícím cercáriím obsahuje jiné složky imunity, a to například histamin, IL-4, IL-10, IL-5, které demonstrují Th2 polarizaci imunitní odpovědi doprovázené zvýšenou hladinou specifických protilátek v séru (Kouřilová *et al.* 2004; Lichtenbergová *et al.*, 2008). Současně vždy dochází lokálně k navýšení množství eozinofilů, makrofágů, CD4+ T lymfocytů a mastocytů (Kouřilová *et al.*, 2004).

Obdobně infekce myši cercáriemi *S. mansoni* indukuje zpočátku Th1 imunitní odpověď, ale časem dochází ke změně na dominující Th2 odpověď. Ukázalo se, že za tuto změnu může stimulace imunitního systému vajíčky parazita (Pearce *et al.*, 1991).

Přežívání cercárií, potažmo schistosomul v kůži hostitele se liší jak mezi jednotlivými druhy, tak i mezi případy primární a opakované infekce. Ptačí motolice lze v ptačí i myší kůži detekovat až 3 dny po infekci (Haas & Pietsch, 1991), při opakovaných infekcích jsou schistosomula zaznamenávána i po delší dobu, ale většina jich je zachycena v mělčích vrstvách kůže, nebo postupují pomaleji (Ellis *et al.*, 1975). Lidské schistosomy se v savčí kůži chovají různě; kožní fáze migrace *S. mansoni* a *S. haematobium* mají podobný průběh, pomalejší než ptačí schistosomy, naopak schistosomulum *S. japonicum* se dokáže do krevního oběhu dostat již během několika hodin (Haas & Pietsch, 1991; He *et al.*, 2002). Překonání bariéry mezi vodou a prostředím hostitelského organismu a přizpůsobení se mu, a setkání s hostitelským imunitním systémem je vždy zásadním momentem omezujícím množství přeživších parazitů (Clegg & Smithers, 1968). Většina penetrujících jedinců je obrannými mechanismy zadržena v kůži a nedokáže pokračovat v migraci (Appleton, 1986; Horák & Kolářová, 2000; Haas & Pietsch, 1991).

V plicích vyvolává přítomnost schistosomul lokální záněty a buněčné infiltráty formující se v okolí cév a tkání, kde dochází k výměně plynů, a ve stěnách průdušek. Tvorbu plicních nodů a infiltraci lymfatických buněk vyvolávají ptačí motolice i v savčích modelech při primoinfekcích, přestože déle nepřežívají a infekce dále nepostupuje (Chanová *et al.*, 2007). I zde reakce imunitního systému a s tím související zdravotní problémy velmi závisí na tom, zda došlo k infekci poprvé, nebo opakovaně. Opakovanými infekcemi je reakce na parazita zvýšena a bariéra snižující počet dále migrujících jedinců

se posouvá blíže k místu invaze, takže při první infekci je většina červů eliminována v plicích, při dalších již v kůži (Ellis *et al.*, 1975).

Vliv dospělých červů na organismus závisí na jejich množství, opakovanosti infekce, imunitním stavu hostitele a jeho věku. Zvýšený počet dospělých červů vede k jejich atypické lokalizaci do různých orgánů distribucí cévním systémem (Bourns *et al.*, 1973; Wojcinski *et al.*, 1987; Horák *et al.*, 2002). Opakované infekce a vyšší věk vedou u ptáků k větší rezistenci proti trichobilharziím (Ellis *et al.*, 1975). Na druhou stranu labuť a husy silně nakažené viscerálními trichobilharziemi vykazovaly značné množství patologií, jako obstrukce střevní stěny, léze, vyzáblost, snížený průsvit cév, trombózu, hepatomegalii, fibrinohemorhagickou kolitidu apod., které mohly být příčinu jejich úmrtí. (Wojcinski *et al.*, 1987; van Bolhuis *et al.*, 2004).

U lidí je jako jeden z prvních klinických projevů nákazy lidskými schistosomami, kromě dermatitidy, popisována horečka Katayama (angl. Katayama syndrome). Souvisí s prvotní reakcí imunity na infekci parazitem, jeho migraci a počátek kladení vajíček dospělci. Objevuje se 14-84 dní od počátku nákazy a je diagnostikována především u cestovatelů, kdy je cestovatelská anamnéza a indikace setkání s možnou kontaminovanou vodou zásadní. Projevy jsou systémově nespecifické, zahrnují horečku, kašel, bolesti svalů, hlavy a břicha. K diagnóze pak vede především eozinofilie, zvýšené hladiny protilátek a detekce vylučovaných vajíček (Ross *et al.*, 2007).

Chronické onemocnění zvané schistosomóza je způsobeno množstvím nakladených vajíček jakožto hlavním patogenním agens, která jsou krevním řečištěm zanesena do různých tkání v těle, kde mohou indukovat imunitní reakce a způsobovat progresivní poškození orgánů. Lokální záněty kolem zachyceného vajíčka, zvýšené množství granulomů a následná fibróza tkáně mohou vést k obstruktivnímu onemocnění urogenitální soustavy (u *S. haematobium*) nebo trávicího systému včetně jater (u *S. mansoni* a *S. japonicum*) (Gray *et al.*, 2011; Hinz *et al.*, 2017). Závažné pak mohou být i po letech se projevující příznaky schistosomózy nervové soustavy včetně mozku (Liu, 1993), nebo plic (Souza *et al.*, 1993).

Trichobilharzia regenti je ptačí motolice s unikátní migrační strategií. Přestože nazálních ptačích druhů je několik a savčí minimálně jeden, pouze u tohoto byl popsán neobvyklý způsob, jakým se dostane do místa definitivní lokalizace – nervovou soustavou. U ptáků infekci v některých případech doprovázejí paralýzy končetin a další neuromotorické poruchy, které mohou dále vést až k selhání organismu.

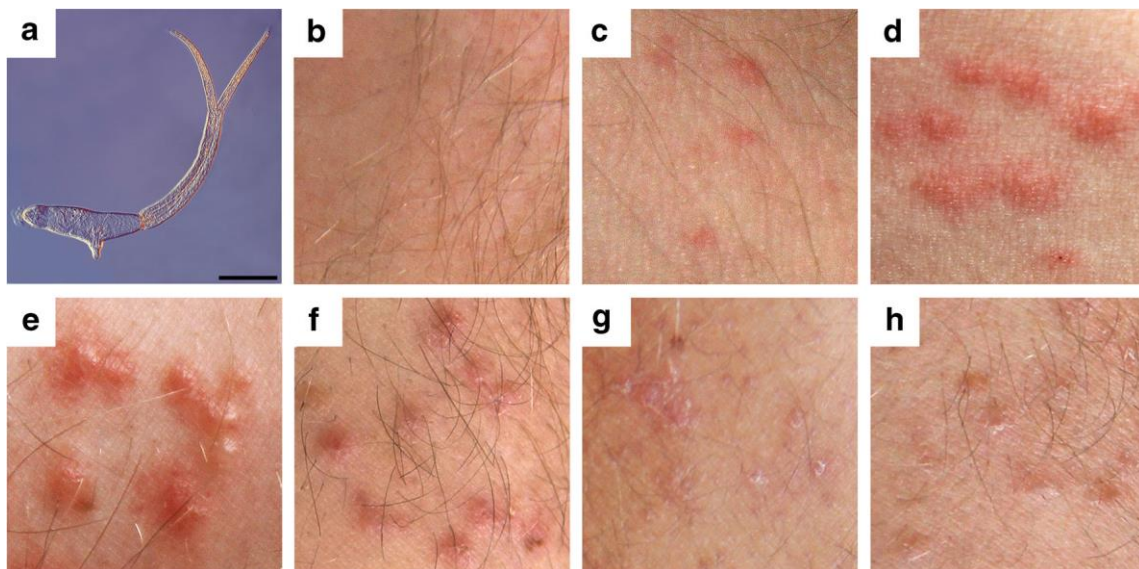
V imunokompetentním nespecifickém savčím hostiteli (myši) byla schistosomula *T. regenti* nalezena nejdále v prodloužené míše a mozečku, velmi vzácně v mozkových hemisférách, a nikdy v čichové oblasti mozku ani nosní sliznici (Horák *et al.*, 1999, Hrádková & Horák, 2002). Značná část putujících larev je zachycena v míše, kde je následně vyvolán zánět, navíc intenzivnější v nespecifickém hostiteli, obklopující umírající jedince, což má pravděpodobně největší vliv na patogenitu tohoto druhu (Kolářová *et al.*, 2001). Ve střevě nedospělého červa byly nalezeny složky nervové tkáně, jako myelin, oligodendrocyty, neurofilamenty a β -amyloidprecursor protein (β – APP), což dokazuje, že se tento parazit nervovou soustavou přímo živí (Lichtenbergová *et al.*, 2011). Právě tyto jevy jsou hlavním předmětem diskuse o možnosti nebezpečí pro ptáky i savce, respektive pro člověka. Vztah mezi poruchou nervové soustavy a infekční dávkou, případně stavem imunitního systému v přirozených i nekompatibilních hostitelích není zcela zřejmý, výsledky studií se příliš neshodují (Horák *et al.*, 1999; Hrádková & Horák, 2002) a stále je třeba je blíže specifikovat. Patogenita spojená s diseminací vajíček mimo nosní sliznici u tohoto druhu nebyla popsána.

3.2.1 Cerkáriová dermatitida

W. W. Cort (1928) poprvé identifikoval larvální stádia rodu *Trichobilharzia* jako infekční agens způsobující alergické reakce u lidí po kontaktu s vodou přírodní nádrže. Onemocnění se vyskytuje celosvětově s jistotou již desítky let a má různé místní názvy, v angličtině je např. vžitý pojem „swimmer’s itch“ (Horák *et al.*, 2002). Tento projev infekce se objevuje především po opakovaném setkání s daným parazitem (Olivier, 1949), kdy již primárně došlo k senzibilaci, ačkoliv i u naivních případů se mohou objevit obtíže v menší míře (Macháček *et al.*, 2018). Cerkárie pronikají do kůže savce, kterou rozeznávají stejně jako kachní, dokonce ochotněji (Haas, 2003). V místě penetrace se vytvářejí svědivé pupínky, edém, léze, kožní zarudnutí (Obr. 2), dochází k aktivaci imunitního systému a v některých případech se mohou objevit i poruchy spánku či stavy vyžadujícího lékařskou pomoc. Kožní problémy mohou trvat i několik týdnů (Hoeffler, 1974; Chamot *et al.*, 1998; Horák *et al.*, 2002; Macháček *et al.*, 2018). Léčba je však pouze symptomatická.

Infikovaní plži mohou i přezimovat a jakmile se začne na jaře oteplovat, mohou se již cercárie uvolňovat (Dvořák *et al.*, 1999). Vyšší prevalence cercáriové dermatitidy nastává během léta, kdy dochází k častějšímu kontaktu lidí s vodou a ke zvýšenému uvolňování cercárií z plžů (Chamot *et al.*, 1998). U jednotlivých případů záleží především na délce kontaktu s vodou. Například brodicí se děti (Appleton & Lethbridge, 1979), pracovníci na

rýžových polích (Appleton, 1984) nebo terénní biologové (Cort, 1928) jsou častějším cílem, neboť se ve vodě v určitém místě pohybují pomaleji a po delší časový interval, tudíž v případě přítomnosti infikovaných plžů v jejich blízkosti je riziko nákazy téměř 100% na rozdíl od plavců, kteří se aktivně pohybují. Globální změny klimatu ovlivňující chování hostitelů motolic vedou mimo jiné i ke zvýšení efektivity životního cyklu (Mas-Coma *et al.*, 2009), proto je dnes toto onemocnění označované jako znovu, respektive stále častěji se objevující („re-emerging“).



Obr. 2. Původce a příklady lokálních projevů cercariové dermatitidy. a Cercárie *Trichobilharzia szidati* (měřítko 200 µm); **b** zdravá kůže; **c-h** reakce kůže na invazi cercárií (Macháček *et al.*, 2018)

3.3. Diagnostika schistosomatidóz

Pro diagnostiku nákazy je obvykle třeba kombinace více metod, případně vícenásobné odebírání vyšetřovaného vzorku. Některé metody nejsou dostatečně citlivé k nízkým infekcím, některé zase nejsou dostatečně specifické. Vhodnou metodu je také potřeba volit v závislosti na požadovaném výstupu; v epidemiologii probíhá obvykle primárně screening, při kterém lze odhalit i asymptomatické jedince, a poté samotná diagnóza. Na diagnostické metody jsou kladeny různé nároky. Základními parametry jsou specifita (dostatečné odlišení zdravých od infikovaných, případně spolehlivé určení druhu původce onemocnění) a senzitivita (skutečné odhalení pozitivní infekce), dále cena, dostupnost, technologická náročnost apod. Vhodný diagnostický model je závislý na individualitě případu, respektive epidemiologickém specifiku dané lokality, možnostech získání materiálu a konkrétních cílech diagnostiky (Knopp *et al.*, 2015; Weerakoon *et al.*, 2015).

Přímou diagnostikou se detekuje parazit *přímo*, tedy jeho přítomnost se potvrdí přímým nalezením jeho součástí, ať už jde o části těla (identifikace jedince či jeho části v odebraném materiálu, vyloučená vajíčka) nebo z něj pocházející konkrétní biomolekuly. Oproti tomu v nepřímé diagnostice se využívá afinity protilátek vytvořených účelově v přítomnosti patogenu. Jejich specifita však není vždy spolehlivá.

3.3.1 Mikroskopické vyšetření

Prvotní diagnostickou metodou je detekce vajíček uvolňovaných z definitivního hostitele do vnějšího prostředí. Tu lze uplatnit stejným způsobem u lidských schistosom i u ptačích trichobilharzií, tedy mikroskopicky v trusu/stolici u viscerálních druhů (Appleton, 1986; Katz *et al.*, 1972), v lidské moči u *S. haematobium* či výplachem nosní dutiny ptáka u *T. regenti* (Horák *et al.*, 1998a). Tato metoda může odlišit jednotlivé druhy dle morfologie vajíček (např. Horák *et al.*, 2002; Appleton, 1986) i kvantitativně určit intenzitu infekce a pozitivní nález je jednoznačným výsledkem. Zároveň je poměrně levná, rychlá a velmi specifická. Nicméně nízká prevalence, počáteční infekce či její nízká intenzita (Weerakoon *et al.*, 2015) a denní nepravidelnost vylučování vajíček (Rau *et al.*, 1975; Lewis & Tucker, 2014) zásadně snižují senzitivitu testu a zvyšuje se pravděpodobnost falešně negativního výsledku. Efektivitu vyšetřování trusu/stolice lze zvýšit koncentračními metodami – například formol-etherovou sedimentací, flotací, centrifugací (Truant *et al.*, 1981), nebo cíleným vychytáváním vajíček díky jejich schopnosti elektrostatické interakce s povrchem magnetických kuliček (Teixeira *et al.*, 2007; Candido *et al.*, 2014), případně detekcí líhnoucích se miracidíí (Appleton, 1986) a vícenásobným vyšetřením v čase.

Intenzita infekce, v počtu vajíček na gram vzorku, je průměrně u ptáků mnohem nižší než u lidí; silné infekce se u ptáků pohybují v desítkách kusů na gram (Appleton, 1986), zatímco těžké infekce u lidí jsou počítány na stovky vajíček na gram (De Jonge *et al.*, 1988). V klinické diagnostice především lidských schistosom pak lze vajíčka detekovat přímo v biopticky odebrané tkáni v případě, že parazit nebyl odhalen jinými diagnostickými testy (Gray *et al.*, 2011). U ptáků se běžně mikroskopicky určuje infekce i během pitvy. V případě, že navzdory klinickým příznakům silně naznačujícím schistosomózu nebyl parazit prokázán mikroskopicky, lze přistoupit k dalším biochemickým a molekulárním metodám, které jsou zpravidla citlivější.

3.3.2 Molekulární metody

Nejmodernější metody diagnostiky využívají možnost namnožení a vizualizace specifických malých úseků DNA, kterou je možné získat izolací z buněk, tedy v případě nálezů parazitem z infikované tkáně, nebo z tělních tekutin, tzv. cell-free DNA (Weerakoon *et al.*, 2017). Klasicky je v polymerázové řetězové reakci (PCR) z celkové izolované DNA pomocí primerů (homologických oligonukleotidů) namnožena a následně determinována požadovaná sekvence. Potvrzení přítomnosti této sekvence ve vzorku pomocí metod sekvenace DNA a porovnání s databázemi odpovídá pozitivnímu nálezu. Znamená to tedy, že relativně snadné a rychlé možnosti detekce předchází komplikovaný a obtížný optimalizační proces, ve kterém je nutné charakterizovat dostatečně vhodnou, druhově (případně rodově) jedinečnou sekvenci, pro kterou by se daly primery navrhnout.

PCR a její další modifikace jsou velmi senzitivní i specifické a představují užitečný nástroj i na komplexní detekci (Tavares *et al.*, 2011). Nevýhodou těchto metod je vyšší cena potřebných reagensů oproti tradiční mikroskopii a nutnost speciálních přístrojů, proto zatím nejsou příliš aplikovatelné přímo v terénu v oblastech, kde je výskyt zásadních schistosom největší. V klinické a veterinární laboratorní diagnostice jsou však molekulární metody diagnostiky parazitárních nálezů již užívané běžně.

Zatímco lidské schistosomy podléhají globálnímu a velmi intenzivnímu výzkumu, který již přinesl mnoho možností molekulární detekce (např. Hamburger *et al.*, 2001), ptačí schistosomy jsou v tomto ohledu relativně pozadu. Přestože se molekulární metody detekce trichobilharzi používají v rámci monitorování jejich výskytu na určitém území (Hertel *et al.*, 2002; Jothikumar *et al.*, 2015), jejich aplikace na determinaci nákazy obratlovcích hostitelů není definována. Velmi dobře funguje molekulární detekce infekce u meziphostitelů – plžů (Ferté *et al.*, 2005), a to i víceméně neinvazivně po izolaci DNA parazita z hemolymfy odebrané hemálním pórem plže (Šteiger, 2018).

3.3.3 Imunologické metody

Imunologické metody zahrnují celou škálu procesů, při kterých se využívá schopnosti specifické vazby protilátky na nějakou strukturu parazita a možnosti tuto vazbu detekovat, přičemž dochází k různým modifikacím různých postupů (Bartůňková & Paulík, 2011). Zde se zaměřuji především na detekci antigenů parazita a protilátek, které se na ně vážou.

Protilátky jsou složky imunitního systému, které se vytvářejí v těle hostitele a specificky se vážou na cizorodé molekuly, jejichž původ může být právě parazitární.

Vazba protilátek hostitele na antigeny parazita je využívána v nepřímé diagnostice nákazy. Čisté protilátky vázající jednu konkrétní strukturu (epitop), tzv. monoklonální protilátky, se vyrábějí *in vitro* pro použití ve výzkumu i diagnostice.

3.3.3.1 Detekce parazitárních antigenů

Ve vyšetřovaném vzorku séra, slin nebo moči lze také detekovat parazitární antigeny, tedy molekuly vytvářené přímo parazitem. Tato detekce může probíhat přímo zachycením parazitárního antigenu pomocí monoklonálních protilátek. Kombinace metod zaměřených na parazitární antigeny může představovat snadný nástroj, který odhalí nákazu i při nízkých či počátečních infekcích, kdy jsou mikroskopická vyšetření negativní (De Jonge *et al.*, 1988; Al-Sherbiny *et al.*, 1999). Detekovat lze antigeny všech stádií interagujících s definitivním hostitelem, tedy cercárií, migrujících schistosomul, dospělců a vajíček. Diagnóza se pak liší specifitou a senzitivitou; nejlepší výsledky u lidských schistosom (až 100% senzitivitu) vykazují antigeny dospělých červů (Sarhan *et al.*, 2014). Mezi ně patří i nejdříve využívaný cirkulující katodický/anodický antigen (CCA/CAA), který je produkován epiteliálními buňkami střeva parazita a lze jej izolovat z mikrozomální frakce dospělců (Deelder *et al.*, 1976). Tyto antigeny jsou dobře detekovatelné v krvi i moči nakažených jedinců a zvláště pro diagnózu střevní schistosomózy způsobené *S. mansoni* byl pro CCA vyvinut rychlý test moči, ve které jsou tyto proteoglykany ledvinami koncentrovány (De Jonge *et al.*, 1988; Ochodo *et al.*, 2015). Pozitivita na cirkulující antigeny přímo souvisí s probíhající infekcí, a tudíž jsou po vyléčení výsledky opět negativní (van Lieshout *et al.*, 1994; De Jonge *et al.*, 1989). Cirkulující antigeny jsou v předu zájmu optimalizace diagnostiky, jak dokazuje nedávno představený ultra senzitivní test na *S. mansoni* pro případy velmi nízkých intenzit infekcí (Sousa *et al.*, 2019).

Většina primárních analýz je v literatuře opět zaměřena na *S. mansoni*, kdy často dochází ke zkřížené reaktivitě protilátek s antigeny *S. haematobium*, které jsou buď stejné, nebo velmi podobné. Pro přesné stanovení diagnózy je tak zapotřebí odhalit dostatečně druhově specifické antigeny. Pro detekci nákazy ptačími schistosomami nebyly tyto metody doposud používány.

3.3.3.2 Detekce protilátek hostitele

Mezi nejčastější imunologické metody detekce protilátek patří především ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a její modifikace (např. Yu *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012) a imunoblot (resp. western blot; např. Tsang & Wilkis, 1997;

Turjanicová *et al.*, 2015). Pro ptačí schistosomy však doposud nebyl odhalen dostatečně druhově specifický a senzitivní antigen, který by se dal izolovaně využít pro jednoznačnou diagnostiku. Naopak díky významu lidské schistosomózy je (nejen) imunologických metod založených na detekci protilátek ohromné množství (Hamilton *et al.*, 1998; Weerakoon *et al.*, 2015). Cílem je neustále vylepšovat všechny parametry dané metody a optimalizovat celý proces.

Protilátky hostitele lze nalézt v krvi, respektive plazmě či séru, nebo i v moči. Elhag *et al.* (2011) potvrdili, že moč pacientů nakažených *S. mansoni* je srovnatelně vhodným vzorkem pro testování přítomnosti specifických protilátek jako sérum.

Protilátky se při nákaze vytvářejí specificky s určitou schopností vazby na antigen, tedy na struktury, případně exkrečně sekreční produkty parazita. Infekci pak lze potvrdit detekcí této vazby za použití antigenů parazita, případně jeho konkrétních definovaných proteinů, a reakční směsi kolorimetricky detekující navázané protilátky. Obvykle se používá antigen *S. mansoni* pro diagnózu všech tří lidských schistosomóz, například antigen vajíček, SmSEA (*S. mansoni* Soluble Egg Antigen). Ten však lze nekomerčně získat pouze z množství vajíček z laboratorně nakažených zvířat (zpravidla hlodavců), a tudíž je velmi neekonomický. Obdobnou možností je antigen exkrečně-sekrečních produktů transformovaných cercárií, SmCTF (*Schistosoma mansoni* Cercarial Transformation Fluid), který podává srovnatelné výsledky (Smith *et al.*, 2012), ale také u něj byla (stejně jako u rozpustného antigenu vajíček) prokázána zkřížená reaktivita s protilátkami subjektů s nákazou jinými helminty (Chand *et al.*, 2010; Kinkel *et al.*, 2012). Tento problém však řeší odlišný klinický obraz onemocnění, případně další testy.

Pro imunodetekci některých ptačích schistosomatidóz vychází lépe užití antigenu z cercariálního homogenátu než ze schistosomul (Turjanicová *et al.*, 2015). Neproběhlo však zatím dostatek testů s experimentálními nákazami. Séra z kachen nakažených *T. regenti* obsahují vysoce specifické protilátky, které mohou charakterizovat průběh infekce od samého počátku (Turjanicová *et al.*, 2015). Nákazy jinými druhy ptačích motolic však nebyly v tomto ohledu dostatečně charakterizovány, ani nebyla otestována případná zkřížená reaktivita antigenů mezi nimi.

Metodou imunoblotingu lze odhalit konkrétnější struktury, na které protilátky reagují, přímo ve směsi antigenů. Pro identifikaci konkrétního druhu parazita se například používá sér pacientů a mikrosomálního extraktu dospělých červů, přičemž specifita je dána vyšší reaktivitou séra pacientů s danou nákazou proti příslušnému antigenu než při zkřížené

reakci (Tsang *et al.*, 1984; Tsang & Wilkis, 1997). Pro přesnější a specifitější detekci je ovšem vhodnější používat místo směsi antigenů jeden purifikovaný protein nebo izolovanou komponentu parazita, například antigen tegumentu schistosomul v případě *S. mansoni* (SmTeg), který vykazuje pozitivní reakci již 7 dní po infekci myši (Grenfell *et al.*, 2013), případně využít rekombinantní proteiny původem z parazita. Tanigawa *et al.* (2015) testovali několik definovaných rekombinantních proteinů *S. mansoni*, ze kterých jediný byl druhově specifický a senzitivní pro diagnostiku nákazy a jeden vykazoval zkříženou reaktivitu se séry při nákaze *S. haematobium*. Nepřímé metody tedy mohou odhalit potenciální cíle pro diagnostiku přímou.

3.3.3.3 Imunogenní struktury

Naměřená zvýšená hladina protilátek určí, jaký antigen má diagnostický potenciál. Z něj pak lze dalšími procesy získat co nejkonkrétnější strukturu (epitopy), která je za reakci s protilátkami zodpovědná. Identifikace konkrétních imunogenních struktur a složek má za cíl kromě diagnózy i vývoj léčiv a vakcín (McWilliam *et al.*, 2012). Například El Ridi *et al.* (2004) vytvořili peptidy odvozené od parazitární glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy, z nichž některé zafungovaly jako účinný imunogenní faktor chránící myši před opakovanými infekcemi *S. mansoni*. Tento konkrétní antigen byl identifikován i IgE a IgG protilátkami myši infikované ptačí schistosomou *T. regenti* v cercariálním homogenátu.

Obdobně byl u této motolice určen pomocí hmotnostní spektrometrie i další antigen s diagnostickým potenciálem – triosa-fosfát izomeráza (Kašný *et al.*, 2009). Dle odhadnuté velikosti molekul byli na základě podobnosti se strukturami detekovanými z *S. mansoni* odhalené i glutathion S-transferáza, a pravděpodobně paramyosin nacházející se v tegumentu schistosomul (Chanová *et al.*, 2012). Kromě hmotnostní spektrometrie a detekce molekulové velikosti je možné souvislost potenciálního antigenu s již popsaným odhadovat na základě určené lokalizace, jako u zmíněného paramyosinu, který byl popsán v tegumentu a postacetabulárních žlázách lidských schistosom, což by odpovídalo nálezu právě v *T. regenti*. Charakterizace antigenů trichobilharzií však není na takové úrovni jako u lidských schistosom, u kterých byla odhalena celá řada specifických antigenů pro daný druh, původem z cercárií, schistosomul, dospělců i vajíček. Hinz *et al.* (2017) shrnuje testované antigeny pro nejdůležitější druhy rodu *Schistosoma* vzhledem k jejich specifitě k danému druhu.

Diagnóza schistosomózy na základě detekce protilátek, na rozdíl od jiných nákaz helminty, není schopná spolehlivě odlišit akutní fázi onemocnění od chronické, respektive dříve prodělané nebo opakované, neboť protilátky přetrvávají v séru po vyléčení/odeznění infekce různě dlouho v různých koncentracích a dlouhodobý vliv parazita je u jednotlivců poměrně individuální (Lichtenbergová *et al.*, 2008; Caldas *et al.*, 2008; Weerakoon *et al.*, 2015). Vysoká senzitivita sérodiagnózy (88 %) navíc vychází především z testování chronických, tedy dlouhodobých případů (Soentjens *et al.*, 2014). Beck *et al.* (2008) testovali různé skupiny protilátek na možnost odlišení akutní a chronické fáze a zjistili, že dvě třídy imunoglobulinů (IgA a IgM) mohou být v kombinaci s vhodným antigenem použitelné pro takové testování. Lze je však využít až po samotné identifikaci nákazy pouze pro odlišení dané fáze (chronická nebo akutní), neboť se jedná o test velmi nespecifický.

Spíš, než čistě podle stavu složek imunitního systému by mohlo být možné fázi infekce odhadnout podle detekovaného stádia, které se zrovna v těle nalézá, nebo přinejmenším v nedávné minulosti nalézalo, a nejlépe kombinací více metod (např. Kouřilová & Kolářová, 2002; Lichtenbergová *et al.*, 2008; Sarhan *et al.*, 2014; Macháček *et al.*, 2018). Při tomto přístupu ovšem diagnózu opět komplikují opakované infekce.

3.4. Ptáčí protilátky – imunoglobuliny

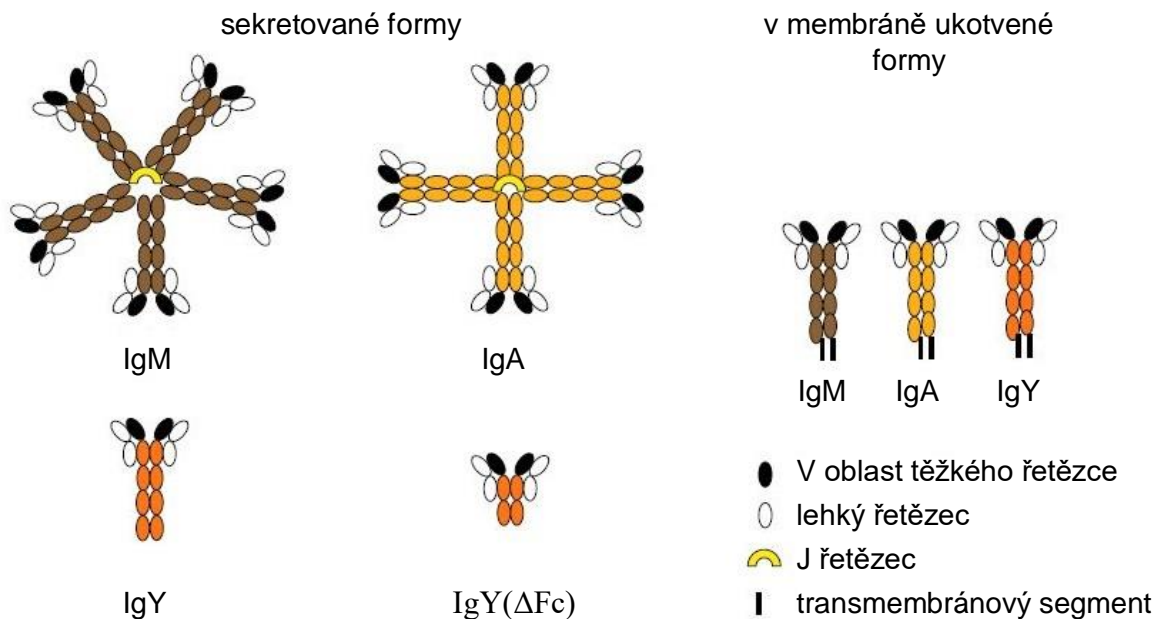
Imunita ptáků vykazuje oproti savcům jistá specifika. Tato linie obratlovců si vyvinula jinou strategii vzniku repertoáru primárních komponent humorální složky imunity. Především ptáci disponují speciálním orgánem, kritickým ve vývoji B-buněk (producentů imunoglobulinů), který je nazýván Fabriciova bursa. Tento orgán vzniká kolem 4. dne embryogeneze a mezi 8. a 11. dnem jej začnou kolonizovat lymfocytární kmenové buňky (Moore & Owen, 1966). Do 2-4 týdnů po vylíhnutí ptáka folikuly uvnitř orgánu ještě prolifерují, až dosáhnou počtu kolem 10 000 (Olah & Glick, 1978). Jakmile pták dosáhne pohlavní dospělosti, což je přibližně ve 4. až 6. měsíci, bursa začne atrofovat (Glick, 1977). Ptáci tedy mají sadu protilátek determinovanou již na počátku ontogeneze a netvoří, na rozdíl od savců, nové varianty po zbytek života (McCormack *et al.*, 1991).

Fabriciova bursa není esenciální pro diferenciaci B-buněk a uspořádávání řetězců imunoglobulinů, je však důležitá pro vznik dostatečné variability. Zásadním je období kolem 18. dne embryogeneze, kdy odstranění bursy vede k deficienci veškerých B-buněk (McCormack *et al.*, 1991). Po této době již dochází k uvolňování B-buněk do organismu.

Imunoglobuliny se v těle nacházejí volně především v krvi a žluči, nebo vázané na povrchu B a T lymfocytů. Strukturně se jedná o konzervovaný komplex lehkých a těžkých řetězců, jejichž variabilita je dána somatickou genovou konverzí jednotlivých segmentů (Reynaud *et al.*, 1989).

Přestože je všeobecně známo, že i ptáci, stejně jako savci, mají adaptivní imunitní odpověď a vytváří specifické protilátky, jednotlivé mechanismy jsou popsány většinou pouze ze studií na kuřatech (Galliformes). Místy se objevují jen jednotlivé unikátní práce, například testování zkřížené reaktivity imunoglobulinů mezi různými druhy papoušků (Psittaciformes) (Baghian *et al.*, 1999) nebo charakterizace tříd imunoglobulinů pštrosa dvouprstého (*Struthio camelus*) (Cadman *et al.*, 1994). Druhou nejvíce poznanou skupinou z tohoto hlediska jsou kuřatům relativně blízké kachny (Anatidae). I mezi těmito skupinami jsou jisté zásadní rozdíly, jako je například přítomnost lymfatických uzlin u kachen, a proto nelze jedny poznatky automaticky aplikovat obecně (Lundqvist *et al.*, 2006).

Ptáci mají 3 třídy imunoglobulinů: IgM, IgY a IgA (Obr. 3). Kachny mají navíc jednu menší formu IgY, označovanou jako IgY(Δ Fc).



Obr. 3. Schématická struktura jednotlivých tříd kachních protilátek. (Lundqvist *et al.*, 2006)

IgA

Nejzastoupenější jsou ve vaječném bílku, žluči a střevních sekretech, kde chrání sliznici před invazí patogenů (Lillehoj & Trout, 1996). V porovnání s kuřaty jsou tyto imunoglobuliny u kachen sekretovány ve sliznici dýchací a trávicí soustavy opožděně, a tudíž jsou kachňata náchylnější k infekčním onemocněním. Posun v produkci těchto protilátek je zřejmě dán jiným evolučním stupněm kachen oproti kurům (Magor *et al.*, 1998).

IgM

Jedná se o evolučně nejstarší typ, který lze nalézt u všech čelistnatců, a tudíž je společný savcům i ptákům (Tizard, 2002). V případě zahájení protilátkové odpovědi je tento typ první, u kterého se v séru zvyšuje hladina (Ratcliffe, 2006).

Tato třída protilátek se nalézá v séru i žluči kachen jako rozpuštěný polymer a zároveň má formu monomeru vázanou na povrchu B lymfocytů jako receptor pro antigeny (Ng & Higgins, 1986). Na základě porovnání velikosti s kuřecím pentamerem IgM a tetamerem IgM kostnatých ryb bylo usouzeno, že se u kachen též jedná o pentamer (Lundqvist *et al.*, 2006). Nejčastěji jsou tyto imunoglobuliny detekovány ve vaječném bílku a krevním séru, v menším množství i ve střevě, žloutku a séru čerstvě vylíhnutých ptáků. Protože je multivalentní, tzn. má 10 vazebných míst pro antigen, má tendenci být mnohem efektivnější než IgY v imunologických testech využívajících aglutinaci (Tizard, 2002).

IgY

Z fylogenetického hlediska souvisí protilátky třídy IgY a protilátkami tříd IgG a IgE u savců, se kterými byly dříve synonymizovány (Leslie & Clem, 1969). Nejzastoupenější jsou v krevním séru a žloutkovém váčku. Jak již bylo zmíněno výše, kromě obvyklé formy IgY mají kachnovití ptáci (Anatidae) navíc zkrácenou verzi, označovanou jako IgY(Δ Fc), neboť postrádá Fc část (konstantní fragment), díky čemuž nemůže zastávat funkci plnohodnotné protilátky v aktivaci komplementu či vazbě na Fc receptor buněčných složek imunitního systému (Tizard, 2002). Funkce této formy patrně souvisí s tvorbou imunokomplexů a ovlivňování zánětlivých reakcí při přechodu z akutní do chronické fáze infekce (Humphrey *et al.*, 2004). Tato strukturální deficience může snižovat sílu hypersenzitivní reakce, čehož by bylo možno využít například při podávání protilátek v imunoterapii u lidí, což představuje potenciál dalšího výzkumu i v humánní medicíně (Kumpalume *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2011).

3.5 Modelové organismy

Všechny tři parazitární modelové organismy, se kterými jsem pracovala v průběhu experimentální části této diplomové práce, mají klasický životní cyklus schistosom zahrnující vodního plže jako mezihostitele a vodního ptáka jako definitivního hostitele. Liší se především ve finální lokalizaci dospělců a specifitě vůči mezihostiteli. Jejich výskyt na lokalitách je často souběžný.

Trichobilharzia szidati

Jedná se o typického zástupce ptačích schistosom, kterému jako mezihostitel slouží plovatka bahenní (*Lymnaea stagnalis*), vyskytující se běžně ve vodních nádržích. Transformovaná schistosomula vstupují v těle definitivního hostitele do krevního řečiště a jsou zanesena do plic. Následnou finální lokalizací dospělců jsou cévy mezenteria a stěna střeva. Uvolňovaná vajíčka se do vnějšího prostředí dostávají s trusem. Dříve byl v Evropě popisován také druh *Trichobilharzia ocellata*, La Valette, 1855 jako typový druh obecného charakteru biologie a morfologie cercárií v rámci rodu *Trichobilharzia*. Molekulární analýzy však rozdělení izolátů sjednotily a vyčlenily různé druhy, včetně *T. szidati*, z tohoto komplexu druhů hlášeného např. i z Japonska a Severní Ameriky (Rudolfová *et al.*, 2005).

Trichobilharzia franki

Několik příbuzných druhů plžů bylo původně určeno jako mezihostitelé pro tuto motolici. V případě nálezů cercárií v *Radix auricularia* a *Radix peregra* byly molekulárními analýzami definovány 2 haplotypové skupiny rozdělené dle vlastní preference: *T. franki* z *R. auricularia* (dle prvotního popisu druhu) a *T. franki* „peregra“, již je třeba blíže specifikovat dalšími experimentálními nákazami či nálezy (Jouet *et al.*, 2010). Dospělci jsou nacházeni v cévách střev a jater a vajíčka jsou do vnějšího prostředí uvolňována trusem od 13. dne po infekci.

Trichobilharzia regenti

Mezihostitelskými plži pro *T. regenti* jsou druhy *Radix peregra*, *Radix lagotis* a *Radix labiata*. Tento druh trichobilharzie patří na rozdíl od předchozích jako jediný v Evropě do skupiny nazálních schistosom a navíc vykazuje jedinečnou migrační strategii. Schistosomula v kůži vyhledají periferní nervy a následně putují míchou až do mozku. Dospělci jsou lokalizováni částečně v cévách a částečně v měkké tkáni nosní sliznice. Miracidia se líhnou již přímo v nosní sliznici a do vnějšího prostředí jsou vyplavována při kontaktu s vodou. Lze je detekovat kolem 20. dne infekce. Tento druh byl popsán z nálezů

v Jižních Čechách z rybníků Žoldánka a Podkadovský až v roce 1998 (Horák *et al.*, 1998a). Následující záchyty z Francie (Picard & Jousson, 2001), Polska (Rudolfová *et al.*, 2007), Ruska (Lopatkin *et al.*, 2010) a vysoká prevalence u vyšetřovaných vrubozobých ptáků v Česku (Rudolfová *et al.*, 2002) potvrzují, že se v rámci Evropy nejspíš též jedná o běžného parazita.

4. MATERIÁL A METODIKA

Pro použité chemikálie a složení pufrů viz Přílohu 1.

4.1 Modelové organismy

4.1.1 Plži

Pro získání antigenu vybraných parazitů byla sbírána infekční stádia z jejich příslušného mezihostitele: cercárie *T. szidati* z *Lymnaea stagnalis*, cercárie *T. regenti* z *Radix lagotis*, cercárie *T. franki* z *Radix auricularia/Radix sp.* Cyklus *T. szidati* a *T. regenti* je trvale udržován v laboratorních chovech Katedry parazitologie PřFUK. Sběr cercárií probíhá s minimálně dvoudenním rozestupem. Infikované *R. auricularia/Radix sp.* bylo nutné získat z přírodních lokalit vyšetřením divokých plžů na základě dřívějšího výskytu či aktuálních hlášení (Tab. 1). Plži jsou vyšetřováni na přítomnost aktivně se uvolňujících cercárií pomocí světla stejným způsobem, jakým jsou posléze cercárie sbírány pro další využití (kap. 3.1.2) s tím rozdílem, že jedinci jsou rozděleni do samostatných sklenic. Na základě zkušenosti bylo předpokládáno, že v případě *R. auricularia* se vždy jedná o nákazu *T. franki*, jelikož v ČR doposud nebyla v tomto mezihostitelském druhu plže nákaza jinou ptačí schistosomou zaznamenána. V jednom případě byl druh *T. franki* nalezen v *Radix sp.* (lokalita Chotěvice). Druh motolice byl potvrzen molekulárně (Pokrupová, osobní sdělení). Podle morfologie rozmnožovacích orgánů druhu plže se nejspíš jednalo o *R. labiata*, přesné určení pomocí molekulárních metod ale zatím provedeno nebylo.

Tab. 1. Zdroje nakažených plžů *R. auricularia/Radix sp.**

lokalita	souřadnice vodní nádrže	počet infikovaných plžů
Zákupy – Zákupský rybník	50.6799819N, 14.6530736E	X
Říčany – rybník Marvánek	49.9844814N, 14.6594236E	1
Čistá v Krkonoších – autocamp Slunečná	50.6141831N, 15.6964650E	4
*Chotěvice – RZ Svatá Kateřina	50.5007003N, 15.7773933E	2
Horka II	49.7320769N, 15.1337453E	1
Plzeň – Šídlovský rybník	49.7847714N, 13.3780122E	2
Příbram – Trhové Dušníky	49.7176144N, 14.0164236E	0

X – bez záznamu (starší sběr); * zdroj *Radix sp.*

4.1.2 Cerkárie

Pro získávání cercárií z vodních plžů byla využita jejich aktivace při vystavení intenzivnějšímu světlu a jejich pozitivně fototaktické chování. Plži byli umístěni do menších skleniček s odstátou vodou a ponecháni 2–4 hodiny pod umělým studeným osvětlením. Poté byli ze sklenic vyjmuti a vráceni do chovných akvárií. Ke sklenici s vyloučenými cercáriemi bylo přiloženo bodové světlo a během několika minut bylo možné z nejbližšího místa stěny sklenice cercárie odebírat plastovou pipetou do 50ml centrifugační zkumavky. Pokud bylo plžů větší množství (nad 20 jedinců), byly cercárie odebírány z osvětlené hladiny Erlenmayerovy baňky obalené hliníkovou fólií, do které byly ze sklenice přelity. Získané cercárie byly použity na experimentální nákazu kachen, nebo pro získání parazitárního antigenu.

4.1.3 Kachny

Všechny 3 druhy parazitů byly použity pro individuální nákazy definitivních hostitelů *Anas platyrhynchos* f. *domestica*, kmen Cherry Valley. Jednodenní kachňata jsou dovážena ze společnosti Perena spol. s.r.o., Chlumec nad Cidlinou. Chovné kachny jsou zde očkovány proti virové hepatitidě DHAV-1, *Salmonella typhimurium* a *Riemerella anatipestifer*. Kachny byly po celou dobu experimentu drženy v uzavřeném zvěřinci při 28 °C (první týden), 25 °C (druhý týden), 23 °C (třetí týden) nebo 18-20 °C (čtvrtý týden a dále). Počet kachen a doba trvání experimentu byly limitovány kapacitou zvěřince, časovými možnostmi a předností nálezů pro udržení cyklu *T. szidati* a *T. regenti*.

4.1.3.1 Infekce kachen

Nákaza probíhala dle postupu Meuleman *et al.* (1983). Infekční dávka *T. regenti* byla 1500 cercárií, *T. szidati* 3000-4000 cercárií, a *T. franki* 500-1500 cercárií v závislosti na výtěžku z divokých plžů. Věk kachen v den infekce byl 7-10 dní. Kachny byly vsazeny do oddělených nádob s vodou s cercáriemi ve stabilní poloze tak, aby měly obě končetiny ponořené, a ponechány 45 min. Každá kachna byla poté na končetinách označena barevným kroužkem pro odlišení (Tab. 2). Pro experiment bylo použito celkem 33 kachen rozdělených do 6 skupin označených písmeny N a R-V. Pro každou skupinu byla určena jedna kontrolní, neinfikovaná kachna. Po ukončení pokusu byla všechna experimentální zvířata usmrcena dekapitací. Nákazu, odběry sér a potvrzování infekce skupiny N (N1 a N2) prováděla Mgr. Libuše Turjanicová před zadáním této práce.

Tab. 2 Přehled experimentálních nákaz kachen.

skup.	označení	inf. druh	původ	dávka ≈ ks cerkáří	potvrzení infekce	úhyn/usmrcení
N1	TFN1	<i>T. franki</i>	Zákupy	1 500	15 DPI	† 39 DPI
	TFN2	<i>T. franki</i>	Zákupy	1 500		† 39 DPI
	TFN3	<i>T. franki</i>	Zákupy	1 500		† 39 DPI
	TFN4	<i>T. franki</i>	Zákupy	1 500		† 39 DPI
	KON1	-	-	-	-	† 18 DPI
	KON2	-	-	-	-	† 39 DPI
N2	TFN5	<i>T. franki</i>	Zákupy	1 500	15 DPI	† 39 DPI
	TFN6	<i>T. franki</i>	Zákupy	1 500		† 39 DPI
R	TFR	<i>T. franki</i>	Říčany	500	15 DPI	† 50 DPI
	KOR	-	-	-	-	† 50 DPI
S	TFS1	<i>T. franki</i>	Čistá v K.	1 000	20 DPI	† 50 DPI
	TFS2	<i>T. franki</i>	Chotěvice	500	XXX	† 50 DPI
	TFS3	<i>T. franki</i>	Horka II	600	21 DPI	† 50 DPI
	TSS1	<i>T. szidati</i>	chovy	3 500–4 000	17 DPI	† 50 DPI
	TSS2	<i>T. szidati</i>	chovy	3 500–4 000		† 50 DPI
	KOS	-	-	-	-	† 50 DPI
T	TFT	<i>T. franki</i>	chovy *	1 200	15 DPI	† 40 DPI
	KOT	-	-	-	-	† 40 DPI
U	TFU **	<i>T. franki</i>	chovy *	1 200	XXX	† 25 DPI
	TSU1	<i>T. szidati</i>	chovy	3 500–4 000	15 DPI	† 25 DPI
	TSU2	<i>T. szidati</i>	chovy	3 500–4 000		† 25 DPI
	TRU1	<i>T. regenti</i>	chovy	1 500	19 DPI	† 19 DPI na cyklus
	TRU2	<i>T. regenti</i>	chovy	1 500	20 DPI	† 20 DPI na cyklus
	TRU3	<i>T. regenti</i>	chovy	1 500	20 DPI	† 20 DPI na cyklus
	KOU	-	-	-	-	† 25 DPI
V1	TSV1	<i>T. szidati</i>	chovy	3 500–4 000	20 DPI	† 39 DPI
	TSV2	<i>T. szidati</i>	chovy	3 500–4 000		† 39 DPI
	TRV1	<i>T. regenti</i>	chovy	1 500	-	† 14 DPI na následky ochrnutí
	TRV2	<i>T. regenti</i>	chovy	1 500	19 DPI	† 19 DPI na cyklus
	TRV3	<i>T. regenti</i>	chovy	1 500	-	† 15 DPI na následky ochrnutí
	TRV4	<i>T. regenti</i>	chovy	1 500	19 DPI	† 19 DPI na cyklus
	KOV	-	-	-	-	†
	KOV2	-	-	-	-	†
V2	KOV→TRV5	<i>T. regenti</i>	chovy	1 500	-	† 11 DPI na následky ochrnutí
	KOV2→TRV6	<i>T. regenti</i>	chovy	1 500	19 DPI	† 19 DPI na cyklus

TFX – nákaza *T. franki*; TRX – nákaza *T. regenti*; TSX – nákaza *T. szidati*; KOX – kontrolní kachna; DPI – dny po infekci. *cerkářie z nákazy naivních *R. auricularia* mirácií získanými z TFS1 a TFS3; **kachna TFU byla ze souboru pro nepotvrzení nákazy a opakované negativní výsledky vyřazena

4.1.3.2 Odběry kachních sér

Periferní krev byla kachnám odebírána v pravidelných intervalech (Tab. 3) z *vena metatarsus*. Objem odebrané krve závisel na věku zvířete a pohyboval se kolem 1 ml. Krev byla v 1,5ml mikrozkrumavkách ponechána 30 min při laboratorní teplotě, během níž došlo ke sražení krevních komponent, a poté byla stáčena 5 min při

2000× g na centrifuze 5415R (Eppendorf). Oddělené sérum bylo přeneseno do nové mikrozkuřavky a uchováno při – 20° C.

Tab. 3 Přehled intervalů odběrů krve u jednotlivých experimentálních skupin

odběr	1	2	3	4	5	6	7	8	9
N1	0 DPI	2 DPI	4 DPI	7 DPI	9 DPI	14 DPI	19 DPI	29 DPI	39 DPI
N2	-2 DPI	2 DPI	5 DPI	7 DPI	9 DPI	14 DPI	19 DPI	29 DPI	39 DPI
R	0 DPI	4 DPI	9 DPI	14 DPI	19 DPI	29 DPI	39 DPI	50 DPI	
S	0 DPI	5 DPI	10 DPI	15 DPI	20 DPI	30 DPI	40 DPI	50 DPI	
T	0 DPI	5 DPI	10 DPI	15 DPI	21 DPI	25 DPI	30 DPI	40 DPI	
U	0 DPI	6 DPI	10 DPI	15 DPI	21 DPI	25 DPI			
V1	0 DPI	3 DPI	5 DPI	11 DPI	15 DPI	19 DPI	24 DPI	29 DPI	
V2	0 DPI	4 DPI	10 DPI	15 DPI	19 DPI				

Krev byla kachnám odebírána v rámci každé skupiny v předem stanovených intervalech. Písmena N a R-V označují jednotlivé skupiny (viz Tab. 2); čísla nad tabulkou označují pořadí odběru. DPI – počet dní po infekci; 0 DPI=odběr krve těsně před infekcí

Divokým kachnám a labutím byla krev odebírána z *vena cutanea ulnaris* (Tab. 4). U labutě označené Ws 8 byla potvrzená infekce viscerální trichobilharzií detekcí miracidíí z trusu (viz kap. 3.2). Krev byla odebírána přímo na lokalitě, kromě kachny Wd3 a labutě Ws12, které byly přivezeny do laboratoře.

Tab. 4. Divoké kachny a labutě – odebrané sérum

divoké labutě			divoké kachny	
lokality	číslo kroužku	označení	lokality	označení
Plzeň - Senecký rybník	LA1775	Ws1	Plzeň - Senecký rybník	Wd1
	LA1777	Ws2		
	LA1779	Ws3	Plzeň - výběh DES OP	Wd2
	LA1780	Ws4		
	LA1781	Ws5	Chotěvice - RZ Svatá Kateřina	Wd3
	LB7306	Ws6		
Plzeň - Bolevecký rybník	LA1600	Ws7		
	LA1762	Ws8*		
	LA1765	Ws9		
Plzeň - výběh DES OP	-	Ws10		
	-	Ws11		
Plzeň - Bolevecký rybník	LA1785	Ws12		

* u labutě Ws8 byla potvrzena infekce viscerální ptačí motolicí

4.2 Kontrola nákazy; udržování cyklu

Úspěšnost nákazy *T. szidati* a *T. franki* byla potvrzována mezi 15. a 21. dnem infekce vyšetřením trusu (Tab. 2). Kachny nakažené *T. regenti* byly 18. -20. den usmrceny kvůli získání vajíček pro nákazu plžů k udržení cyklu v laboratorním chovu.

Trus byl několikrát promyt vodou a částečně přečištěné usazeniny byly přelity do sběrné nádoby zakryté alobalem a s přiloženým světlem k hrdlu. Miracidia byla poté sbírána z osvětlené hladiny po 3-5 hodinách. Vypreparovaná nosní sliznice kachen nakažených *T. regenti* byla ponechána v malém objemu vody v Petriho misce, kde opět dochází k rychlému líhnutí larev z vajíček. Nákaza plžů probíhá v jamkách 24jamkových titračních destiček, infekční dávka byla 3 (pro mladé plže) až 10 (pro dospělé plže) miracidii na plže. Infekce probíhala přes noc. Vyšetření plžů na úspěšnost nákazy probíhala po 5 týdnech.

Miracidii *T. franki* bylo laboratorně nakaženo 16 ks *Radix sp.* z lokality Chotěvice a 3 ks *R. auricularia* z lokality Příbram (viz Tab. 1). Nákazy *T. regenti* a *T. szidati* probíhají pravidelně v počtu 300-400 infikovaných plžů pro udržení chovu.

4.3 Parazitární antigen

Pro získání antigenu konkrétního parazitického druhu byla sbírána infekční stádia vyloučená z plžů – cercárie – postupem zmíněným výše.

4.3.1 Homogenizace cercárií

Centrifugační zkumavky se získanými cercáriemi byly chlazeny na ledu, aby cercárie snížily svou aktivitu a klesly ke dnu, a poté byly centrifugovány při $4000 \times g$ a $4^\circ C$ na centrifuze 5804R (Eppendorf). Koncentrované cercárie byly přeneseny do 1,5ml zkumavky a objem byl doplněn fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem, pH 7,2 (PBS). Cercárie byly takto ještě $2 \times$ promyty PBS, a poté byl přidán $10 \times$ koncentrovaný inhibitor proteáz Complete Mini EDTA-free (Roche) v poměru 1:9.

Homogenizace probíhala 3×10 s při výkonu 10 W na sonikátoru Vibra Cell™72405 (Bioblock Scientific). Homogenát byl skladován pro další použití při $-80^\circ C$.

4.3.2 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích homogenátu cercárií byla měřena dle protokolu od výrobce proti standardům Quant-IT™ Protein Assaykitu (Invitrogen)

v 96jamkových černých mikrotitračních destičkách s plochým dnem (Nunc). Měření probíhalo na fluorometru Infinite M200 (TECAN) a bylo vyhodnoceno programem Magellan™. Kalibrační křivka standardů bovinního sérového albuminu byla v rozmezí 0–500 ng/μl.

4.3.3 Elektroforetická separace proteinů – SDS-PAGE

Homogenát cercárií všech tří druhů schistosom byl vertikálně separován elektroforézou ve 12% polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí Tris-glycinového pufru s příměsí dodecylsulfátu sodného (TGS) v elektroforetické cele Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) při konstantním napětí 150 V pro 2 gely. Na každý gel se separační IEF jamkou (Bio-Rad) bylo nanášeno 250–300 μg proteinu z homogenátu v redukujícím pufru NuPAGE® (Thermo Fisher Scientific). Jako marker molekulové velikosti bylo použito 8 μl Precision Plus Protein™DualXtra Standards (Bio-Rad).

4.4 Western blot

Separované proteiny byly z gelu přeneseny na Immuno-Blot PVDF membránu (Invitrogen) pomocí Trans-Blot Turbo Transfer systému (Bio-Rad) za konstantního proudu 1,3 A po dobu 17 min.

Z membrány byly odstřiženy markery a zbytek byl rozřezán vertikálně na 3 mm široké proužky. Blokování a inkubace membránových proužků s přenesenými antigeny probíhaly v drážkových destičkách při laboratorní teplotě na třepačce s výkyvnou platformou Grant Bio PMR-30 Platform Rocker (KeisonProducts). Na blokování membrány byl použit 5% roztok odtučněného mléka Blotting Grade Blocker (Bio-Rad) ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku s přísadkou 0,05% detergentu Tween 20, pH 7,2 (PBS-T). Blokování probíhalo 2 h. Následovala 1,5h inkubace s kachními séry ředěnými 1:80 v PBS-T a poté byly proužky 3× po 5 min promyty puftrem. Afinitně purifikované, křenovou peroxidázou značené koží protilátky proti kachním IgG (respektive IgY) (KPL) byly ředěny 1:1000 v PBS-T a inkubovány s membránou 1 h. Jeden proužek byl použit jako negativní kontrola bez přidání séra a jeden proužek byl použit jako negativní kontrola bez přidání séra i sekundární protilátky. Následně proběhlo opět 3× 5 min promytí v pufru a vyvíjení membrány substrátovým roztokem kitu Opti – 4CN™ (Bio-Rad) dle pokynů výrobce.

4.5 ELISA

Použita byla metoda nepřímého sendvičového testu. Proteiny homogenátu cercárií byly ředěny v uhličitanovém pufru (15 mM Na₂CO₃/35 mM NaHCO₃) pH 9,6 na koncentraci 6,25 µg/ml. Do každé jamky 96 jamkové číré mikrotitrační destičky s plochým dnem (MaxiSorp, Nunc) bylo napipetováno 50 µl roztoku antigenu v pufru a destička byla inkubována ve vlhké komůrce přes noc při 4°C. Poté byly jamky promyty 3× 1 min pomocí 100 µl PBS-T. Na blokování byl použit 5% kasein (Sigma Aldrich) v PBS-T, 100 µl na každou jamku, a blokování probíhalo 2 h ve vlhké komůrce na třepačce s výkyvnou platformou. Kachní séra byla ředěna v poměru 1:160 v PBS-T a na každou jamku bylo použito 50 µl. Každé sérum bylo vždy nanášeno v dubletu. Kontrolní jamky obsahovaly pouze PBS-T. Inkubace se séry obsahujícími primární protilátky probíhala opět 2 hodiny za stejných podmínek. Po následujícím promytí 3× 1 min ve 100 µl PBS-T byly nanášeny sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou (kozy proti kachním IgY, viz western blot) ředěné v poměru 1:500 v PBS-T, 50 µl do každé jamky. Ze 4 kontrolních jamek posloužily 2 jamky jako negativní kontrola pozadí nespecifické vazby sekundárních protilátek a 2 jako negativní kontrola pozadí použitých pufrů a vyvíjecích roztoků. Reakce protilátek byla vizualizovaná pomocí 50 µl roztoku tetramethylbenzidinu (TMB) (Sigma Aldrich). Pro ukončení reakce bylo přidáno 50 µl 1M HCl. Absorbance při 450nm vlnové délce byla měřena fluorometrem Infinite M200 (TECAN) a vyhodnocena pomocí programu Magellan™.

Pro každý antigen, respektive soubor potenciálních antigenů obsažený v homogenátu cercárií jednotlivých druhů ptačích schistosom byly měřeny hladiny IgY protilátek v sérech infikovaných kachen v časovém průběhu nálezů v rámci každé experimentální skupiny (druhu parazita) společně se séry kachen kontrolních (tj. např. homogenát *T. regenti* se séry kachen nakažených stejným druhem + kontroly). Pro testování zkřížené reaktivity protilátek v heterologních kombinacích (tj. např. homogenát *T. regenti* se séry kachen infikovaných *T. szidati* a *T. franki*) byla použita séra kachen z vybraných časových intervalů: sérum před infekcí (0 DPI), sérum v průběhu infekce a sérum z posledního odběru (pro soubor celkových a statistických dat viz Přílohu 2). Kvůli možnosti vzájemného porovnávání zahrnují výsledky z daného časového intervalu i hodnoty ±1 DPI (např. 10 DPI sdružuje 9-11 DPI).

OD₄₅₀ ukazuje relativní hladinu protilátek, její hodnoty jsou v grafech vyjádřeny jako průměr všech naměřených hodnot pro příslušná séra v dubletech. Pro každý antigen je v příslušném grafu vyjádřena hodnota cutoff, tedy hladina pro

spolehlivé odlišení specifické reakce, stanovená dle Frey *et al.* (1998), a směrodatná odchylka z měření hladiny protilátek u druhově příslušné nákazy a kontrol. Každý bod zobrazující v grafu reakci séra vůči heterolognímu antigenu představuje průměr jednotlivých dublétů měření, tedy hladinu protilátek v séru z jedné konkrétní kachny v daném časovém bodě.

4.6 Vyhodnocení

Naskenované membrány po western blotu byly upraveny a zpracovány v programu ZonerPhoto Studio 17 a Adobe Photoshop CS5 Extended a vyhodnocovány v programu Image LabTM Software (Bio-Rad). Data získaná z měření ELISA byla zpracována v programu Microsoft Excel a statisticky analyzována v programu TIBCO StatisticaTM. U všech analyzovaných dat byla ověřena normalita (QQ diagram) a pro data v čase 0 DPI a 15 DPI byla zhodnocena statistická průkaznost vlivu typu nákazy a typu antigenu na naměřené hodnoty OD₄₅₀ oproti hodnotám z měření reakce protilátek ze sér kontrolních kachen lineárním modelem analýzy variance.

5. VÝSLEDKY

5.1 Zavedení cyklu *T. franki*

Z přírodních lokalit bylo získáno celkem 10 plžů *Radix auricularia/R. sp.* infikovaných *T. franki*. Plži byli chováni ve stejných podmínkách, jako *R. lagotis* a *L. stagnalis*. Následně bylo nakaženo 6 kachen tímto parazitem (bez skupiny N, jejich nákazu prováděla Mgr. Libuše Turjanicová před zadáním této práce). U 4 z těchto kachen byla infekce potvrzena detekcí miracidíí líhnoucích se v čerstvém trusu (Tab. 2. v Materiál a metodika).

Celkem 19 ks *R. auricularia/R. sp.* bylo úspěšně nakaženo. Všichni infikovaní plži byli zdrojem cercarií pro infekce kachen nebo pro získání cercariálního antigenu.

Všichni jedinci uhynuli z neznámého důvodu během maximálně 4 měsíců. Reprodukce nebyla pozorována.

5.2 Měření hladin protilátek pomocí ELISA

Byla měřena reakce sér z kachen určité infekce s antigenem příslušného parazita v celém časovém průběhu nákazy současně se séry kachen kontrolních. Reakcí s každým jednotlivým antigenem byla následně stanovena i hladina protilátek v sérech kachen s heterologní nákazou (Obr. 4-6)

Počáteční hladiny protilátek se pohybují mezi hodnotami OD₄₅₀ 0,03 a 0,78 celkově pro všechny kachny. V některých případech došlo během prvního odběrového intervalu k poklesu těchto hodnot. Obecně lze pozorovat stoupající tendence vazby protilátek jak u sér v reakci s homologním antigenem, tak u reakcí s heterologním antigenem, včetně kontrol.

Data ze všech jednotlivých měření jsou v Příloze 2.

5.2.1 Cercariální antigen *T. regenti*

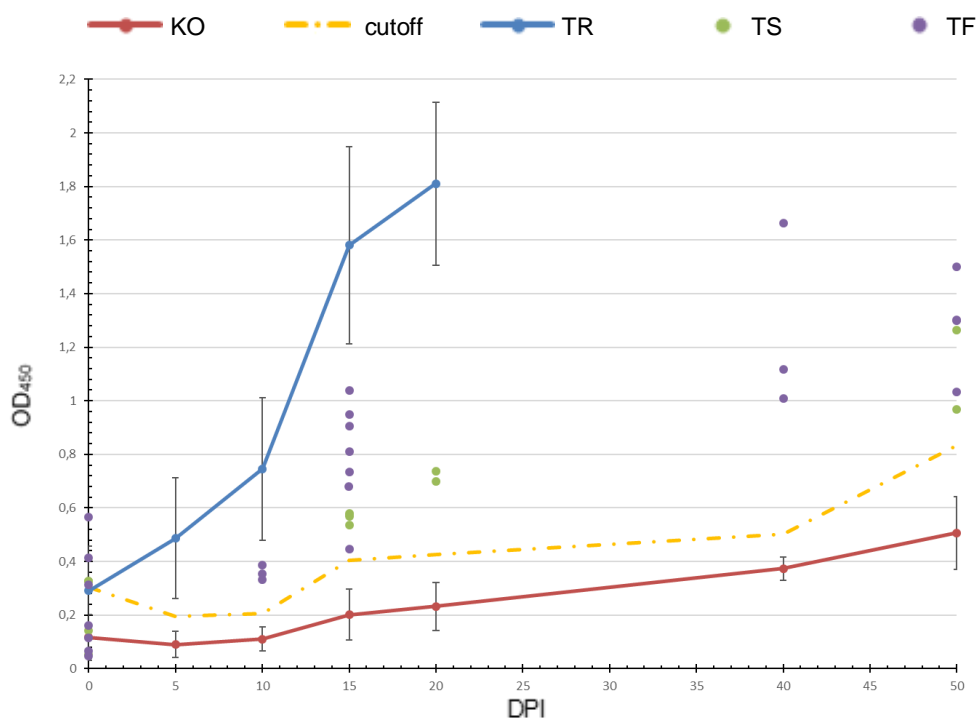
Stoupající trend v hladinách protilátek vůči příslušnému antigenem byl pozorován v sérech všech 8 kachen nakažených *T. regenti* v celém průběhu trvání infekce. Hladiny protilátek signifikantně stoupaly již od 5. dne nákazy, výrazněji pak po 10. dni v každé skupině. Séra posledních odběrů (20 DPI) vykazovala hodnoty OD₄₅₀ mezi 1,43 a 2,17, což byla horní hranice hodnot všech měření během celého experimentu (Obr. 4). Další průběh nebyl sledován, neboť tyto kachny byly usmrceny a miracidia využita pro udržení laboratorního cyklu parazitů. Všechny

naměřené hodnoty v jednotlivých časových bodech se pohybovaly nad úrovní cutoff. Hodnoty u kontrolních sér nepřesáhly v celkovém průběhu hranici OD₄₅₀ 0,6.

Pro testování zkřížené reaktivity sér po nákaze *T. szidati* byla použita séra 4 kachen z intervalů 0 DPI, 15 DPI a 20/50 DPI (2/2 kachny). Hladiny zkříženě reagujících protilátek se v průběhu infekce držely v nízkých hodnotách, byť přesahovaly hranici cutoff. Oproti příslušné infekci *T. regenti* byly hodnoty OD₄₅₀ v 15. dni po infekci mnohem nižší, a přestože lze pozorovat jistý nárůst, v 50. dni po infekci dosáhly pouze na hodnotu OD₄₅₀ kolem 1 (Obr. 4).

Zkřížená reaktivita sér z kachen nakažených *T. franki* vykazovala velký rozptyl hodnot pro jednotlivé časové intervaly. Testována byla séra 7 kachen, z toho 4 v bodech 0, 15 a 50 DPI a 3 v bodech 0, 10, 15 a 40 DPI. U některých sér byla opakovaně naměřena vyšší hodnota reakce protilátek v séru z prvního odběru 0 DPI (před infekcí), která následně poklesla v měření 5 DPI (jednalo se především o měření testovacích a optimalizačních procesů, proto tato data opakovaných měření nejsou součástí Přílohy 2). V bodě 15 DPI byla maximální naměřená hodnota 1,04. Značné rozptyly naměřených hodnot u sér z kachen po nákaze *T. regenti* a *T. franki* v tomto časovém bodě se však nepřekrývaly (Obr. 4).

Lze sledovat zvyšující se trend hladiny protilátek v časovém průběhu a hodnoty OD₄₅₀ ve všech případech sér z infikovaných kachen. Hodnoty vykazují specifitu nad hranicí cutoff. OD₄₅₀ u zkříženě reagujících sér po nákaze *T. franki* jsou evidentně nižší než u sér po příslušné nákaze *T. regenti*, ale vyšší než u sér po nákaze *T. szidati*.



Obr. 4. Hladiny IgY protilátek v sérech kachen nakažených *T. regenti*, *T. szidati* a *T. franki* v reakci na cercariální antigen *T. regenti* v časovém průběhu infekce. KO – kontrolní séra (n=7); TR – séra kachen nakažených *T. regenti* (n=8); TS – séra kachen nakažených *T. szidati* (n=4); TF – séra kachen nakažených *T. franki* (n=7); cutoff – hladina statistické validity negativní kontroly v 95% intervalu spolehlivosti, úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku měření

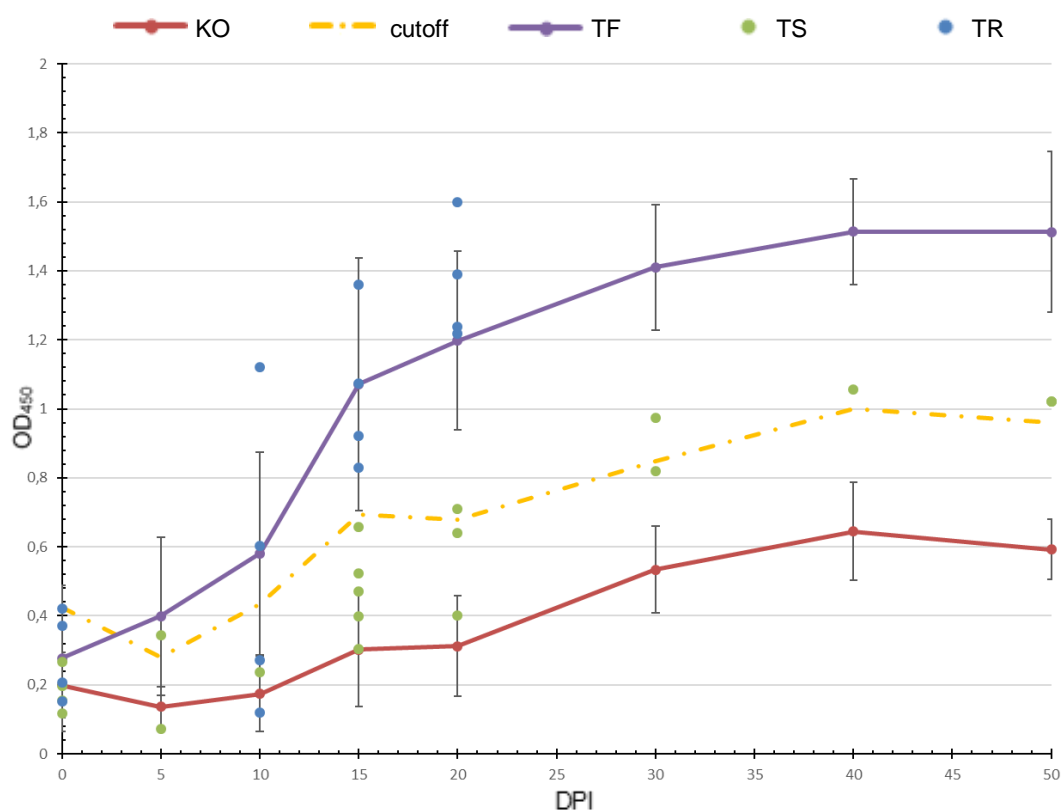
5.2.2 Cercariální antigen *T. franki*

Séra 8 kachen nakažených *T. franki* byla testována proti příslušnému antigenu. Po 10 až 15 dnech infekce lze pozorovat zvyšující se hladinu protilátek, která dosahuje maximálních hodnot mezi 30. a 50. dnem (Obr. 5).

Reaktivita kontrolních sér v čase mírně stoupá a ve většině případech lze sledovat tento trend až do měření posledního odběru. Nejvyšší naměřená hodnota u jednoho kontrolního séra byla 0,88 v bodě 40 DPI. K měření byla použita sada sér ze 6 kontrolních jedinců.

Séra po nákaze *T. regenti* vykazovala zkříženou reaktivitu téměř shodnou s reaktivitou homologních sér po nákaze *T. franki* až do 20. dne po infekci. Maximální naměřená hodnota OD₄₅₀ v tomto bodě byla 1,6 pro sérum po nákazu *T. regenti* a 1,56 pro nákazu *T. franki*. Na tuto zkříženou reakci byla testována 4 séra po nákaze *T. regenti* (Obr. 5).

V sérech 5 kachen nakažených *T. szidati* byly naměřeny velmi nízké hladiny zkříženě reagujících protilátek. Jejich hodnoty se pohybují *de facto* na hranici spolehlivého odlišení od negativních kontrol (Obr. 5).

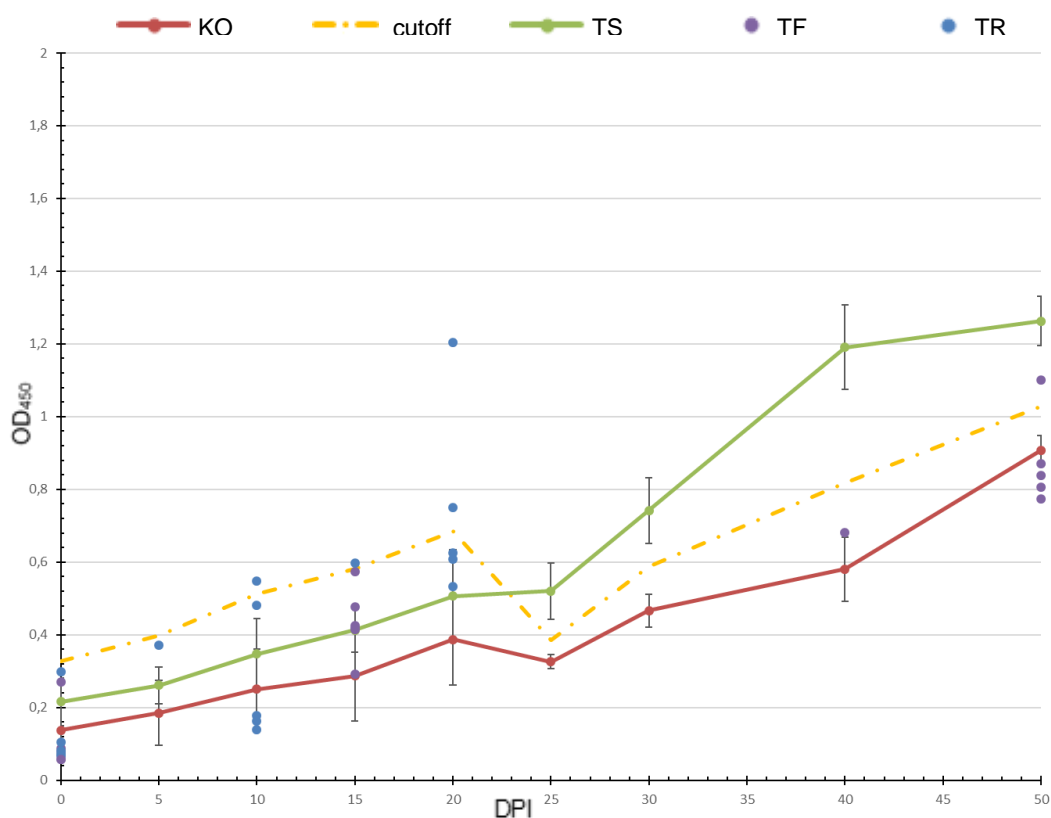


Obr 5. Hladiny IgY protilátek v sérech kachen nakažených *T. regenti*, *T. szidati* a *T. franki* v reakci na cercariální antigen *T. franki* v časovém průběhu infekce. KO – kontrolní séra (n=6); TF – séra kachen nakažených *T. franki* (n=8); TS – séra kachen nakažených *T. szidati* (n=5); TR – séra kachen nakažených *T. regenti* (n=4); cutoff – hladina statistické validity negativní kontroly v 95% intervalu spolehlivosti, úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku měření

5.2.3 Cercariální antigen *T. szidati*

Pozvolný nárůst reaktivity protilátek v séru kachen po nákaze *T. szidati* byl zaznamenán ve všech případech. Testováno bylo 6 souborů sér příslušné nákazy. Dvě měření zahrnovala odběry ze 40. a 50. dne po infekci, kdy naměřené OD₄₅₀ dosahovalo nejvyšších hodnot. Přestože trend v naměřených hodnotách pro kontrolní séra je velmi podobný, mezi 25. a 40. dnem infekce dochází k výraznému zvýšení hladiny reagujících protilátek nad úroveň cutoff. Maximální OD₄₅₀ však nepřesuje hodnotu 1,33. Stoupající trend byl obdobný i kontrolám (Obr. 6).

Hladiny reagujících protilátek v séru z 5 kachen nakažených *T. regenti* se velmi lišily, nicméně až na jednu výjimku zůstávaly opět v nižších hodnotách pod 0,8. Podobné hodnoty OD₄₅₀ byly naměřeny i u sér ze 6 nákaz *T. franki*. Trend víceméně kopíruje křivku kontrolních sér i v posledních časových intervalech a setrvává tedy pod hladinou cutoff (Obr. 6).



Obr. 6. Hladiny IgY protilátek v sérech kachen nakažených *T. regenti*, *T. szidati* a *T. franki* v reakci na cercariální antigen *T. regenti* v časovém průběhu infekce. KO – kontrolní séra (n=7); TS – séra kachen nakažených *T. szidati* (n=6); TR – séra kachen nakažených *T. regenti* (n=5); TF – séra kachen nakažených *T. franki* (n=6); cutoff – hladina statistické validity negativní kontroly v 95% intervalu spolehlivosti, úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku měření

5.2.4 Statistická průkaznost

Pro vyjádření signifikance rozdílu naměřených hladin reagujících sér v časech 0 DPI a 15 DPI, kdy byly k dispozici hodnoty reagujících IgY ze všech nákaz, byla použita analýza variance rozptylu pro faktory nákaza (vliv nákazy daným parazitem) a antigen (Tab. 5). V čase 0 DPI není vliv nákazy ani antigenu signifikantní. V čase 15 DPI je vliv obou faktorů signifikantní.

Signifikance vlivu předloženého antigenu na hodnoty naměřené pro určitý typ nákazy v čase 15 DPI je dána značnými rozdíly v hodnotách jednotlivých skupin dané infekce v reakci na antigen *T. regenti* a *T. franki* (Obr. 7). Rozdíl reakce protilátek kachen nakažených *T. szidati* a kachen kontrolních na jednotlivé antigeny se v tomto časovém bodě statisticky neliší (Obr. 7). Naměřené hodnoty se pro

jednotlivé antigeny liší v případě nákazy *T. regenti* ($p=0,00020$) a *T. franki* ($p=0,00056$), ne však u nákazy *T. szidati* ($p=0,06605$) a kontrolních kachen ($p=0,36275$). Hodnota $p < 0,05$ zamítá nulovou hypotézu o shodnosti rozptylů.

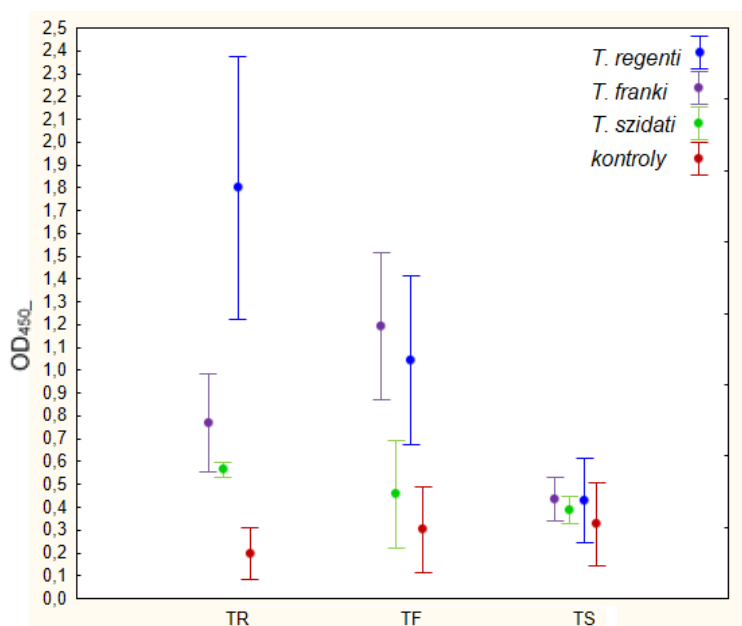
Tab. 5. Test signifikance rozdílů naměřených hladin protilátek v čase 0 DPI a 15 DPI oproti kontrole pro faktory antigen a nákaza

Test signifikance rozdílů naměřených hladin protilátek v čase 0 DPI						
faktory	Počet stupňů volnosti	Suma čtverců	Průměr čtverců	F hodnota	Pr (>F)	hladina významnosti
nákaza	2	0,05700	0,019000	0,9189	0,4374	
antigen	2	0,08653	0,043265	2,0924	0,1325	
nákaza:antigen	6	0,14786	0,024644	1,1918	0,3233	
celkem	59	1,21996	0,020677			

závislá proměnná: hladina=hodnota OD₄₅₀; hladina významnosti: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' ,

Test signifikance rozdílů naměřených hladin protilátek v čase 15 DPI						
faktory	Počet stupňů volnosti	Suma čtverců	Průměr čtverců	F hodnota	Pr (>F)	hladina významnosti
nákaza	3	6,9883	2,32944	44,216	4.190e-15	***
antigen	2	1,6256	0,81279	15,428	4.078e-06	***
nákaza:antigen	6	3,2077	0,53462	10,148	1.089e-07	***
celkem	59	3,1083	0,05268			

závislá proměnná: hladina=hodnota OD₄₅₀; hladina významnosti: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' ,



Obr. 7. Variance rozptylů při měření reakce protilátek ze sér kachen nakažených *T. regenti*, *T. franki*, *T. szidati* a kachen nenakažených s antigeny *T. regenti*, *T. franki* a *T. szidati* v čase 15 DPI. TR – antigen *T. regenti*; TF – antigen *T. franki*; TS – antigen *T. szidati*; vertikální úsečky označují 95% interval spolehlivosti

5.3 Detekce cercariálních antigenů pomocí Western blotu

Reakce protilátek v sérech kachen byla měřena na membránách obsahujících antigen cercarií *T. regenti* (Obr. 8-11), *T. franki* (Obr. 12-14) a *T. szidati* (Obr. 15-17).

Séra z příslušné nákazy včetně kontroly byla testována proti antigenu ve všech intervalech, kdy byla sbírána, pro charakterizaci vývoje specifické protilátkové odpovědi. V každém dílčím experimentu byla použita séra kontrolních kachen pro ověření specifity. Vybraná séra byla testována i s heterologními antigeny. Změny ve spektru detekovaných antigenů v čase jsou znázorněny pouze ukázkami homologních kombinací (Obr. 8, 12, 15), které pochází vždy z jedné membrány.

Pro ukázkou zkřížených reaktivit sér s heterologními cercariálními antigeny (Obr. 9, 13, 16) byl vybrán časový bod 20 DPI, pro který bylo možné porovnat všechny typy nálezů. Upravené snímky zkřížených reakcí pocházejí z více membrán, proto, pouze v těchto případech, barevná intenzita v obrázcích neodpovídá plně intenzitě reakce. Výsledky jsou pouze kvalitativní.

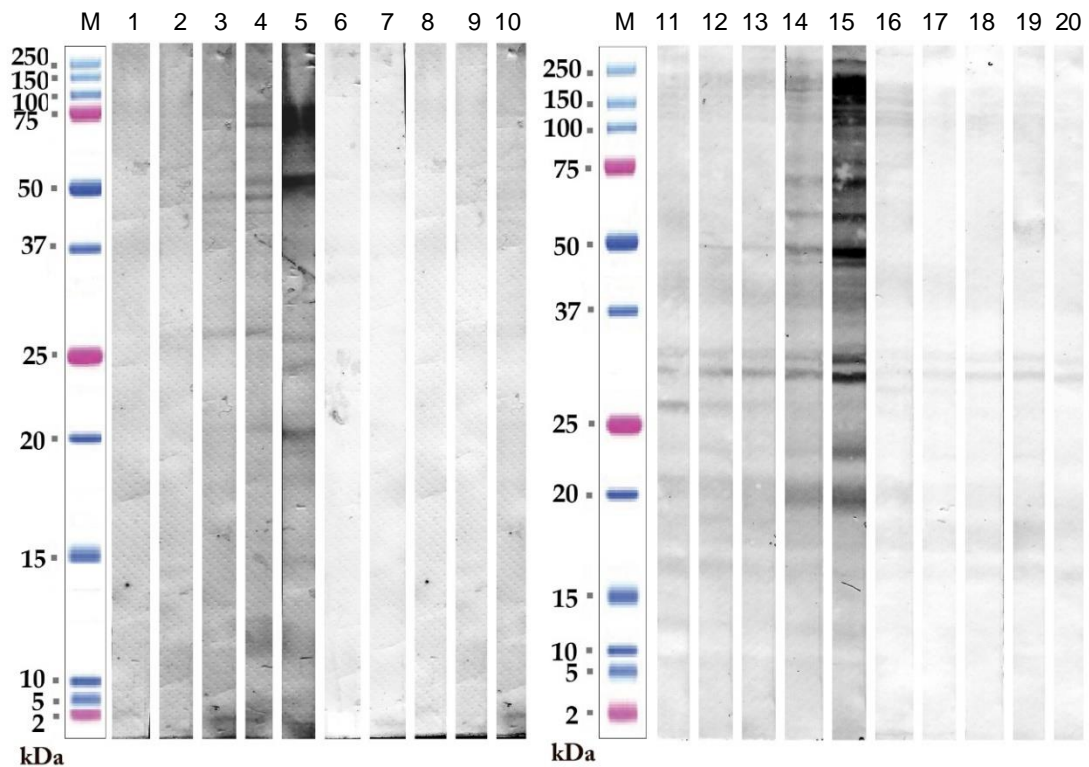
Pro každý cercariální antigen byl ze všech získaných výsledků zhotoven přehled spektra jednotlivých antigenů reagujících s protilátkami v séru uvedených kachen v celém průběhu nákazy souhrnně (Obr. 11, 14, 17). Tyto výsledky byly získány analýzou všech membrán pro daný antigen jednotlivě.

5.3.1 Cercariální antigen *T. regenti*

5.3.1.1 Časový průběh protilátkové odpovědi při nálezce *T. regenti*

Séra 6 kachen nálezce *T. regenti* byla testována na přítomnost specifických protilátek v průběhu infekce v rozmezí 0-20 DPI (Obr. 8). Antigeny v blízkosti molekulové hmotnosti 50 kDa byly rozpoznávány již 10.-15. den po infekci a v reakci séra 20 DPI byly vždy detekovány 3 specifické oblasti kolem 50, 70 a 75 kDa. V této oblasti bylo zachyceno celkem 5 antigenů, které byly zaznamenány ve všech testovaných případech, ačkoliv reakce byla někdy poměrně slabá (Obr. 9). V bodě 20 DPI se ve 4 případech jasně objevila reakce s antigenem kolem 20 kDa. V průběhu infekce také viditelně stoupala intenzita reakce.

Antigeny o velikosti kolem 27 a 29 kDa byly opakovaně rozpoznávány i kontrolními séry (Obr. 11).

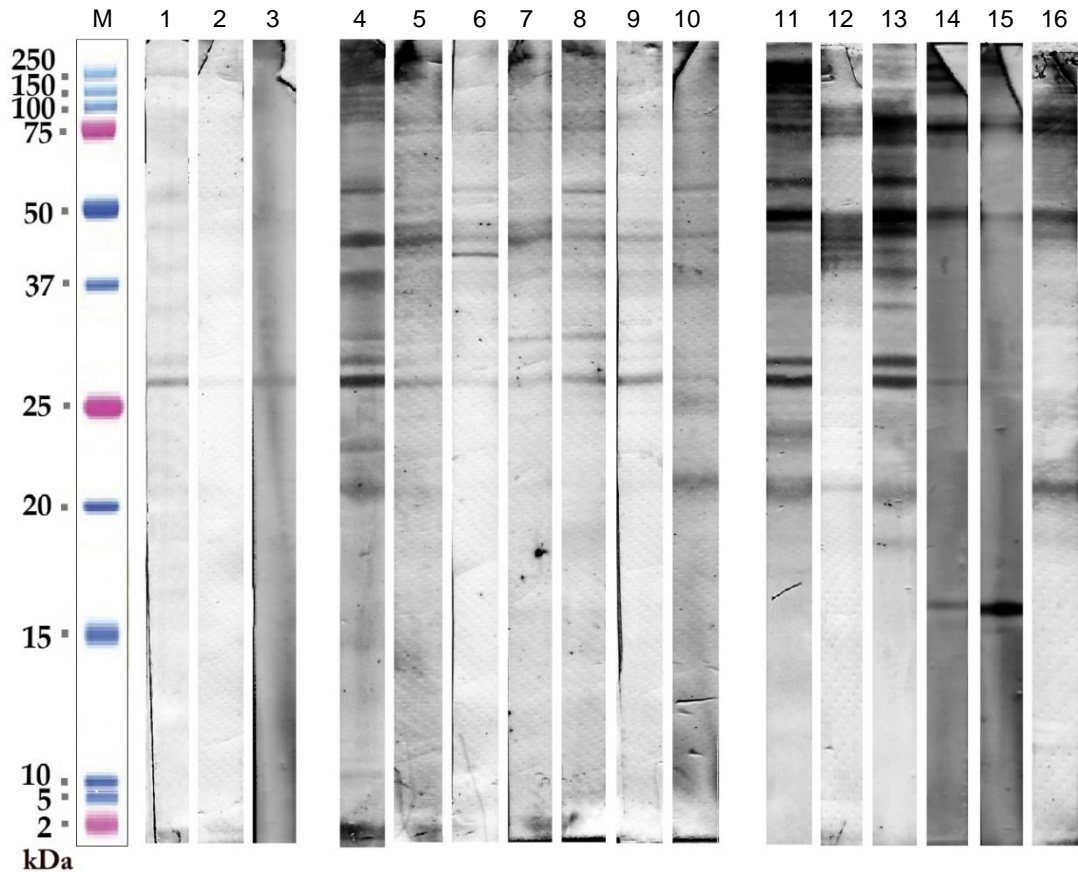


Obr. 8. Průběh reakce protilátek sér kachny nakažené *T. regenti* a kontrolní nenakažené kachny s příslušným antigenem v čase 0, 5, 10, 15 a 20 DPI. M – markery molekulové velikosti; 1-5 – TRV4 – nákaza *T. regenti* skup. V; 6-10 – KOV1 – kontrolní kachna skup. V; 11-15 – TRU1 – nákaza *T. regenti* skup. U; 16-20 – KOU – kontrolní kachna skup. U

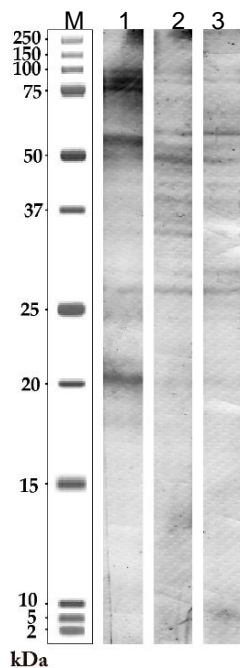
5.3.1.2 Zkřížené reakce protilátek z heterologních sér

Séra kachen infikovaných *T. franki* a *T. szidati* také reagovala s antigenem *T. regenti* (Obr. 9). Reakce sér po nálezích *T. szidati* byla vždy velmi slabá a většina odhalených antigenů byla detekována až 25. dne nákazy u skupiny U, respektive od 30. dne u skupiny S a V (Obr. 11). Vysoce nespecifická reakce antigenu v oblasti kolem 27 kDa však byla zaznamenávána v některých případech již od 1. odběru, tedy před nálezem kachen.

Protilátky kachen nakažených *T. franki* reagují s antigeny *T. regenti* v brzkých časových bodech. Většina antigenů je rozpoznávána již 15. den od infekce, ačkoliv intenzita reakce protilátek je i v posledních testovaných odběrech slabší, než reakce homologních sér odebraných 20 DPI. Intenzita zkřížených reakcí protilátek z kachen infikovaných *T. franki* a *T. szidati* z odběrů 50 DPI je v některých případech navzájem velmi podobná, ale zároveň slabší než reakce sér kachen s infekcí *T. regenti* (Obr. 10).



Obr. 9. Reakce protilátek ze sér kachen nakažených *T. szidati*, *T. franki* a *T. regenti* s antigenem *T. regenti* v čase 20 DPI. M – markery molekulové velikosti; 1-3 nákaza *T. szidati*; 4-10 nákaza *T. franki*; 11-16 nákaza *T. regenti*. 1 – TSU1, 2 – TSU2, 3 – TSV2; 4 – TFR, 5 – TFS1, 6 – TFS2, 7 – TFN1, 8 – TFS3, 9 – TFT, 10 – TFN4, 11 – TRU1, 12 – TRU2, 13 – TRU3, 14 – TRV2, 15 – TRV4, 16 – TRV6

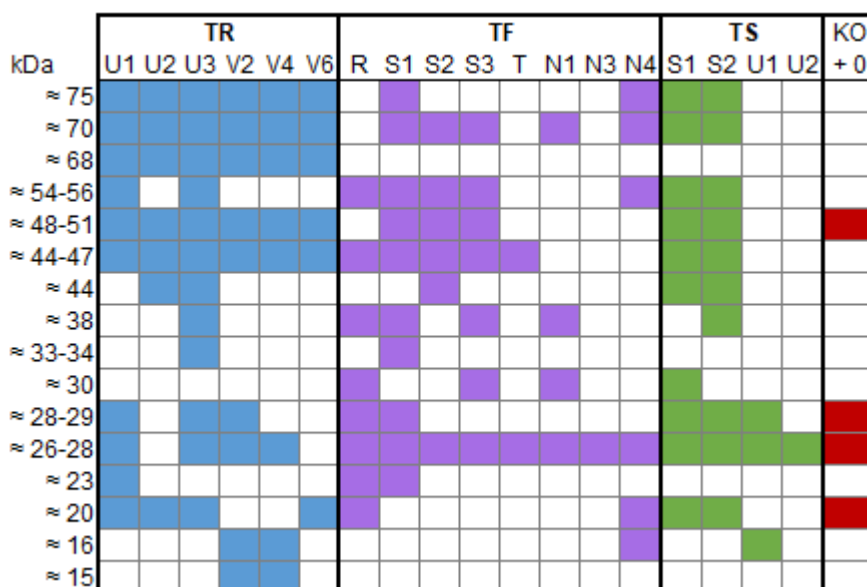


Obr. 10. Porovnání intenzity reakce protilátek ze sér kachen nakažených *T. regenti*, *T. franki* a *T. szidati* proti antigenu *T. regenti*. M – markery molekulové velikosti; 1 – *T. regenti* (TRV6) 20 DPI; 2 – *T. franki* (TFS2) 50 DPI; 3 – *T. szidati* (TSS1) 50 DPI

5.3.1.3 Detekované antigeny

Při testování reakce homologních sér z celého časového rozmezí experimentálních infekcí bylo identifikováno 16 imunogenních antigenů *T. regenti* (Obr. 11). Jejich velikost se pohybovala mezi 15 a 75 kDa. Proteiny o velikosti přibližně 75, 70, 68, 50 a 45 kDa byly rozpoznány všemi séry z příslušné nákazy, a kromě jednoho případu se všechny objevily i při zkřížené reakci se séry kachen s nákazou *T. franki* i *T. szidati*. Z těchto pouze jeden protein byl také detekován v některých případech negativních kontrol. Pouze antigeny nalezené v oblasti pod 70 kDa a kolem 15 kDa byly detekovány specificky u nálezů *T. regenti*. 15kDa antigen však byl zachycen pouze 2× (Obr. 11).

Většina antigenů detekovaných séry z kachen s nákazou *T. szidati* je určena až z testování posledního odběru skupiny S, který byl 50. den od infekce.

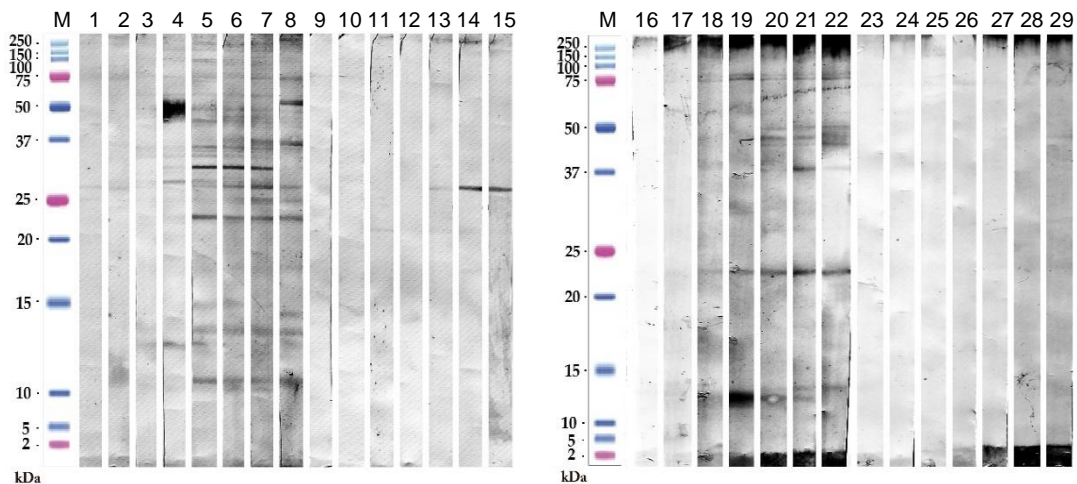


Obr. 11. Antigeny cercárií *T. regenti* reagující s protilátkami v sérech kachen nakažených *T. regenti*, *T. franki* a *T. szidati* souhrnně v celém čase nákazy pro každého jedince. kDa – molekulová velikost antigenu; **TR:** U1, U2, U3, V2, V4, V6 – kachny infikované *T. regenti* v experimentálních skupinách U a V; **TF:** R, S1, S2, S3, T, N1, N3, N4 – kachny infikované *T. franki* v experimentálních skupinách R, S, T a N; **TS:** S1, S2, U1, U2 – kachny infikované *T. szidati* v experimentálních skupinách S a U; KO+0 – kontrolní kachny a séra z prvního (před infekčního) odběru

5.3.2 Cercariální antigen *T. franki*

5.3.2.1 Časový průběh protilátkové odpovědi při naze *T. franki*

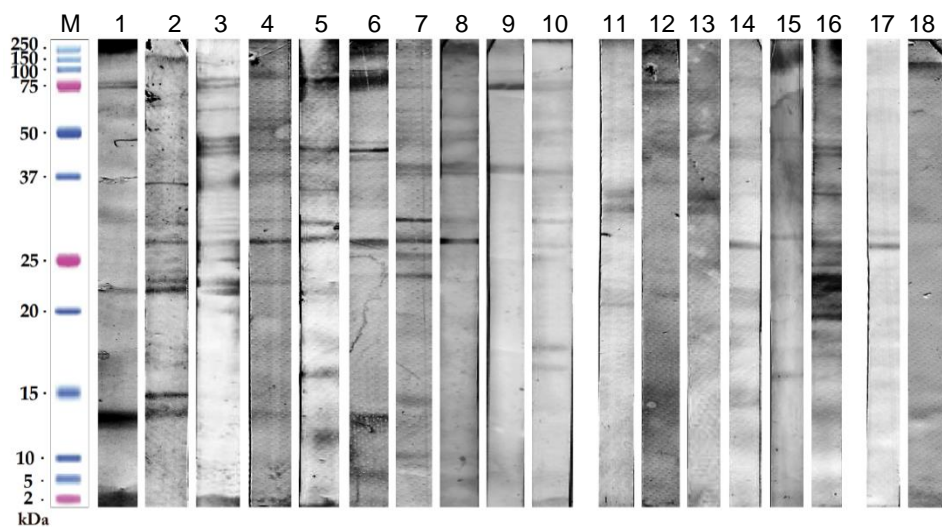
Viditelné zvýšení počtu rozpoznávaných imunogenních antigenů lze obvykle sledovat od 14./15. dne infekce. V některých případech bylo zaznamenáno zpoždění vyšší intenzity reakce až mezi 20. a 30. den. Po 20. dni často docházelo buď ke změně vzoru rozpoznávaných antigenů, nebo k poklesu jejich počtu či intenzity reakce. Tento jev byl však variabilní napříč všemi skupinami. Reakce sér na určité antigeny se u jednotlivých experimentálních kachen obecně v průběhu infekce lišila (Obr. 12, 13).



Obr. 12. Změny reakce protilátek sér kachny nakažené *T. franki* a kontrolní nenakažené kachny s příslušným antigenem v průběhu infekce. M – markery molekulové velikosti; 1-8 séra kachny nakažené *T. franki* skup. N (TFN2) v čase 0, 4, 9, 12, 14, 16, 19 a 29 DPI; 9-15 séra nenakažené kachny skup. N (KON2) v čase 0, 4, 9, 14, 19, 29 a 39 DPI; 16-22 séra kachny nakažené *T. franki* skup. R (TFR) v čase 0, 10, 15, 20, 30, 40 a 50 DPI; 23-29 séra nenakažené kachny skup. R (KOR) v čase 0, 10, 15, 20, 30, 40 a 50 DPI

5.3.2.2 Zkřížené reakce protilátek z heterologních sér

Stejně jako se vzor detekovaných antigenů velmi lišil mezi jednotlivými jedinci nakaženými *T. franki*, i reakce sér kachen nakažených *T. regenti* byla s tímto antigenem variabilní (Obr. 13). Ve všech případech však protilátky těchto kachen reagovaly minimálně se 2 antigeny (Obr. 14). Oproti tomu reakce protilátek kachen nakažených *T. szidati* byla velmi nízká (Obr. 14). Viditelněji se objevovala až při testech sér z pozdních odběrů (po 25. dni). Z dřívějšího časového intervalu bylo možné rozeznat především pravděpodobně nespecifické reakce s antigeny, které se objevovaly i u negativních kontrol.



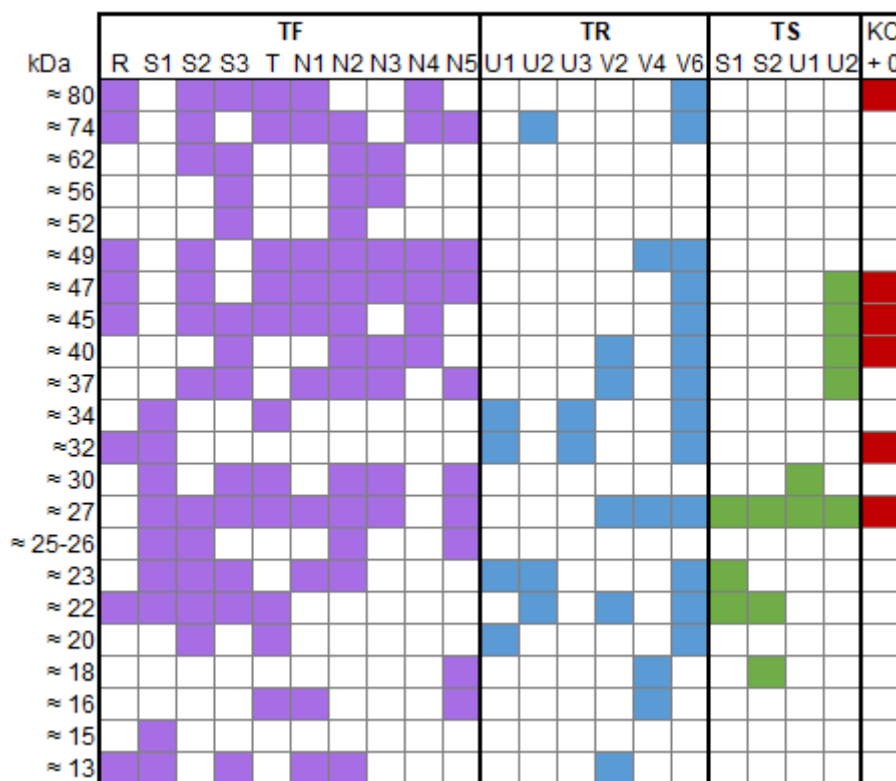
Obr. 13. Reakce protilátek ze sér kachen nakažených *T. franki*, *T. regenti* a *T. szidati* s antigenem *T. franki* v čase 20 DPI. M – markery molekulové velikosti; 1-10 nákaza *T. franki*; 11-16 nákaza *T. regenti*; 17-18 nákaza *T. szidati*. 1 – TFR, 2 – TFS1, 3 – TFS2, 4 – TFS3, 5 – TFT, 6 – TFN1, 7 – TFN2, 8 – TFN3, 9 – TFN4, 10 – TFN5, 11 – TRU1, 12 – TRU2, 13 – TRU3, 14 – TRV2, 15 – TRV4, 16 – TRV6, 17 – TSU1, 18 – TSU2

5.3.2.3 Detekované antigeny

Z celého průběhu pozorované infekce bylo rozpoznáno 21 antigenů v rozsahu mezi 13 a 80 kDa (Obr. 14). U homologní nákazy se počet detekovaných antigenů pohyboval mezi 6 a 14 v celém souboru sér jednoho jedince, přičemž kromě počátečního nárůstu se počet a vzor opět v průběhu infekce mírně měnil (Obr. 12). Žádný antigen nebyl shodně detekován u všech testovaných jedinců. V oblasti mezi 52-62 kDa a kolem 15 kDa bylo možné nalézt antigeny specificky rozpoznávané pouze séry kachen s příslušnou nákazou, neobjevily se však ve všech případech.

Séra kachen po nákaze *T. regenti* reagovala s několika antigeny, opět se však jednotlivci lišili (Obr. 14).

Protilátky v sérech kachen nakažených *T. szidati* reagovaly s antigeny *T. franki* velmi málo, v podstatě na úrovni sér kachen kontrolních a sér z odběrů 0 DPI, přičemž nejvíce reagovaly protilátky v séru kachny TSU2, a to až v posledním odběru, tedy 25 DPI (Obr. 14).

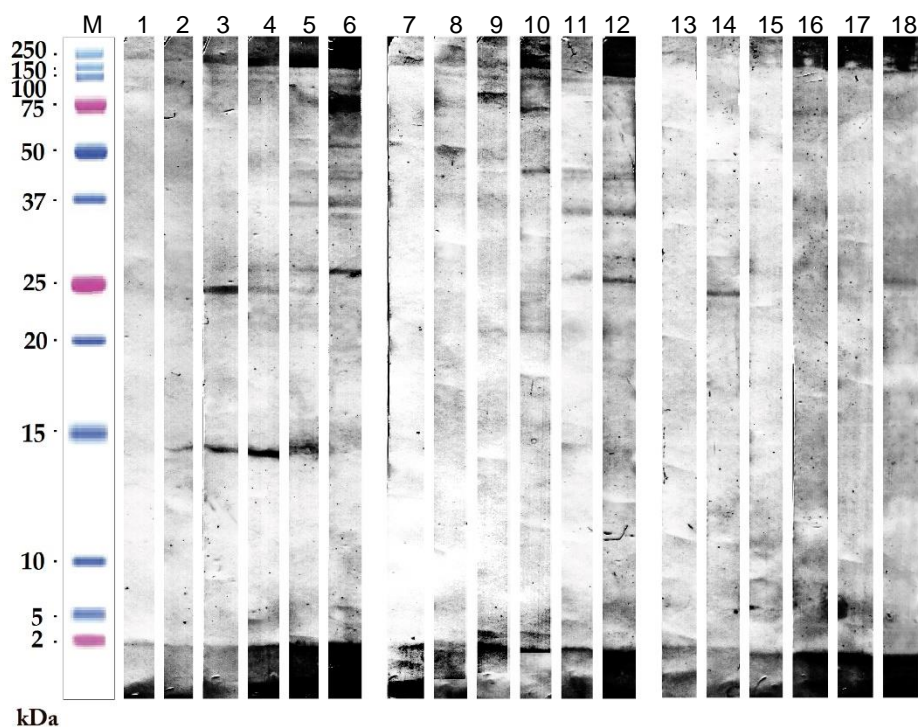


Obr. 14. Antigeny cercárií *T. franki* reagující s protilátkami v sérech kachen nakažených *T. franki*, *T. regenti* a *T. szidati* souhrnně v celém čase nákazy pro každého jedince. kDa – molekulová velikost antigenu; **TF: R, S1, S2, S3, T, N1, N2, N3, N4, N5 – kachny infikované *T. franki* v experimentálních skupinách R, S, T a N; **TR**: U1, U2, U3, V2, V4, V6 – kachny infikované *T. regenti* v experimentálních skupinách U a V; **TS**: S1, S2, U1, U2 – kachny infikované *T. szidati* v experimentálních skupinách S a U; KO+0 – kontrolní kachny a séra z prvního (před infekčního) odběru**

5.3.3 Cerkariální antigen *T. szidati*

5.3.3.1 Časový průběh protilátkové odpovědi při nákaze *T. szidati*

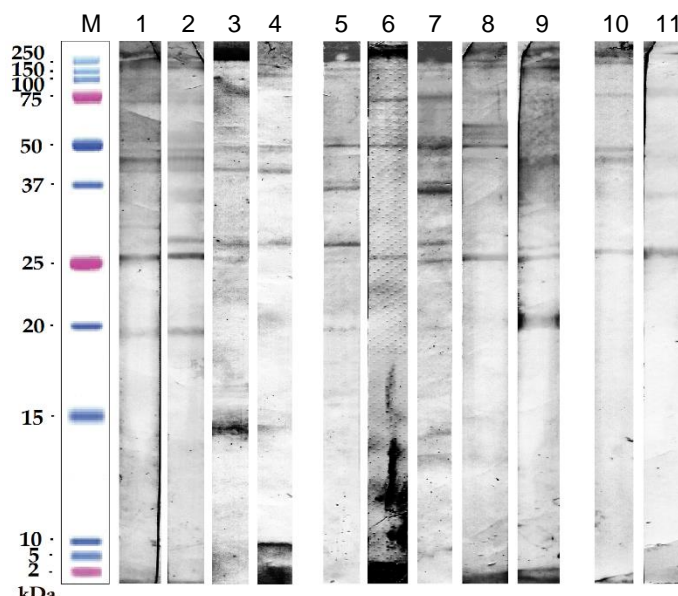
V průběhu infekce bylo možné zachytit specifické protilátky reagující s antigeny o velikosti 37-52 kDa, které se objevovaly již 10. den po naze, většinu však bylo možné rozpoznat až od 20. dne (Obr. 15). Reakce byly celkově velmi slabé. Detekované antigeny však byly u jednotlivých sér velmi podobné. Výraznější reakce byla zaznamenána až v sérech ze 40. a 50. dne po infekci (nezobrazeno).



Obr. 15 Průběh reakce protilátek sér kachny nakažené *T. szidati* a kontrolní nenakažené kachny s příslušným antigenem v čase 0, 5, 10, 15, 20 a 25 DPI. M – markery molekulové velikosti; 1-12 séra kachen nakažených *T. szidati* skup. U: 1-6 – TSU1, 7-12 – TSU2; 13-18 séra nenakažené kachny skup. U (KOU)

5.3.3.2 Zkřížené reakce protilátek z heterologních sér

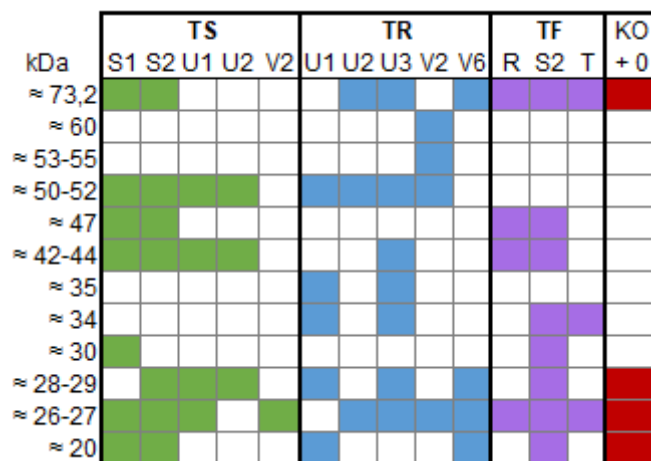
Zkřížená reakce protilátek z kachen s nálezou *T. regenti* vůči antigenu *T. szidati* detekovala více antigenů než reakce v případě homologních sér nákazy *T. szidati*. V porovnávání 20. den po infekci bylo možné identifikovat několik antigenů, které silně reagovaly s protilátkami kachen nakažených *T. regenti* (Obr. 16). Séra kachen s nálezou *T. franki* reagovala s více antigeny až 40. a 50. den nákazy (Obr. 17).



Obr. 16. Reakce protilátek ze sér kachen nakažených *T. szidati*, *T. regenti* a *T. franki* s antigenem *T. franki* v čase 20 DPI. M – markery molekulové velikosti; 1-4 nákaza *T. szidati*; 5-9 nákaza *T. regenti*; 10-11 nákaza *T. franki*. 1 – TSS1, 2 – TSS2, 3 – TSU1, 4 – TSU2, 5 – TRU1, 6 – TRU2, 7 – TRU3, 8 – TRV2, 9 – TRV6, 10 – TFR, 11 – TFT

5.3.3.3 Detekované antigeny

Tři proteiny v rozmezí velikostí 42-52 kDa byly nejčastěji rozeznávány příslušnou nákazou *T. szidati*. Druhá nejčastěji rozpoznávaná oblast byla mezi 20 a 29 kDa, která je však velmi nespecifická a tyto antigeny reagují i s protilátkami negativních kontrol. Naopak se objevily antigeny (53-60 kDa), se kterými séra kachen nakažených *T. szidati* ani *T. franki* či kontrol nereagovala ani 50. den infekce, ale reagovaly s protilátkami po nálezích *T. regenti* 20. den infekce. Jednalo se však pouze o výjimky. Maximální počet celkově detekovaných antigenů u jednoho jedince bylo maximálně detekováno 8 (u kachny TFS2 nakažené *T. franki*) nebo 7 (u kachen TSS1 a TSS2 nakažených *T. szidati* a u kachny TRU3 nakažené *T. regenti*) reagujících antigenů, přičemž z celého souboru měření celkem bylo odhaleno 12 reagujících antigenů (Obr. 17).

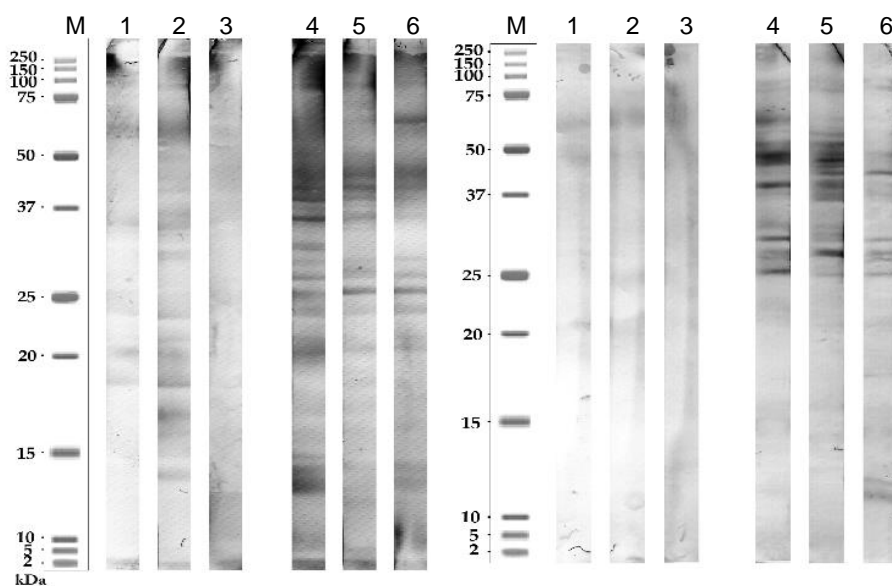


Obr. 17. Antigeny cercárií *T. szidati* reagující s protilátkami v sérech kachen nakažených *T. szidati*, *T. regenti* a *T. franki* souhrnně v celém čase nákazy pro každého jedince. kDa – molekulová velikost antigenu; TS: S1, S2, U1, U2, V2 – kachny infikované *T. szidati* v experimentálních skupinách S, U a V; TR: U1, U2, U3, V2, V6 – kachny infikované *T. regenti* v experimentálních skupinách U a V; TF: R, S2, T – kachny infikované *T. franki* v experimentálních skupinách R, S a T; KO+0 – kontrolní kachny a séra z prvního (před infekčního) odběru

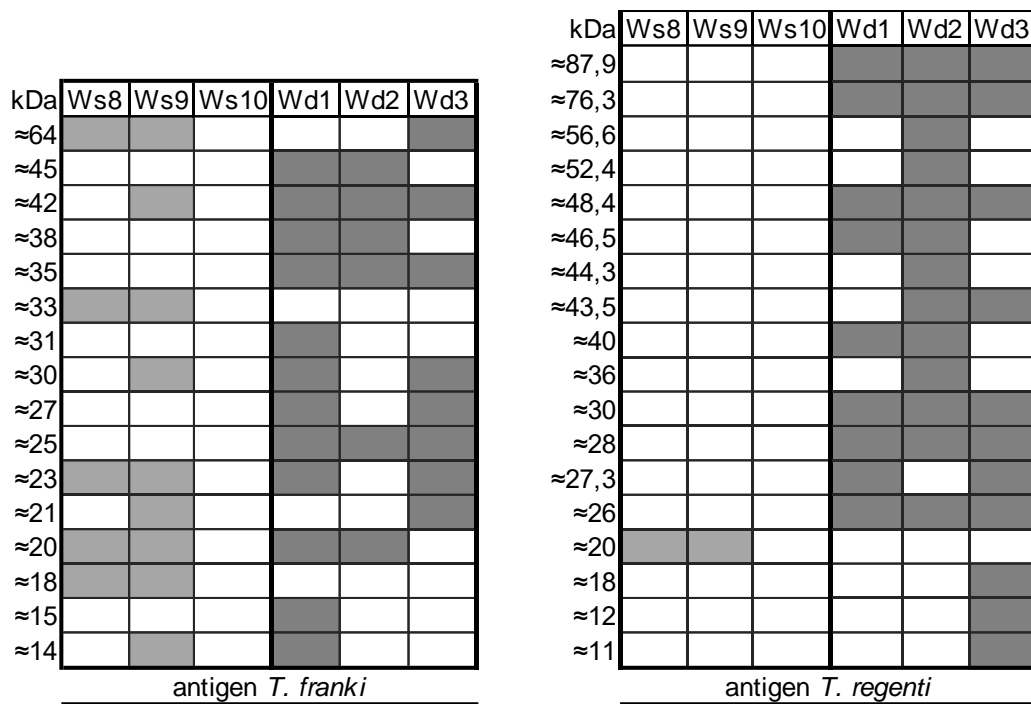
5.4 Western blot se séry divokých ptáků

Séra 3 labutí a 3 kachen byla testována proti antigenu *T. franki* a *T. regenti*. V případě labutí byla pozitivní reakce protilátek detekovatelná pouze slabě na membráně s antigenem *T. franki* (Obr.18). Bylo použito sérum labutě, u které byla potvrzená infekce viscerální ptačí motolicí (Tab. 4).

Protilátky v sérech kachen reagovaly s oběma antigeny (Obr. 18). Spektrum detekovaných antigenů *T. franki* bylo v těchto 3 případech velmi podobné, u antigenů z *T. regenti* nelze pozorovat přílišnou shodu (Obr. 19).



Obr. 18. Detekce antigenů *T. franki* a *T. regenti* reakcí protilátek v sérech divokých labutí a kachen. M – markery molekulové velikosti; 1 – Ws8; 2 – Ws9; 3 – Ws10; 4 – Wd1; 5 – Wd2; 6 – Wd3



Obr. 19. Antigeny *T. franki* a *T. regenti* detekované na membráně po reakci s protilátkami v séru divokých labutí a kachen. kDa – molekulová velikost antigenů; Ws8, Ws9, Ws10 – séra labutí; Wd1, Wd2, Wd3 – séra divokých kachen

6. DISKUSE

Celá tato práce byla zaměřena na ptačí schistosomy běžně se vyskytující v našich podmínkách u svých přirozených hostitelů. Cílem bylo pokusit se popsat protilátkovou odpověď ptáků na infekci těmito parazity a porovnat ji s již popsány výsledky, které se ale ve větší míře zaměřují na infekci savců, tedy nekompatibilních hostitelů. Současně bylo předmětem zájmu zhodnotit spektrum antigenů, na které imunitní systém protilátky cíleně vytváří, a dále zhodnotit jejich podobnost mezi jednotlivými parazitárními druhy.

Pro experimentální nákazu kachen byly použity 3 běžné druhy ptačích schistosom. Životní cykly *T. regenti* a *T. szidati* jsou trvale udržovány v laboratorních chovech PřFUK již řadu let, ale zdrojem *T. franki* byly lokality přirozeného výskytu jejich hostitelů. Pro následné navazující a rozšiřující práce by bylo, i ve světle zde popsaných výsledků, vhodné *T. franki* začlenit do dalších experimentů, které se doposud zaměřují především na *T. regenti*, případně na *T. szidati*. Dlouhodobě se však ukazuje problematika umělého udržení životního cyklu tohoto druhu bez pozitivních výsledků.

Přestože se všemi získanými plži *R. auricularia/R. sp.* bylo nakládáno standardním způsobem, nepodařilo se je udržet v chovu déle než několik měsíců a nikdy u nich nedošlo k produkci vajíček. Porovnání úmrtnosti neinfikovaných a uměle infikovaných jedinců neprokázalo, že by problémovým faktorem byli parazité. Do budoucna by bylo vhodné zvážit využití jiného druhu hostitelského plže pro potřeby udržování životního cyklu *T. franki*, například v laboratorních podmínkách dobře prosperující plže *R. lagotis*. Jouet *et al.* (2010) identifikovali *T. franki* i z *R. peregra*, který je zároveň možným hostitelem *T. regenti* (Horák *et al.*, 1998; Jouet *et al.*, 2008), a tudíž je pravděpodobné, že tyto dva druhy mohou využívat stejné, nebo minimálně velmi příbuzné plže jako mezihostitele.

Infekce kachen probíhala u všech druhů zcela identickým způsobem.

U každé kachny byla ověřována úspěšnost nákazy. U nákazy *T. franki* se ve dvou případech nepotvrdila, tj. nebyla zachycena miracidia z trusu (viz Tab. 2). V prvním z těchto dvou případů (kachna TFS2) však výsledky imunologických testů naznačovaly, že k nákaze, respektive protilátkové odpovědi na přítomnost parazita došlo. Je možné, že došlo k infekci cercáriemi pouze jednoho pohlaví, neboť jejich zdrojem byli jen 2 jedinci mezihostitelského druhu plže. Výsledek diagnózy mohl být také falešně negativní proto, že bylo vylučováno jen malé množství vajíček, které se

nepodařilo zachytit, neboť ptačí motolice obecně vylučují vajíček relativně málo (Appleton, 1986). Nízká infekční dávka (500 cercárií) mohla také vést k podstatně menšímu množství úspěšně přeživších schistosomul, která by mohla cyklus dokončit.

U druhého případu nepotvrzené infekce *T. franki* (kachna TFU) byly výsledky imunologických testů shodné s výsledky nenakažených kachen. Přestože jsou zaznamenány i měsíce opožděné sérokonverze u potvrzené nákazy schistosomami u lidí (Soentjens *et al.*, 2014), v případě nákazy ptáků takový posun imunitní reakce při nazeze motolicemi nebyl popsán. Také mohlo dojít ke ztrátám jedinců při samotné infekci. Úspěšnost penetrace cercárií je velice variabilní a nemusí být vysoká, ačkoliv výsledky Turjanicové *et al.* (2015) vliv infekční dávky na množství protilátek popírají.

Tato práce byla zaměřena hlavně na sledování vývoje protilátkové odpovědi u kachen domácích při individuální nazeze výše zmíněnými trichobilharziemi a ověření možné zkřížené reakce při testu reaktivity protilátek pomocí ELISA a western blotu. Byly charakterizovány změny hladin protilátek v průběhu infekce po dobu 20 dní v případě nákazy *T. regenti* a 50 dní v případě nákazy *T. fanki* a *T. szidati* a spektrum rozpoznávaných antigenů, se kterými protilátky po tuto dobu reagovaly. Předpokladem bylo, že by protilátky mohly zkříženě reagovat na antigeny nejen druhu infikujícího, ale i jemu příbuzných.

Imunitní systém definitivních hostitelů interaguje (a pravděpodobně je stimulován) vícero životními stádii trichobilharzií. Kromě penetrujících cercárií jsou to i schistosomula, dospívající červi, dospělci a konečně i vajíčka. Je logické, že všechna stadia obsahují část totožných antigenů, ale určitě i další rozdílné antigeny. Přesnější hodnocení celkové specifické reakce protilátek na nazezu daným druhem by tedy muselo zahrnovat průběh reakce na antigeny všech zmíněných stádií.

U lidských schistosom je nejvíce popsaných antigenních struktur, vhodných pro diagnostiku, z dospělých červů, z vajíček, a také ze schistosomul (Hinz *et al.*, 2017). Z výsledků Kouřilové & Kolářové (2002) vyplývá, že antigeny dospělých červů a schistosomul jsou natolik specifické, že se na ně vytváří protilátky pouze v hostiteli, ve kterém tato stadia přežívají. U savců tedy protilátky proti ptačím schistosomulím a dospělcům nevznikají, přestože došlo k infekci cercáriemi. Neplatí to však pro vajíčka savčích a ptačích schistosom, neboť v nich obsažená miracidia jsou si opět více podobná.

Ve výsledcích Turjanicové *et al.* (2015) nebylo prokázáno, že by antigen schistosomul byl pro imunodetekci *T. regenti* u kompatibilního hostitele vhodnější než cercariální, ale spíše naopak. Také pro získání dostatečného množství antigenu

z dospělců pro rozsah této práce by bylo zapotřebí usmrtit mnoho zvířat, proto byly pro přípravu antigenů použity pouze cercárie.

Výsledky ELISA ukázaly, že hladina IgY protilátek v séru kachen po infekci parazitem stoupá ve všech třech případech rozdílně. Narůstající trend byl však pozorován i u negativních sér. To ovšem koresponduje s detekcí nespecifické reakce protilátek ze sér nenakažených kachen s antigeny u všech tří druhů pomocí western blotu. Zároveň jsou průběhy reakcí na jednotlivé antigeny rozdílné z hlediska naměřených hodnot, což opět naznačuje i rozdílné spektrum nespecifických antigenů, na které se vážou protilátky nenakažených kachen.

Celkový stoupající trend pravděpodobně souvisí s tím, že se ptákům po vylíhnutí ještě nějakou dobu mírně zvyšuje celková hladina protilátek až do imunitní dospělosti kolem 30. dne (Glick, 1977), což ve zjištěných hodnotách odpovídá přibližně bodu 20 DPI. Zároveň pokles mateřských protilátek, ke kterému dochází nejvíce mezi 5.-15. dnem po vylíhnutí (Liu & Higgins, 1990), koresponduje s několika případy naměřené nejnižší hladiny nikoliv v době 0 DPI, ale 5 DPI. Nespecifické pozadí tedy bylo pravděpodobně způsobeno vazbou celkových protilátek na stěny jamky nebo i nespecificky na antigeny. Proto by bylo vhodné celý experiment doplnit měřením hladiny celkových protilátek, což je v tomto případě problematické, neboť komerční kity se zaměřují u ptáků pouze na kuřecí celkové protilátky a celý proces optimalizace a zavedení funkčního testu by bylo náročné.

Naměřené hodnoty hladin reagujících protilátek ve skupině kachen nakažených stejným parazitem v průběhu infekce byly většinou srovnatelné, přesto se v některých případech objevovaly hodnoty výrazně odlišné. To mohlo být dáno rozdílnou infekční dávkou. Přestože v případě nákazy *T. regenti* a *T. szidati* bylo aplikováno stejné množství cercárií, nebylo zjišťováno, jaká část úspěšně penetrovala do kůže kachny, respektive jaká část tento krok nezvládla a třeba i zůstala ve vodě, a zároveň jich mohlo velké množství zahynout velmi brzy po vstupu do kůže. Úmrtnost v infikované kůži se pohybuje mezi 30-50 % (Wulf *et al.*, 2007) a antigenní struktury zahynulých cercárií mohly být zlikvidovány imunitním systémem dříve, než se vytvořil dostatek specifických protilátek, které by bylo možné detekovat.

Zároveň experimentální kachny pocházely z outbredních chovů. Neměly tedy shodné genetické pozadí, a tudíž mohly výsledné reakce záviset na individualitě imunitního systému. Na druhou stranu genetická variabilita a nižší infekční dávky lépe vystihují přirozené podmínky, ve kterých se průběh oproti laboratorním experimentům může velmi lišit (např. Macháček *et al.*, 2018). Současně věk hostitele, a tím pádem

počáteční stav imunitního systému, má pozitivní vliv na míru protilátkové odpovědi (Turjanicová *et al.*, 2015).

Pro stanovení specifity reakce protilátek byla určena hladina cutoff z výsledků měřených na negativních kontrolách. Všechny testy homologních kombinací vykazovaly určitou míru specifity. U heterologních testů ELISA se reakce nepřesahující hodnoty cutoff objevily v případě kombinace antigenu *T. szidati* a nákazy *T. franki*; u nákazy *T. regenti* nelze v měřeném časovém období pro malý objem dat vyvodit jednoznačný závěr.

Přestože hodnoty naměřené v reakcích protilátek s antigenem *T. regenti* se mezi skupinami kachen se stejnou nákazou lišily, pravděpodobně by nešlo tento postup aplikovat při detekci neznámé nákazy divoce žijící kachny, protože Turjanicová *et al.* (2015) prokázali, že hladina specifických protilátek divokých a domácích kachen je odlišná (u divokých vyšší) a neví se, zda to platí i pro nákazy ostatními druhy trichobilharzií.

Pro čas 15 DPI byl vliv kombinace antigenu a typu nákazy na naměřené hodnoty reakce protilátek hodnocen statisticky. Výsledky ukázaly, že pokud by se pomocí ELISA měřila reakce protilátek v séru kachny 15 dní po infekci neurčitou ptačí trichobilharzií (respektive jednou z použitých pro tyto experimenty) s použitím postupně všech tří antigenů, bylo by možné určit, zda šlo o nákazu *T. regenti*, *T. franki*, nebo *T. szidati* společně s negativní nákazou, které obě nebyly statisticky průkazné. Použitím různých antigenů současně je tak možné odhadnout původce nákazy. Pro pozdější fáze infekce, než bylo stanoveno v tomto experimentu, by pravděpodobně bylo možné odlišit i nákazu *T. szidati*, jak naznačuje opožděné zvýšení hladiny reagujících protilátek nad hranici cutoff v případě antigenů *T. franki* a *T. szidati*.

Výsledky se shodovaly se stanovením specifity pomocí cutoff ve všech případech kromě měření reakce protilátek z kachen nakažených *T. szidati* s antigenem *T. regenti*, kde hodnoty vyšly nad hranici cutoff navzdory statistické neprůkaznosti difference od kontrol. Tento nesoulad je pravděpodobně dán nedostatečným počtem vzorků, který zásadně statistické analýzy ovlivňuje. Hranice cutoff vychází pouze z výsledků naměřených z kontrolních jedinců. Pokud by se tedy, jak bylo navrženo výše, měla jednorázově určit neznámá nákaza pomocí všech tří antigenů, hodnota naměřená pod hranicí specifity by mohla indikovat negativní vzorek, nebo nákazu *T. szidati*. Pro tento druh je tedy diagnóza pomocí ELISA nespolehlivá.

Turjanicová *et al.* (2015) charakterizovala trend v reakci protilátek kachen nakažených *T. regenti* na příslušný antigen jako prudce stoupající až ke stagnaci kolem

20. dne infekce, což bylo shodně ověřeno v této práci. Naopak viscerální druh *T. szidati* vykazoval velmi nízkou imunogenitu a docházelo pouze k mírnému nárůstu množství specifických protilátek. *T. franki* je stejně jako *T. szidati* viscerální druh, ale protilátkové reakce definitivního hostitele na tyto druhy se ukázala být velmi odlišná. Naměřené hladiny protilátek a rychlost jejich tvorby byly sice nižší, ale obdobné jako v případě nákazy *T. regenti*.

Rychlost iniciace imunitní odpovědi a množství protilátek v je tedy nejvyšší u *T. regenti*, pak u *T. franki* a nejnižší u *T. szidati*. Porovnáním zkřížené reaktivity sér vůči všem antigenům zde bylo také zjištěno, že hladina specificky reagujících protilátek na tyto antigeny klesá ve stejném pořadí. Z toho plyne, že výsledky testů s druhem *T. franki* stojí mezi dvěma extrémy zbylých dvou druhů.

Větší shoda výsledků z případů s *T. franki* s výsledky případů *T. regenti* než *T. szidati* naznačuje, že tyto dva druhy mají více strukturně podobných antigenů, které mohou být zdrojem zkřížených reakcí. Molekulární analýzy fylogenetických vztahů těchto tří druhů potvrzují bližší příbuznost *T. regenti* a *T. franki* (Jouet *et al.*, 2008), což podporuje uvedené výsledky, přestože životní strategie červů v definitivním hostiteli jsou naprosto odlišné.

Doposud nebyla u ptáků dostatečně testována dynamika tvorby protilátek, zda začne po čase opět klesat, a jaký vliv by na ni měla případná opětovná infekce s delším časovým odstupem. Podmínky tohoto experimentu umožňovaly sledovat dynamiku protilátek u nákazy *T. franki* a *T. szidati* maximálně do 50. dne po infekci, kdy se zdá být blízko maximu, protože v závěru stoupá mnohem pomaleji, a neklesá. Tento stav lze podle předchozích sledování očekávat i u *T. regenti* (Turjanicová *et al.*, 2015). Lichtenbergová *et al.*, (2008) zaznamenali zvýšenou hladinu specifických IgG protilátek u myši infikované *T. regenti* až do 120 dní po nákaze. I v případě *S. mansoni* lze u lidí naměřit signifikantní hladinu specifických protilátek v chronické, tedy pozdní fázi onemocnění v řádu měsíců (Soentjens *et al.*, 2014), proto lze očekávat, že budou zvýšené hladiny protilátek i u kachen detekovatelné dlouhodobě, což by mohlo být užitečné právě při testování sér divokých kachen, u kterých k infekcím dochází běžně a čas od té poslední se nedá spolehlivě určit, pokud není zrovna potvrzena nálezem vajíček, případně miracidíí v trusu.

Přirozeně také dochází k opakovaným nákazám jak ptáků, tak u náhodných nekompatibilních hostitelů, například člověka, u kterého v tom případě může dojít k projevům cercáriové dermatitidy (Horák *et al.*, 2015). U kachen nebyla zaznamenána významná změna ve specifické reakci protilátek po nákaze *T. regenti* při

opakovaných expozicích (Turjanicová *et al.*, 2015), naopak hladina protilátek po několikanásobné infekci u myší výrazně stoupala (Lichtenbergová *et al.*, 2008).

U případů cercáriové dermatitidy u lidí lze očekávat, že pokud opakovaná infekce vede k bouřlivější imunitní odpovědi (Olivier, 1949), bude mít vliv také na hladinu specifických protilátek. Sice platí, že po prodělané dermatitidě, bez ohledu na infekční druh, dochází u lidí ke zvýšené reakci protilátek na antigen *T. regenti* (Lichtenbergová *et al.*, 2008), nebylo totéž pozorováno pro antigen *T. szidati* (Macháček *et al.*, 2018). Nízká reakce IgG protilátek u nákazy *T. szidati* u lidí tedy koresponduje s nízkou reakcí IgY protilátek u kachen. S antigenem *T. regenti* reagovaly protilátky kachen ve všech případech nálezů, tudíž lze říci, že tento antigen může být použitelný pro odhalení prodělané infekce i u lidí. U kachen je možné, že by se pomocí tohoto antigenu dalo u divokých ptáků určit, zda byli vůbec někdy nakaženi.

Detekce konkrétních antigenů na western blotu probíhala dle relativního porovnání s markery daných molekulových velikostí. Kvůli značným rozdílům v pohybu vzorků, včetně markerů, při elektroforéze gelem, mohlo docházet k chybám při porovnávání velikostí a rozsahů detekovaných proužků na membránách. Vzhledem ke zvolené vyšší hustotě gelu nebylo možné dobře detekovat antigeny o velikosti nad 80 kDa, neboť v této oblasti nedocházelo k dostatečné separaci proteinů. Pro lepší výsledky by byly vhodnější delší a zároveň gradientové gely.

Pomocí western blotu lze blíže specifikovat reakci protilátek identifikací jednotlivých konkrétních antigenů na základě zjištěné molekulové velikosti. Cílem je odhalení dostatečně specifického antigenu, na který jsou protilátky infikovaným organismem vytvářeny cíleně pouze v případě dané nákazy.

Testováním reakcí protilátek v sérech ze zvířat infikovaných trichobilharziemi bylo odhaleno několik konkrétních antigenů, některé s možným diagnostickým potenciálem. Turjanicová *et al.* (2015) určili proteiny o velikosti 50 a 47 kDa z homogenátu cercárií *T. regenti* jako specificky rozpoznávané protilátkami kachen infikovaných tímto parazitem. To se shoduje i s výsledky v této práci, ale bylo zde potvrzeno, že určené antigeny mají nízkou druhovou specifitu, protože reagovaly i s protilátkami v sérech kachen nakažených *T. franki* i *T. szidati*, přestože senzitivita u homologní nákazy byla 100%.

Další antigeny trichobilharzií byly nalezeny při experimentálních infekcích myší a vyšetření pacientů s prodělanou cercáriovou dermatitidu. Protein o velikosti 34 kDa, identifikovaný jako glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH, nepublikováno), byl rozpoznáván protilátkami v sérech myší z infekce druhem *T. regenti*, nikoliv však

lidí infikovaných *T. szidati* (Lichtenbergová *et al.*, 2008; Macháček *et al.*, 2018). V této práci byl antigen odpovídající velikosti rozpoznáván ve všech třech homogenátech, vždy ale pouze protilátkami v sérech z kachen nakažených *T. regenti* nebo *T. franki*, ale i tak ne ve všech případech. Výsledek tedy naznačuje, že antigen je společný všem třem druhům parazita, ale v případě nákazy *T. szidati* zřejmě neindukuje imunitní odpověď. Vzhledem k tomu, že GAPDH je zásadní glykolytický enzym, není pravděpodobné, že by se zrovna u *T. szidati* vyskytoval ve významně menším množství. Může však docházet k menší míře úmrtnosti jedinců tohoto parazita v těle hostitele, a tudíž k menšímu uvolňování tohoto cytosolického antigenu. Samozřejmě se také mohlo jednat o zcela odlišné antigeny, pouze se shodnou molekulovou velikostí.

Na imunoblotech nebyl identifikován žádný spolehlivý antigen s vysokou senzitivitou specifický pouze pro jeden druh vybrané motolice. V případě nákazy kachen druhem *T. franki* byly sice protilátkami z jejich sér v homogenátu *T. franki* detekovány antigeny o velikostech kolem 52, 56 a 62 kDa specificky pro tuto nákazu, jednalo se však pouze o 2, 3 a 4 kachny (v pořadí pro zmíněné antigeny) z celkových 10. Bylo by vhodné potenciál těchto antigenů zhodnotit na větším vzorku infikovaných zvířat.

Cílem této práce bylo také odhalit potenciální antigen(y) použitelný pro diagnostiku nákazy různými ptačími motolicemi, který se měl dále charakterizovat pomocí proteomických metod. Protože však takový vhodný antigen s diagnostickým potenciálem nebyl jednoznačně identifikován, nebylo k tomuto kroku přistoupeno.

Ve shodě se jinými studii zabývajícími se zkříženými reaktivitami mezi příbuznými i nepříbuznými druhy bylo potvrzeno, že cercárie ptačích motolic mají určité podobné struktury (Kouřilová & Kolářová, 2002), a to jak proteiny, tak i glykoproteiny, obsažené v silně imunogenním glykokalyxu. Tyto struktury jsou navíc strukturně podobné glykanům cercárií *S. mansoni* (Turjanicová *et al.*, 2018). Antigeny podobné mezi druhy, rody i napříč nepříbuznými druhy (Chand *et al.*, 2010) mohou být zdrojem efektu zkřížených reakcí, které znesnadňují úspěch determinace specifického antigenu pro diagnostiku.

Aplikovatelnost laboratorních výsledků na přírodní systémy není v případě infekcí vodních ptáků trichobilharziemi doposud dostatečně experimentálně podložena. U ptáků přirozeně dochází k opakovaným nákazám i různými druhy parazitů v jednom jedinci a doposud nebylo testováno, jaký vliv na hladinu protilátek má souběžná infekce více druhy trichobilharzií. Současně se u nás vyskytuje více druhů ptačích motolic, než jaké se dnes běžně používají v diagnostických studiích, a

stále jsou recentně objevovány druhy nové, např. *T. anseri*, D. Jouet, L. Kolářová, C. Patrelle, H. Ferté, K. Skírnisson, 2015, nebo *T. mergi*, L. Kolářová, K. Skírnisson, H. Ferté, D. Jouet, 2013, objevené na Islandu. Ani výsledky testu reakce protilátek v sérech divokých kachen nedoznávaly shody s výsledky experimentálních nálezů, podle kterých by bylo možné odhadnout, jakým druhem byli tito jedinci v minulosti nakaženi.

Pokud bych měla shrnout pozorované výsledky, testem ELISA je možné odlišit nákazu *T. regenti* a *T. franki*, s menší pravděpodobností i *T. szidati* od nenakažených kachen za použití antigenu z cerkárií *T. regenti* nebo *T. franki*. Tato metoda by mohla být uplatňovaná pro primární určení, zda vůbec u testovaného jedince k nákaze někdy došlo.

Rozlišení infekce jednotlivými druhy by mohlo být možné pro experimentální infekce domácích kachen, jako v tomto experimentu, pro které byly definovány rozptyly hodnot, ve kterých se reakce protilátek na dané antigeny pohybuje. Pro aplikaci v přirozených podmínkách y bylo potřeba ověřit, jak protilátková odpověď přesně probíhá u divokých kachen nakažených těmito parazity.

Doposud nebyl identifikován antigen, který by mohl být spolehlivým diagnostickým markerem nákazy určitým druhem, přestože dříve definované antigeny *T. regenti* (Turjanicová *et al.*, 2015) reagují s protilátkami homologní nákazy spolehlivě.

Pro determinaci konkrétního druhu by mohl být vhodnější antigen dospělých červů. Protože zde bylo navrženo, že protilátková odpověď na přítomnost viscerální *T. franki* a neurotropní *T. regenti* je velmi podobná, pomocí antigenu dospělců těchto druhů, jejichž lokalizace je velmi odlišná, by mohlo být možné tyto dva druhy odlišit spolehlivě.

7. ZÁVĚR

Pomocí metod ELISA a western blot byl charakterizován průběh protilátkové odpovědi ptáků na infekci ptačími motolicemi *T. regenti*, *T. franki* a *T. szidati* reakcemi specifických protilátek s příslušným parazitárním antigenem. Zároveň bylo potvrzeno, že cercárie, které byly použity pro získání antigenu, sdílejí určité struktury, se kterými reagují i protilátky ptáků nenakažených. Také dochází ke zkřížené reakci protilátek dané nákazy se zbylými dvěma antigeny.

Bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Průběh protilátkové odpovědi při nálezích vybranými druhy ptačích schistosom byl prokazatelně odlišný a spíše odrážel příbuzenské vztahy daných druhů než jejich životní strategie v definitivním hostiteli.
2. Protilátky v séru nakažených kachen reagovaly v určité míře se všemi třemi antigeny, čímž byla potvrzena určitá shoda antigenů mezi infekčními stádii těchto motolic. Vzhledem k tomu, že mezi kombinacemi antigenů a sér určité nákazy byly pozorovány dobře definované rozdíly, bylo by možné s jejich užitím identifikovat probíhající či proběhnuvší jednorázovou infekci.
3. Komerčně produkováné protilátky používané v těchto experimentech na detekci kachních protilátek nejsou vhodné pro detekci protilátek u labutí. Protilátky v sérech divokých kachen reagují s množstvím antigenů z *T. regenti* a *T. franki*. Vzhledem ke komplikovanému systému vztahů ptáků a ptačích motolic v přirozeném prostředí je třeba protilátkovou odpověď a reakci s určitými antigeny blíže specifikovat, aby se dalo potvrdit, že jsou laboratorně zjištěné výsledky aplikovatelné ve veterinární praxi.
4. Dříve detekované antigeny *T. regenty* byly zhodnoceny jako druhově nespecifické, neboť s nimi reagovaly i protilátky v sérech kachen nakažených *T. franki* a v menší míře i *T. szidati*.
5. Protože se nepodařilo detekovat dostatečně specifický antigen s imunodiagnostickým potenciálem, nebylo zatím přistoupeno k proteomickým analýzám. V budoucnu by bylo vhodné otestovat možnost využití antigenu z dospělých červů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Al-Sherbiny, M. M., Osman, A. M., Hancock, K., Deelder, A. M., Tsang V. C. W. (1999): Application of immunodiagnostic assays: detection of antibodies and circulating antigens in human schistosomiasis and correlation with clinical findings, *The American journal of tropical medicine and hygiene* 60 (6), 960-966.
- Appleton, C. C., Lethbridge, R. C. (1979): Schistosome dermatitis in the Swan Estuary, Western Australia, *The Medical Journal of Australia* 1 (5), 141-145.
- Appleton, C. C. (1984): Schistosome dermatitis - an unrecognized problem in South Africa?, *South African Medical Journal* 65 (12), 467-469.
- Appleton, C., C. (1986) - Occurrence of avian Schistosomatidae (Trematoda) in South African birds as determined by a faecal survey, *South African Journal of Zoology*, ISSN: 0254-1858 (Print) (Online)
- Appleton, C., C., Brock, Kristen (1986): The penetration of mammalian skin by cercariae of *Trichobilharzia* sp. (Trematoda: Schistosomatidae) from south Africa, *Onderstepoort J. vet. Res.* 53, 209-211
- Baghian, A., Reyes, C. V., Mendoza, A., Tully, T. N., Kousoulas, K. G. (1999): Production of a Rabbit Anti-Cockatiel Immunoglobulin G and Characterization of Its Cross-Reactivities with Immunoglobulin G of Other Psittacine Species, *Avian Diseases* 43 (1), 48-54.
- Bartůňková, J., Paulík M. (2011) *Vyšetřovací metody v imunologii 2., přepracované a doplněné vydání.* Praha: Grada, ISBN 80-247-0691-1.
- Beck, L., Van-Lüme, D. S. M., Souza, J. R., Domingues, A. L. C., Favre, T., Abath, F. G. C., Montenegro S. M. L. (2008): Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni, *Acta Tropica* 108 (2-3), 229-233.
- Bei, A. K., Salter, J. P., Lim, K. C., McKerrow, J. H. (2001): Survey of trematode infections in Spring Lake Regional Park, California, USA, *Helminthologia* 38 (4), 250.
- Berg, C. O. (1973): Biological control of Snail-Borne diseases: A review, *Experimental Parasitology* 33 (2), 318-330.
- Blankespoor, H. D., Reimink, R. L. (1991): The control of swimmer's itch in Michigan: past, present, and future, *Michigan Academician* 24 (1), 7-23.
- Blankespoor, C. L., Reimink, R. L., Blankespoor, H. D. (2001): Efficacy of praziquantel in treating natural schistosome infections in common mergansers, *Journal of Parasitology* 87 (2), 424-427.
- Bourns, T. K. R., Ellis, J. C., Rau, M. E. (1973): Migration and development of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) in its duck hosts, *Canadian journal of Zoology* 51 (10), 1021-1030.

Cadman, H. F., Kelly, P. J., Dikanifura, M., Carter, S. D., Azwai, S. M., Wright, E. P. (1994): Isolation and Characterization of Serum Immunoglobulin Classes of the Ostrich (*Struthio camelus*), *Avian Diseases* 38 (3), 616-620.

Caldas, I. R., Campi-Azevedo, A. C., Oliveira, L. F. A., Silveira, A. M. S., Oliveira, R. C., Gazzinelli, G. (2008): Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection, *Acta tropica* 108 (2-3), 109-117.

Candido, R. R., Favero, V., Duke, M., Karl, S., Gutiérrez, L., Woodward, R. C., Graeff-Teixeira, C., Jones, M. K., Pierre, T. G. S. (2014): The affinity of magnetic microspheres for *Schistosoma* eggs, *International journal for parasitology* 45 (1), 43-50.

Clegg, J. A., Smithers, S. R. (1968): Death of schistosome cercariae during penetration of the skin: II. Penetration of mammalian skin by *Schistosoma mansoni*, *Parasitology* 58 (1), 111-128.

Cort, W. W. (1928): Schistosome dermatitis in the United States (Michigan), *Journal of the American Medical Association* 90 (13), 1027-1029.

Curtis, L. A., Hubbard, K. M. (1990): Trematode infections in a gastropod host misrepresented by observing shed cercariae, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 143 (1-2), 131-137.

De Jonge, N., Gryseels, B., Hilberath, G. W., Polderman, A. M., Deelder, A. M. (1988): Detection of circulating anodic antigen by ELISA for seroepidemiology of schistosomiasis mansoni, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (4), 591-594.

De Jonge, N., De Caluwe, P., Hilberath, G. W., Krijger, F. W., Polderman, A. M., Deelder, A. M. (1989): Circulating anodic antigen levels in serum before and after chemotherapy with praziquantel in schistosomiasis mansoni, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (3), 368-372.

Deelder, A. M., Klappe, H. T. M., Van den Aardweg, G. J. M. J., Van Meerbeke, E. H. E. M. (1976): *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in infected hamsters, *Experimental Parasitology* 40 (2), 189-197.

Dvořák, J., Sattmann, H., Horák, P., Konečný, R. (1999): Bird schistosomes from freshwater snails in Austria, with some notes on current problems (Digenea, Schistosomatidae), *Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol* 21, 69-76.

El Ridi, R., Montash, M., Tallima, H. (2004): Immunogenicity and vaccine potential of dipeptidic multiple antigen peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Scandinavian journal of immunology* 60 (4), 392-402.

Elhag, S. M., Abdelkareem, E. A., Yousif, A. S., Frah, E. A., Mohamed, A. B. (2011): Detection of schistosomiasis antibodies in urine patients as a promising diagnostic maker, *Asian Pacific journal of tropical medicine* 4 (10), 773-777.

Ellis, J. C., Bourns, T. K. R., Rau, M. E. (1975): Migration, development, and condition of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) in homologous challenge infections, *Canadian Journal of Zoology* 53 (12), 1803-1811.

- Feiler, W., Haas, W. (1988a): Host-finding in *Trichobilharzia ocellata* cercariae: swimming and attachment to the host, *Parasitology* 96 (3), 493-505.
- Feiler, W., Haas, W. (1988b): *Trichobilharzia ocellata*: chemical stimuli of duck skin for cercarial attachment, *Parasitology* 96(3), 507-517.
- Ferte, H., Depaquit, J., Carre, S., Villena, I., Leger, N. (2005): Presence of *Trichobilharzia szidati* in *Lymnaea stagnalis* and *T. franki* in *Radix auricularia* in northeastern France: molecular evidence, *Parasitology Research* 95 (2), 150-154.
- Frey A., Di Canzio J., Zurakowski D. (1998): A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods*.;221:35-41.
- Glick, B. (1977): The bursa of Fabricius and immunoglobulin synthesis, *International review of cytology* 48, 345-402
- Gordy, M. A., Cobb, T. P., Hanington, P. C. (2018): Swimmer's itch in Canada: a look at the past and a survey of the present to plan for the future, *Environmental Health* 17 (1), 73.
- Graczyk, T. K., Schiff, C. J. (2000): Recovery of avian schistosome cercariae from water using penetration stimulant matrix with an unsaturated fatty acid, *The American journal of tropical medicine and hygiene* 63 (3), 174-177.
- Gray, D. J., Ross, A. G., Li, Y. S., McManus, D. P. (2011): Diagnosis and management of schistosomiasis, *Bmj* 342, d2651.
- Grenfell, R., Martins, W., Silva-Moraes, V., Araujo, N., Oliveira, E., Fonseca, C., Coelho, P. M. Z. (2013): The schistosomula tegument antigen as a potential candidate for the early serological diagnosis of schistosomiasis mansoni, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 55 (2), 75-78.
- Haas, W., Pietsch, U. (1991): Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host, *Parasitology Research* 77 (7), 642-644.
- Haas, W. (2003): Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion, *Zoology* 106 (4), 349-364.
- Hamburger, J., Abbasi, I., Ramzy, R. M., 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, *The American journal of tropical medicine and hygiene* 65 (6), 907-911.
- Hamilton, J. V., Klinkert, M., Doenhoff, M. J. (1999): Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods, *Parasitology* 117 (7), 41-57.
- He, Y. X., Salafsky, B., Ramaswamy, K. (2001): Host-parasite relationships of *Schistosoma japonicum* in mammalian hosts, *TRENDS in Parasitology* 17 (7), 320-324.
- He, Y. X., Chen, L., Ramaswamy, K. (2002): *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*: early events associated with penetration and migration of schistosomula through human skin, *Experimental parasitology* 102 (2), 99-108.

- Hertel, J., Hamburger, J., Haberl, B., Haas, W. (2002): Detection of bird schistosomes in lakes by PCR and filter-hybridization, *Experimental parasitology* 101(1), 57-63.
- Hinz, R., Schwarz, N. G., Hahn, A., Frickmann, H. (2017): Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis – A review, *Molecular and cellular probes* 31, 2-21.
- Hoeffler, D. F. (1974): Cercarial dermatitis: Its etiology, epidemiology, and clinical aspects, *Archives of Environmental Health: An International Journal* 29 (4), 225-229.
- Hoeffler, D.E (1982). Cercarial dermatitis. In: *CRC Handbook Series in Zoonoses* (J.H.Steele, ed.), Section C: Parasitic Zoonoses (G.V. Hillyer and C.E. Hopla, eds), pp. 7-15. Boca Raton: CRC Press.
- Horák, P., Weiser, J., Mikeš, L., Kolářová, L. (1996): The Effect of *Bacillus thuringiensis* M-exotoxin on Trematode Cercariae, *Journal of Invertebrate Pathology* 68 (1), 41-49.
- Horák, P., Kolářová, L., Dvořák, J. (1998a): *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe, *Parasite* 5 (4), 349-357.
- Horák, P., Kovář, L., Kolářová, L., Nebesářová, J. (1998b): Cercaria–schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact, *Parasitology* 116 (2), 139-147.
- Horák, P., Kolářová, L., Dvořák, J. (1998c): A new nasal *Trichobilharzia* (schistosomatidae) from Europe, *Parasitology International* 47, 138.
- Horák, P., Dvořák, J., Kolářová, L., Trefil, L. (1999): *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems, *Parasitology* 119 (6), 577-581.
- Horák, P., Kolářová, L. (2000): Survival of bird schistosomes in mammalian lungs, *International Journal for Parasitology* 30 (1), 65-68.
- Horák, P., Kolářová, L. (2001): Bird schistosomes: do they die in mammalian skin?, *Trends in Parasitology* 17 (2), 66-69.
- Horák, P., Kolářová, L., Adema, C. M. (2002): Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*, *Advances in Parasitology* 52, 155-233.
- Horák, P., Kolářová, L. (2005): Molluscan and vertebrate immune responses to bird schistosomes. *Parasite Immunology* 27 (7-8), 247-255.
- Horák, P., Mikeš, L., Rudolfová, J., Kolářová, L. (2008): Penetration of *Trichobilharzia* cercariae into mammals: dangerous or negligible event?, *Parasite* 15 (3), 299-303.
- Horák, P., Kolářová, L., Mikeš, L. (2014): Schistosomatoidea and Diplostomoidea. In: *Digenetic Trematodes*, *Advances in Experimental Medicina and Biology* 766 (R. Toledo, B. Fried, ed.), Part III: Trematodes of Interest in Veterinary and Wildlife Disease, pp.331–364, New York 2014: Springer Science+Business Media
- Horák, P., Mikeš, L., Lichtenbergová, L., Skála, V., Soldánová, M., Brant, S. V. (2015): Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis, *Clinical microbiology reviews* 28 (1), 165-190.

Hrádková, K., Horák, P. (2002): Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice, *Journal of helminthology* 76 (2), 137-141.

Humphrey, B. D., Calvert, C. C., Klasing, K. C. (2004): The ratio of full length IgY to truncated IgY in immune complexes affects macrophage phagocytosis and the acute phase response of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), *Developmental & Comparative Immunology* 28 (7-8), 665-672.

Chamot, E., Toscani, L., Rougemont, A. (1998): Public health importance and risk factors for cercarial dermatitis associated with swimming in Lake Lemán at Geneva, Switzerland, *Epidemiology & Infection* 120 (3), 305-314.

Chand, M. A., Chiodini, P. L., Doenhoff, M. J. (2010): Development of a new assay for the diagnosis of schistosomiasis, using cercarial antigens, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104 (4), 255-258.

Chanová, M., Vuong, S., Horák, P. (2007): *Trichobilharzia szidati*: the lung phase of migration within avian and mammalian hosts, *Parasitology Research* 100 (6), 1243-1247.

Chanová, M., Lichtenbergová, L., Bulantová, J., Mikeš, L., Horák, P. (2012): *Trichobilharzia regenti*: antigenic structures of intravertebrate stages, *Open Life Sciences* 7 (1), 83-90.

Chrisanfova, G. G., Lopatkin, A. A., Mishchenkov, V. A., Kheidorova, E. E., Dorozhenkova, T. E., Zhukova, T. V., Ryskov, A. P., Semyenova, S. K. (2009): Genetic variability of bird schistosomes (class Trematoda, family Schistosomatidae) of Naroch Lake: identification of a new species in the *Trichobilharzia ocellata* group, *Doklady Biochemistry and Biophysics* 428, 698-702.

Ibrahim, M. M. (2007): Population dynamics of *Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta: Naididae) in the field populations of freshwater snails and its implications as a potential regulator of trematode larvae community, *Parasitology Research* 101(1), 25-33.

Jouet, D., Ferté, H., Depaquit, J., Rudolfová, J., Latour, P., Zanella, D., Kaltenbach, M. L., Léger, N. (2008): *Trichobilharzia* spp. in natural conditions in Annecy Lake, France, *Parasitology Research* 103 (1), 51-58.

Jouet, D., Skirnisson, K., Kolářová, L., Ferté, H. (2010): Molecular diversity of *Trichobilharzia franki* in two intermediate hosts (*Radix auricularia* and *Radix peregra*): a complex of species, *Infection, genetics and evolution* 10 (8), 1218-1227.

Jothikumar, N., Mull, B. J., Brant, S. V., Loker, E. S., Collinson, J., Secor, W. E., Hill, V. R. (2015): Real-time PCR and sequencing assays for rapid detection and identification of avian schistosomes in environmental samples, *Applied and Environmental Microbiology* 81 (12), 4207-4215.

Kašný M, Lichtenbergová L, Kolářová L, Horák P. Identification and characterization of dominant antigens of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti*. In: Mikeš L, Horák P, editors. Abstract Book – 3rd Workshop on Bird Schistosomes and Cercarial Dermatitis. Czech Republic: Charles University in Prague, Faculty of Science; 2009. p. 21.

Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J. (1972): A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis *mansoni*, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 14 (6), 397-400.

- Kinkel, H. F., Dittrich, S., Bäumer, B., Weitzel, T. (2012): Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis, *Clinical and Vaccine Immunology* 19 (6), 948-953.
- Knopp, S., Corstjens, P. L., Koukounari, A., Cercamondi, C. I., Ame, S. M., Ali, S. M., De Dood C. J., Mohammed, K. A., Utzinger, J., Rollinson, D., Van Dam, G. J. (2015): Sensitivity and specificity of a urine circulating anodic antigen test for the diagnosis of *Schistosoma haematobium* in low endemic settings, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (5), 1-20.
- Kock, S. (2001): Investigations of intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea: Schistosomatidae)
- Kolářová, L., Horák, P., Čada, F. (2001): Histopathology of CNS and nasal infections caused by *Trichobilharzia regenti* in vertebrates, *Parasitology Research* 87 (8), 644-650.
- 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, DOI 10.1007/s00436-002-0607-6
- Kouřilová, P., Hogg, K. G., Kolářová, L., Mountford, A. P. (2004): Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions, *The Journal of Immunology* 172 (6), 3766-3774.
- Kumpalume, P., Boushaba, R., Jones, R. G. A., Slater, N. K. H. (2002): Facile F (ab')₂ manufacturing: strategies for the production of snake antivenoms, *Food and Bioproducts Processing* 80 (2), 88-97.
- La Valette de St. George, A. (1855). *Symbolae ad Trematodum Evolutionis Historiam*. Dissertation. Berolius.
- Lawton, S. P., Lim, R. M., Dukes, J. P., Cook, R. T., Walker, A. J., Kirk, R. S. (2014): Identification of a major causative agent of human cercarial dermatitis, *Trichobilharzia franki* (Müller and Kimmig 1994), in southern England and its evolutionary relationships with other European populations, *Parasites and Vectors* 7 (1), 1-10.
- Leighton, B. J., Zervos, S., Webster, J. M. (2000): Ecological factors in schistosome transmission, and an environmentally benign method for controlling snails in a recreational lake with a record of schistosome dermatitis, *Parasitology international* 49 (1), 9-17.
- Leslie, G. A., Clem, L. W. (1969): Phylogeny of immunoglobulin structure and function: III. Immunoglobulins of the chicken, *Journal of Experimental Medicine* 130 (6), 1337-1352.
- Lewis, F. A., Tucker, S. (2014): Schistosomiasis. In: *Digenetic Trematodes*, Advances in Experimental Medicina and Biology 766 (R. Toledo, B. Fried, ed.), Part II: Trematodes of Interest in Human Health, 47-75.
- Li Hsü, S. Y., Hsü, H. F., Osborne, J. W. (1969): Immunization of rhesus monkeys against schistosome infection by cercariae exposed to high doses of X-radiation, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 131 (4), 1146-1149.

- Ligasová, A., Bulantová, J., Šebesta, O., Kašný, M., Koberna, K., Mikeš, L. (2011): Secretory glands in cercaria of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*-ultrastructural characterization, 3-D modelling, volume and pH estimations, *Parasites and Vectors* 4(1), 162.
- Liu, S., S., Higgins, D., A. (1990): Yolk-sac transmission and post-hatching ontogeny of serum immunoglobulins in the duck (*Anas Platyrhynchos*), *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 97B, No. 4, pp. 637-644, 1990 0305-0491/90 \$3.00 + 0.00, Printed in Great Britain
- 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 Immunology* 30 (11-12), 585-595.
- Lichtenbergová, L., Lassmann, H., Jones, M. K., Kolářová, L., Horák, P. (2011): *Trichobilharzia regenti*: Host immune response in the pathogenesis of neuroinfection in mice, *Experimental Parasitology* 128 (4), 328-335.
- Lillehoj, H. S., Trout, J. M. (1996): Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites, *Clinical Microbiology Reviews* 9 (3), 349-360.
- Lim, H. K., Heyneman, D. (1972): Intramolluscan inter-trematode antagonism: a review of factors influencing the host-parasite system and its possible role in biological control, *Advances in Parasitology* 10, 191-268.
- Liu, L. X. (1993): Spinal and cerebral schistosomiasis, *Seminars in Neurology* 13 (2), 189-200.
- Lopatkin, A. A., Chrisanfova, G. G., Voronin, M. V., Zazornova, O. P., Beer, S. A., Semyenova, S. K. (2010): Polymorphism of the *cox1* gene in cercariae isolates of bird schistosomes (Trematoda: Schistosomatidae) from ponds of Moscow and Moscow region, *Russian Journal of Genetics* 46 (7), 873-880.
- Lundqvist, M. L., Middleton, D. L., Radford, C., Warr, G. W., Magor, K. E. (2006): Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck, *Developmental & Comparative Immunology* 30 (1-2), 93-100.
- Magor, K. E., Warr, G. W., Bando, Y., Middleton, D. L., Higgins, D. A. (1998): Secretory immune system of the duck (*Anas platyrhynchos*). Identification and expression of the genes encoding IgA and IgM heavy chains, *European Journal of Immunology* 28 (3), 1063-1068.
- Macháček, T., Turjanicová, L., Bulantová, J., Hrdý, J., Horák, P., Mikeš, L. (2018): Cercarial dermatitis: a systematic follow-up study of human cases with implications for diagnostics. *Parasitology Research* 117 (12), 3881-3895.
- Marszewska, A., Cichy A., Bulantová J., Horák P., Żbikowska E., (2018a). *Potamopyrgus antipodarum* as a potential defender against swimmer's itch in European recreational water bodies—experimental study . *PeerJ* [online]. roč. 6, č. June, s. e5045. Získáno z: doi:10.7717/peerj.5045
- Marszewska, A., Strzała T., Cichy A, Dąbrowska G.B., Żbikowska E, (2018b). Agents of swimmer's itch—dangerous minority in the Digenea invasion of Lymnaeidae in water bodies and the first report of *Trichobilharzia regenti* in Poland. *Parasitology Research*

[online]. roč. 117, č. 12, s. 3695–3704. ISSN 14321955. Získáno z: doi:10.1007/s00436-018-6068-3

Mas-Coma, S., Valero, M. A., Bargues, M. D. (2009): Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis, *Veterinary Parasitology* 163 (4), 264-280.

McCormack, W. T., Tjoelker, L. W., & Thompson, C. B. (1991): Avian B-Cell Development: Generation of an Immunoglobulin Repertoire by Gene Conversion, *Annual Review of Immunology* 9 (1), 219-241.

McMullen, D. B., Beaver, P. C. (1945): Studies on schistosome dermatitis. IX. The life cycles of three dermatitis-producing schistosomes from birds and a discussion of the subfamily Bilharziellinae (Trematoda: Schistosomatidae), *American Journal of Hygiene* 42 (2), 128-154.

McWilliam, H. E. G., Driguez, P., Piedrafita, D., McManus, D. P., Meeusen, E. N. T. (2012): Novel immunomic technologies for schistosome vaccine development, *Parasite Immunology* 34 (5), 276-284.

Meuleman E., Huyer A. R., Mooij J.H. (1984): Maintenance of the life cycle of *Trichobilharzia ocellata* via the duck *Anas platyrhynchos* and the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Neth J Zool* 34, 414-417.

Moore, M. A. S., Owen, J. J. T. (1966): Experimental Studies on the Development of the Bursa of Fabricius, *Developmental Biology* 14 (1), 40-51.

Müller, V., Kimmig, P. (1994): *Trichobilharzia franki* n. sp.--the cause of swimmer's dermatitis in southwest German dredged lakes, *Applied Parasitology* 35 (1), 12-31.

Neuhaus, W. (1952a): Biologie und Entwicklung von *Trichobilharzia szidati* n. sp.(Trematoda, Schistosomatidae), einem Erreger von Dermatitis beim Menschen, *Parasitology Research* 15 (3), 203-266.

Neuhaus, W. (1952b): Der Einfluss des Zwischenwirtes auf die Gestalt der Cercariae von *Trichobilharzia szidati* Neuhaus, 1951 und ihre systematische Kennzeichnung, *Zoologischer Anzeiger* 148, 275-285.

Nevhotalu, P. A., Salafsky, B., Haas, W., Conway, T. (1993): *Schistosoma mansoni* and *Trichobilharzia ocellata*: comparison of secreted cercarial eicosanoids, *The Journal of Parasitology* 79 (1), 130-133.

Ng, P. L., Higgins, D. A. (1986): Bile immunoglobulin of the duck (*Anas platyrhynchos*). I. Preliminary characterization and ontogeny, *Immunology* 58 (2), 323-327.

Olah, I., Glick, B. (1978): The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius, *Poultry Science* 57 (5), 1445-1450.

Olivier, L. (1949): Schistosome dermatitis, a sensitization phenomenon, *American Journal of Hygiene*, 49 (3), 290-302.

Pearce, E. J., Basch, P. F., Sher, A. (1986): Evidence that the reduced surface antigenicity of developing *Schistosoma mansoni* schistosomula is due to antigen shedding rather than host molecule acquisition, *Parasite Immunology* 8 (1), 79-94.

- Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A., Sher, A. (1991): Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*, *Journal of Experimental Medicine* 173 (1), 159-166.
- Pointier, J. P., Jourdane, J. (2000): Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area, *Acta tropica* 77 (1), 53-60.
- Ratcliffe, M. J. (2006): Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development, *Developmental & Comparative Immunology* 30 (1-2), 101-118.
- Rau, M. E., Bourns, T. K. R., Ellis, J. C. (1975): Egg production by *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) after initial and challenge infection in ducks, *Canadian Journal of Zoology* 53 (5), 642-650.
- Ochodo, E. A., Gopalakrishna, G., Spek, B., Reitsma, J. B., Van Lieshout, L., Polman, K., Bossuyt, P. Leeflang, M. M. (2015). Circulating antigen tests and urine reagent strips for diagnosis of active schistosomiasis in endemic areas. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3.
- Picard, D., Jousson, O. (2001): Genetic variability among cercariae of the schistomatidae (Trematoda: Digenea) causing swimmer's itch in Europe, *Parasite* 8 (3), 237-242.
- Reynaud, C. A., Dahan, A., Anquez, V., Weill, J. C. (1989): Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region, *Cell* 59 (1), 171-183.
- Ross, A. G., Vickers, D., Olds, G. R., Shah, S. M., McManus, D. P. (2007): Katayama syndrome, *Lancet Infectious Diseases*, 7 (3), 218-224.
- Rudolfová, J., Sitko, J., & Horák, P. (2002): Nasal schistosomes of wildfowl in the Czech Republic, *Parasitology Research* 88 (12), 1093-1095.
- Rudolfová, J., Hampl, V., Bayssade-Dufour, C., Lockyer, A. E., Littlewood, D. T. J., Horák, P. (2005): Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host, *Parasitology Research* 95 (2), 79-89.
- Rudolfová, J., Sitko, J., Horák, P. (2006): Unusual finding of *Trichobilharzia* sp. in *Motacilla alba* in the Czech Republic, *Journal of Helminthology* 80 (1), 83-85.
- Rudolfová, J., Littlewood, D. T. J., Sitko, J., Horák, P. (2007): Bird schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland, *Folia Parasitologica* 54 (2), 88-93.
- Sarhan, R. M., Aminou, H. A., Saad, G. A. R., Ahmed, O. A. (2014): Comparative analysis of the diagnostic performance of adult, cercarial and egg antigens assessed by ELISA, in the diagnosis of chronic human *Schistosoma mansoni* infection, *Parasitology Research* 113 (9), 3467-3476.
- Shiff, C. J., Chandiwana, S. K., Graczyk, T., Chibatamoto, P., Bradley, M. (1993): A trap for the Detection of Schistosome Cercariae, *The Journal of Parasitology* 79 (2), 149-154.

Schets, F. M., Lodder, W. J., Husman, A. D. R. (2009): Confirmation of the presence of *Trichobilharzia* by examination of water samples and snails following reports of cases of cercarial dermatitis, *Parasitology* 137 (1), 77-83.

Smith, H., Doenhoff, M., Aitken, C., Bailey, W., Ji, M., Dawson, E., Gilis, H., Spence, G., Alexander, C., van Gool, T. (2012): Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing schistosome infections, *PLoS neglected tropical diseases*, 6 (9), 1-14.

Smithers, S. R., Terry, R. J. (1967): Resistance to experimental infection with *Schistosoma mansoni* in rhesus monkeys induced by the transfer of adult worms, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 61 (4), 517-533.

Soentjens, P., Cnops, L., Clerinx, J., Van Esbroeck, M., Bottieau, E. (2014): Late Seroconversion of Acute Schistosomiasis, *Journal of Travel Medicine* 21 (3), 219-220.

Soldánová, M., Selbach, C., Kalbe, M., Kostadinova, A., Sures, B. (2013): Swimmer's itch: etiology, impact, and risk factors in Europe, *Trends in Parasitology* 29 (2), 65-74.

Sousa, M. S., van Dam, G. J., Pinheiro, M. C. C., de Dood, C. J., Peralta, J. M., Peralta, R. H. S., Daher, E. F., Corstjens, P. L. A. M., Bezerra, F. S. M. (2019): Performance of an Ultra-Sensitive Assay Targeting the Circulating Anodic Antigen (CAA) for Detection of *Schistosoma mansoni* Infection in a Low Endemic Area in Brazil, *Frontiers in Immunology* 10, 1-16.

Souza Vidal, M. R., Barbosa Jr, A. A., Andrade, Z. A. (1993): Experimental pulmonary schistosomiasis: lack of morphological evidence of modulation in schistosomal pulmonary granulomas, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 35 (5), 423-429.

Špakulová, M., Horák P., Müller V. (2014). The karyotype of *Trichobilharzia Franki Müller et Kimmig, 1994* (Digenea: Schistosomatidae), a new european schistosome agent of swimmers'itch . *Parasite* [online]. roč. 4, č. 1, s. 63–66. ISSN 1252-607X. Získáno z: doi:10.1051/parasite/1997041063

Šteiger, V. (2018) Molekulární diagnostika ptačích schistosom při nákaze přirozených i náhodných hostitelů. Praha, 2018. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita Karlova, Fakulta přírodovědecká, Katedra parazitologie, 2018-05-31

Tanigawa, C., Fujii, Y., Miura, M., Nzou, S. M., Mwangi, A. W., Nagi, S., Hamano, S., Njenga, S. M., Mbanefo, E. C., Hirayama, K., Mwau, M., Kaneko, S. (2015): Species-specific serological detection for schistosomiasis by serine protease inhibitor (SERPIN) in multiplex assay, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (8), 1-17.

Tavares, R. G., Staggemeier, R., Borges, A. L. P., Rodrigues, M. T., Castelan, L. A., Vasconcelos, J., Anschau, M. E., Spalding, S. M. (2011): Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection, *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 17 (3), 239-248.

Teixeira, C. F., Neuhauss, E., Ben, R., Romanzini, J., Graeff-Teixeira, C. (2007): Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 1 (2), 1-5.

Tizard, I. (2002): The avian antibody response, *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11 (1), 2-14.

- Tong, H. F., Lin, D. Q., Pan, Y., Yao, S. J. (2011): A new purification process for goose immunoglobulin IgY (Δ Fc) with hydrophobic charge-induction chromatography, *Biochemical Engineering Journal* 56 (3), 205-211.
- Truant, A. L., Elliott, S. H., Kelly, M. T., Smith, J. H. (1981): Comparison of formalin-ethyl ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites, *Journal of clinical microbiology* 13 (5), 882-884.
- Tsang, V. C., Hancock, K., Maddison, S. E., Beatty, A. L., Moss, D. M. (1984): Demonstration of species-specific and cross-reactive components of the adult microsomal antigens from *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* (MAMA and JAMA), *The Journal of Immunology* 132 (5), 2607-2613.
- Tsang, V. C., Wilkins, P. P. (1997): Immunodiagnosis of Schistosomiasis, *Immunological Investigations* 26 (1-2), 175-188.
- Turjanicová, L., Mikeš, L., Pecková, M., Horák, P. (2015): Antibody response of definitive hosts against antigens of two life stages of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*, *Parasites and Vectors* 8 (1), 400.
- van Bolhuis, G. H., Rijks, J. M., Dorrestein, G. M., Rudolfova, J., van Dijk, M., Kuiken, T. (2004): Obliterative endophlebitis in mute swans (*Cygnus olor*) caused by *Trichobilharzia* sp.(Digenea: Schistosomatidae) infection, *Veterinary Pathology* 41 (6), 658-665.
- van Lieshout, L., De Jonge, N., El-Masry, N., Mansour, M. M., Bassily, S., Krijger, F. W., Deelder, A. M. (1994): Monitoring the efficacy of different doses of praziquantel by quantification of circulating antigens in serum and urine of schistosomiasis patients, *Parasitology* 108 (5), 519-526.
- von Lichtenberg, F., Sadun, E. H., Bruce, J. I. (1962): Tissue responses and mechanisms of resistance in schistosomiasis mansoni in abnormal hosts, *The American journal of tropical medicine and hygiene* 11 (3), 347-356.
- Weerakoon, K. G., Gobert, G. N., Cai, P., McManus, D. P. (2015): Advances in the diagnosis of human schistosomiasis, *Clinical Microbiology Reviews* 28 (4), 939-967.
- Weerakoon, K. G., Gordon, C. A., Williams, G. M., Cai, P., Gobert, G. N., Olveda, R. M., Ross, A. G., Olveda, D. U., McManus, D. P. (2017): Droplet digital PCR diagnosis of human schistosomiasis: parasite cell-free DNA detection in diverse clinical samples, *Journal of Infectious Diseases* 216 (12), 1611-1622.
- Wesselingh, F. P., Cadée, G. C., Renema, W. (1999): Flying high: on the airborne dispersal of aquatic organisms as illustrated by the distribution histories of the gastropod genera *Tryonia* and *Planorbarius*, *Geologie en Mijnbouw* 78 (2), 165-174.
- Wilson, R. A., Coulson, P. S. (1986): *Schistosoma mansoni*: dynamics of migration through the vascular system of the mouse, *Parasitology* 92 (1), 83-100.
- Wojcinski, Z. W., Barker, I. K., Hunter, D. B., Lumsden, H. (1987): An outbreak of schistosomiasis in Atlantic brant geese, *Branta bernicla hrota*, *Journal of Wildlife Diseases* 23 (2), 248-255.

Wulff, C., Haeberlein, S., Haas, W (2007): Cream formulations protecting against cercarial dermatitis by *Trichobilharzia*, *Parasitol Res* (2007) 101:91–97, DOI 10.1007/s00436-006-0431-5

Yu, Q., Yang, H., Feng, Y., Zhu, Y., Yang, X. (2012): Magnetic affinity enzyme-linked immunoassay for diagnosis of schistosomiasis japonicum in persons with low-intensity infection, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87 (4), 689-693.

Zhu, Y., Hua, W., Xu, M., He, W., Wang, X., Dai, Y., Zhao, S., Tang, J., Wang, S., Lu, S. (2012): A novel immunodiagnostic assay to detect serum antibody response against selected soluble egg antigen fractions from *Schistosoma japonicum*, *PloS One* 7(8): e44032.

Internetové zdroje:

WorldHealthOrganization (2018) Schistosomiasisfactsheet. WHO, Geneva, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>

Státní zdravotní ústav, Dotazník "Zdravotní problémy vzniklé v důsledku koupání nebo kontaktu s koupací vodou" <http://www.szu.cz/tema/zivotni-prostredi/dotaznik-zdravotni-problemy-vznikle-v-dusledku-koupani-nebo>

9. PŘÍLOHA Č. 1

Použité chemikálie a složení pufrů				
homogenizace cerkářů	inhibitory proteáz	Complete Mini EDTA-free		Roche
	fosfátový pufr pH 7,2	NaH ₂ PO ₄	0,1M	Sigma Aldrich
		Na ₂ HPO ₄	0,1M	Sigma Aldrich
		NaCl	0,1M	
měření koncentrace proteinů	komerční kit	Quant-IT™ Protein Assay		Invitrogen
SDS-PAGE	redukující pufr	NuPAGE® Sample Reducing Agent		Thermo Fisher Scientific
	marker	Precision Plus Protein™ DualXtra Standards		Bio-Rad
Western blot	blokace	sušené odtučněné mléko Blotting Grade Blocker		Bio-Rad
	sekundární protilátky	Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-Duck IgG (H+L)		KPL
	komerční kit	Opti – 4CN™		Bio-Rad
Western blot/ELISA	fosfátový pufr pH 7,2	NaH ₂ PO ₄	0,1M	Sigma Aldrich
		Na ₂ HPO ₄	0,1M	Sigma Aldrich
		NaCl	0,1M	
		Tween 20	0,05%	Bio-Rad
ELISA	uhličitanový pufr pH 9,6	Na ₂ CO ₃	15 mM	
		NaHCO ₃	35 mM	
	blokace	Kasein z hovězího mléka		Sigma Aldrich
	sekundární protilátky	Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-Duck IgG (H+L)		KPL
	substrátové čidlo	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA		Sigma Aldrich
	stop reakce	HCl		

10. PŘÍLOHA Č. 2

- 1. ČÁST

Naměřené hodnoty OD₄₅₀ z ELISA pro 3 antigeny - kontrolní séra a hodnoty cutoff

DPI	KOR	KOS	KOT	KOU	KOV2	KON1	KON2	KO-prům	SmOdch	cutoff
antigen <i>T. regenti</i>										
0	0,08352	0,05205	0,05667	0,14263	0,05556	0,20714	0,2913	0,12698	0,08554	0,31888
5	0,06389	0,06158	0,08379	0,19707	0,05478	0,10369		0,09413	0,04885	0,20528
10	0,08455	0,08028	0,03921	0,18217	0,14377	0,12716	0,14398	0,11444	0,04504	0,21549
15	0,09582	0,13803	0,18281	0,16791	0,27486	0,20197	0,40601	0,20963	0,09518	0,42316
20	0,09953	0,18134	0,28408	0,34327	0,30675			0,24299	0,08966	0,45119
30	0,17289	0,1626						0,16774	0,00515	0,18286
40	0,32929						0,41715	0,37322	0,04393	0,50226
50	0,32438	0,59753						0,46096	0,13657	0,86212
antigen <i>T. franki</i>										
0	0,0569	0,29621	0,2878	0,09453		0,18351	0,2735	0,19874	0,09507	0,42546
5	0,05147	0,14945	0,23199	0,10605		0,14191		0,13617	0,05911	0,28005
10	0,08568	0,10056	0,39485	0,2222		0,14198	0,09839	0,17394	0,10881	0,43343
15	0,06686	0,20783	0,49712	0,50508		0,17862	0,35634	0,30197	0,16414	0,6934
20	0,09091	0,30446	0,3586	0,49557				0,31238	0,14561	0,6784
30	0,4403	0,54403	0,41819				0,73412	0,53416	0,12484	0,84798
40	0,51707	0,59614	0,57977				0,88477	0,64444	0,14186	1,00104
50	0,60527	0,77884						0,69205	0,08678	0,95923
antigen <i>T. szicatii</i>										
0	0,04871	0,23993	0,0711	0,09434	0,11437	0,39565	0,2796	0,13811	0,11995	0,32816
5	0,09195	0,29967	0,11771	0,08472	0,24534		0,27323	0,18543	0,08927	0,39833
10	0,13518	0,3607	0,16433	0,12607	0,3763		0,34	0,25043	0,10969	0,51201
15	0,17842	0,42173	0,21095	0,15621	0,46849	0,59209	0,39649	0,28713	0,15408	0,58152
20	0,35089	0,50381	0,2783	0,19959	0,56068		0,42699	0,38671	0,12493	0,68465
25			0,34565	0,3065				0,32607	0,01957	0,38634
30	0,52336	0,4642	0,413					0,46685	0,04509	0,58708
40	0,69583	0,56582	0,48035					0,58066	0,08859	0,81688
50	0,8683	0,94721						0,90775	0,03945	1,02922

Písmenné označení jedinců viz Tab. 2; XX-prům - průměr; SmOdch - směrodatná odchylka

- 2. ČÁST

Naměřené hodnoty OD₄₅₀ z ELISA pro 3 antigeny - séra příslušných nákaz

DPI	TRU1	TRU2	TRU3	TRV1	TRV2	TRV3	TRV4	TRV6	TR-prům.	SmOdch
0	0,56314	0,23458	0,4388	0,07924	0,16735	0,10934	0,26644	0,46755	0,2908	0,15819
5	0,94793	0,28584	0,51009	0,20506	0,55386	0,2566	0,61366	0,52005	0,48663	0,21445
10	1,13913	0,36981	0,56052	0,4928	0,75615	0,85202	1,13763	0,65605	0,74551	0,26357
15	2,02968	1,26109	1,95483		1,46015	1,36262	1,96102	1,03784	1,58103	0,37158
20	2,16938	1,42519	2,16288		1,59648		1,97662	1,52864	1,80986	0,30971
30										
40										
50										

DPI	TFR	TFS1	TFS2	TFS3	TFT	TFN1	TFN3	TFN4	TF-prům	SmOdch
0	0,02818	0,22694	0,15753	0,12447	0,27365	0,7835	0,29689	0,32384	0,27687	0,21246
5	0,0531	0,60516	0,63858	0,68241	0,37466	0,26692		0,17031	0,39873	0,22997
10	0,07997	0,66304	0,77986	1,06452	0,72187	0,61815	0,21816	0,49927	0,5806	0,29382
15	0,3558	1,01387	1,38732	1,07477	1,05438	1,14202	0,84162	1,69977	1,07119	0,3654
20	0,36473	1,47347	1,16552	1,08382	1,33817	0,99852		1,55982	1,19772	0,25858
30	1,03674	1,60027	1,41322	1,39647	1,55122		1,46467		1,41043	0,18196
40	1,23169	1,64782	1,59127	1,61742	1,47807				1,51325	0,15203
50	1,16389	1,74287	1,35252	1,77477	1,52967				1,51274	0,23207

DPI	TSS1	TSS2	TSU1	TSU2	TSV1	TSV2	TS-prům	SmOdch
0	0,26272	0,21419	0,31541	0,10058	0,21035	0,194	0,21621	0,06571
5	0,22706	0,26205	0,36759	0,21102	0,25396	0,24469	0,26106	0,05054
10	0,34654	0,49111	0,3379	0,2127			0,34706	0,0986
15	0,4057	0,43277	0,36941	0,3453	0,38753	0,53578	0,41275	0,06144
20	0,51469	0,7012	0,40216	0,3088	0,59119	0,52458	0,5071	0,12612
25			0,43492	0,45108	0,59035	0,60413	0,52012	0,07748
30	0,77177	0,8377			0,59392	0,76532	0,74217	0,09016
40	1,07415	1,30625					1,1902	0,11605
50	1,19582	1,33036					1,26309	0,06727

Písmenné označení jedinců viz Tab. 2; XX-prům - průměr; SmOdch - směrodatná odchylka

- 3. ČÁST

Naměřené hodnoty OD₄₅₀ z ELISA pro 3 antigeny - zkřížené reakce heterologních nákaz

antigen <i>T. regenti</i>													
DPI	TSS1	TSS2	TSU1	TSU2	TFR	TFS1	TFS2	TFS3	TFN1	TFN3	TFN4		
0	0,14137	0,05137	0,32649	0,32649	0,11412	0,16105	0,06714	0,04787	0,56511	0,41393	0,312		
5													
10									0,33204	0,38615	0,35344		
15	0,56851	0,57265	0,53556	0,57955	0,94903	0,73406	0,81054	0,4452	0,6795	1,03977	0,90462		
20			0,69992	0,73572									
30													
40									1,11712	1,00977	1,66402		
50	0,96872	1,26262			1,03303	1,50102	1,30092	1,29997					
antigen <i>T. franki</i>													
DPI	TRU1	TRU2	TRU3	TRV4	TSS1	TSS2	TSU1	TSU2	TSV1				
0	0,15244	0,20775	0,37212	0,42172	0,19617	0,11709		0,26699	0,15466				
5					0,07123		0,34303						
10	0,11852	0,27071	0,604	1,12052	0,23603								
15	0,07329	0,83009	0,92073	1,35947	0,30416	0,65653	0,47076	0,39914	0,52201				
20	1,21834	1,38947	1,23747	1,59842	0,40212		0,70864	0,64087					
30					0,81943				0,97412				
40					1,05609								
50					1,02124	1,02214							
antigen <i>T. szidati</i>													
DPI	TFR	TFS1	TFS2	TFS3	TFT	TFN1	TRU1	TRU2	TRU3	TRV2	TRV4		
0	0,05733	0,0882	0,06885	0,07799	0,0572	0,26973	0,08146	0,06894	0,07225	0,1059	0,29817		
5											0,3723		
10							0,13872	0,16219	0,17858	0,54845	0,48129		
15	0,47635	0,41485	0,57464	0,29281	0,4257	0,41864					0,5968		
20							0,53364	0,60742	0,62524	1,20436	0,75		
25													
30													
40						0,682							
50	0,7743	1,10041	0,87021	0,83887	0,80658								

Písmenné označení jedinců viz Tab. 2; XX-prům - průměr; SmOdch - směrodatná odchylka