

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Magisterské studium

Studijní obor: Odborná biologie

Akademický rok: 2008/2009

Forma studia: prezenční

**Příprava a použití polyklonálních  
protilátek pro detekci skladištních roztočů  
*Acarus siro* a *Tyrophagus putrescentiae***

Preparation and application of the polyclonal antibodies for  
detection of storage mites *Acarus siro* and *Tyrophagus  
putrescentiae*

**(Diplomová práce)**

Vypracoval: Andrea Klaudyová

Školitel: prof. RNDr. Jaroslav Smrž, CSc.

Školitel konzultant: Mgr. Jan Hubert, Ph.D.

Mgr. Iva Křížková – Kudlíková, Ph.D.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „**Příprava a optimalizace polyklonálních protilátek pro detekci skladištních roztočů**“ vypracovala samostatně pod vedením uvedených školitelů. Všechnu použitou literaturu jsem uvedla v přehledu literatury.

V Praze dne 4.9.2008

*PhDr. J. Smrží*  
.....

## Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat prof. RNDr. Jaroslavu Smržovi, Csc za vedení mé diplomové práce. Stejně tak Mgr. Janu Hubertovi, Ph.D. a Mgr. Ivě Kudlíkové-Křížkové, Ph.D za odbornou pomoc, užitečné rady a konzultace, bez kterých by tato práce nevznikla. Mgr. Tomáši Erbanovi za přátelské rady a dále Pavlu Horákovi, Mgr. Julii Chalupníkové, Jitce Dunaiové a Šárce Tučkové za technickou pomoc. Také bych velmi chtěla poděkovat rodině a blízkým kamarádům za nenahraditelnou psychickou podporu a trpělivost.

## Abstract

Among the mites from the family Acaridae (Acari) there are serious pests of stored plant and animal products of medical and economical importance. Their early detection is necessary to minimize the losses of stored food. Among the detection methods the immunochemical ones are rapidly developing. In addition, there are commercially available antibodies in ELISA kits for detection of related house dust mites (*Dermatophagoides spp.*). In spite of those such methods are not frequently used for the detection of stored product mites. The aim of this study is focused to the application of ELISA tests for such purposes.

Polyclonal antibodies (Pabs) were developed for the detection of *Acarus siro* and *Tyrophagus putrescentiae*. Pabs were prepared against antigens in the form of protein fractions from whole body homogenates.

(i) Two Pabs (anti-AcaSir K53 and anti-AcaSir K54) were prepared against mite *A. siro*.

Specificity and sensitivity of the purified Pabs were evaluated by PTA-ELISA in the working concentrations of the Pabs 1 µg IgG/ml, the tests with both Pabs showed high sensitivity to immunogen and have identical detection limits 0,1 µg/ml of antigen proteins/ml in this working concentration. The Pab K53 did not show any cross-reactivities to storage product insects, micro-fungi, rearing diets of mites (yeast and wheat diet), extracts from wheat kernels and other mites except the relative species of mite *Acarus gracilis*. The Pab K54 showed strong cross-reactivities to *A. gracilis* too and weak cross-reactivities to mites *Carpoglyphus lactis*, *Tyroborus lini* and *Tyrophagus spp.*

(ii) Two Pabs (anti-TyrPut K60 and anti-TyrPut K 61) were prepared against mite *T. putrescentiae*. Purified Pabs were evaluated by the same method as previous in the range of working concentrations 0.1 – 1 µg of IgG/ml. Both Pabs have identical detection limits 0,05 µg/ml of antigen proteins/ml in working concentration 1 µg of IgG/ml. Both Pabs showed strong cross-reactivity to mites of Acaridae, Carpo-glyphidea and Glycyphagidae family. No cross-reaction was found for the family Pyroglyphidae, stored product insects, micro-fungi and the rearing diets of mites. The test with the obtained antibodies enabled to detect and quantify the mites and their faeces. The ability of the detection of faeces was confirmed in the test with

various population densities of *T. putrescentiae* in wheat grain after the removal of the mites.

These results indicate the possibility of application of PABs in ELISA test for detection of stored product mites contamination. The possibility to detect faeces is considered as the main advantage of developed tests.

## Anotace

Mezi roztoče čeledi Acaridae (Acari) patří závažní škůdci skladovaných rostlinných a živočišných produktů, kteří mají velký medicínální a ekonomický význam. Jedním z nezbytných kroků k minimalizaci ztrát skladovaných potravin je včasná detekce skladištních škůdců. Nejrychleji ze všech metod určených k detekci kontaminace potravin se vyvíjejí imunochemické metody. Dokonce již existují komerčně dostupné protilátky využitelné v ELISA kitech pro detekci druhů příbuzných prachových roztočů (*Dermatophagoides spp.*). Pro detekci skladištních roztočů nejsou tyto metody zatím příliš často využívány. Proto je cílem této práce vývoj protilátek a optimalizace jejich aplikace v ELISA testech pro detekci skladištních roztočů.

Pro detekci roztočů druhu *Acarus siro* a *Tyrophagus putrescentiae* byly vyvinuty polykonální protilátky (Pabs), které byly připraveny proti antigenu ve formě proteinové frakce z celotělního homogenátu roztočů.

(i) Proti druhu *A. siro* byly připraveny dvě Pabs (anti-AcaSir K53 a anti-AcaSir K54). Jejich citlivost a specifická byla hodnocena při použití v PTA-ELISA testu při pracovní koncentraci Pabs 1 µg IgG/ml. Obě Pabs vykazovaly při této koncentraci vysokou citlivost vůči imunogenu se stejným detekčním limitem 0,1 µg imunogenu/ml. Pab K53 byla hodnocena jako vysoce specifická bez křížových reakcí ke skladištnímu hmyzu, mikromycetům, skladovaným produktům, chovné potravě a ostatním skladištním roztočům kromě příbuzného druhu *Acarus gracilis*. Pab K54, vyjma silné křížové reakce na druh *A. gracilis*, vykazovala slabé křížové reakce k roztočům *Carpoglyphus lactis*, *Tyroborus lini* a *Tyrophagus spp.*

(ii) Proti druhu *T. putrescentiae* byly také připraveny dvě Pabs (anti-TyrPut K60 a anti-TyrPut K61). Tyto Pabs byly charakterizovány stejně jako v předchozím případě, nyní však v rozmezí pracovní koncentrace na 0,1-1 µg IgG/ml. Obě měly stejný detekční limit 0,05 µg antigen/ml pro pracovní koncentraci 1 µg of IgG/ml.

Dále vykazovaly silnou křížovou reakci na roztoče čeledi Acaridae, Carpoglyphidea a Glycyphagidae. Vůči čeledi zástupců prachových roztočů Pyroglyphidae nebyla zjištěna žádná křížová reakce. Nebyly pozorovány křížové reakce ani ke skladištnímu hmyzu, mikromycetům, skladovaným produktům a chovné dietě roztočů. Test s připravenými protilátkami umožnil detekci a kvantifikaci roztočů a jejich exkrementů. Schopnost detekce exkrementů byla potvrzena testem s různou populační hustotou druhu *T.putrescentiae* v pšeničných obilkách po vyjmutí jedinců.

Získané výsledky nabízejí možnost aplikace Pabs v ELISA testech určených k detekci kontaminace skladovaných potravin roztoči. Hlavní výhodou těchto testů s připravenými protilátkami je schopnost detekce exkrementů.

## Obsah

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1      | Úvod.....  | 8  |
| 1.1    | Vstupní hypotézy .....   | 9  |
| 2      | Literární přehled .....  | 11 |
| 2.1    | Synantropní roztoči .....  | 11 |
| 2.1.1  | Skladištní versus prachoví roztoči .....   | 11 |
| 2.1.2  | Význam synantropních roztočů pro člověka .....   | 13 |
| 2.2    | Přehled metod sledování skladištních roztočů .....   | 15 |
| 2.3    | Modelové druhy roztočů .....   | 17 |
| 3      | Materiál a metodika .....  | 20 |
| 3.1    | Modelové druhy roztočů .....   | 20 |
| 3.2    | Chovy roztočů .....  | 20 |
| 3.3    | Příprava Pabs proti roztočům druhu <i>A. siro</i> a <i>T. putrescentiae</i> .....  | 21 |
| 3.3.1  | Příprava imunogenu roztočů <i>A. siro</i> a <i>T. putrescentiae</i> .....  | 21 |
| 3.3.2  | Imunizace .....  | 22 |
| 3.3.3  | Izolace IgG.....   | 23 |
| 3.4    | Komerční protilátka anti Tyr p 2.....  | 23 |
| 3.5    | Příprava antigenů a vzorků použitých k charakterizaci anti-AcaSir a anti-TyrPut .....  | 23 |
| 3.6    | Příprava materiálu pro pokus sledování dynamiky produkce exkrementů roztočů .....  | 25 |
| 3.7    | Příprava exsikátorů a termostatů pro pokus sledování dynamiky produkce exkrementů <i>T.putrescentiae</i> .....   | 26 |
| 3.8    | PTA-ELISA.....   | 26 |
| 3.9    | Způsoby charakterizace připravených Pabs .....   | 27 |
| 3.9.1  | Titr séra .....  | 27 |
| 3.9.2  | Citlivost Pabs .....   | 28 |
| 3.9.3  | Specifičnost – Křížové reakce .....  | 28 |
| 3.9.4  | Detekční limit .....   | 28 |
| 3.10   | Aplikace protilátek v měření dynamiky produkce exkrementů roztočů <i>T. putrescentiae</i> .....  | 29 |
| 3.10.1 | Uspořádání experimentu .....   | 29 |
| 3.10.2 | Zpracování vzorků .....  | 29 |
| 3.10.3 | Měření produkce exkrementů .....   | 30 |
| 3.10.4 | Analýza dat .....  | 30 |
| 3.11   | Seznam použité techniky, chemikálií a programů.....  | 31 |
| 4      | Výsledky .....   | 33 |
| 4.1    | Charakterizace Pabs .....  | 33 |
| 4.1.1  | Příprava antigenů .....  | 34 |
| 4.1.2  | Pabs anti-AcaSir .....   | 34 |
| 4.1.3  | Pabs anti-TyrPut .....   | 40 |
| 4.2    | Komerční protilátka anti-Tyr p 2 .....   | 44 |
| 4.3    | Aplikace Pabs anti-TyrPut K61 a komerční anti-Tyr p 2 v měření dynamiky produkce exkrementů roztočů <i>T. putrescentiae</i> v závislosti na vnitřní rychlosti růstu populace ( <i>r</i> )..... | 49 |
| 5      | Diskuze .....  | 55 |
| 5.1    | Použití Pabs anti-AcaSir a anti-TyrPut v komerčních kitech.....  | 55 |
| 5.1.1  | Charakteristika Pabs anti-A.siroK53 a anti-A.siroK54 .....   | 56 |
| 5.1.2  | Charakteristika Pabs Anti-Tyr-put K61 .....  | 56 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 5.2 | Aplikace PABs anti-TyrPut K61 a komerční anti-Tyrp2 při sledování dynamiky produkce alergenů (exkrementů) u vymírajících a rostoucích populací roztoče <i>T. putrescentiae</i> ..... | 58 |
|     | 5.2.1 Využití Pabs anti-AcaSir a anti-TyrPut .....   | 59 |
| 6   | Závěr .....  | 61 |
| 7   | Literatura:.....   | 63 |
| 8   | Příloha.....   | 70 |

# 1 Úvod

Roztoči jsou nepatrní živočichové z řádu členovců. Jejich velikost většinou nepřesahuje třetinu milimetru, a tedy jsou lidským okem téměř neviditelní. Přesto jejich existenci pociťuje stále větší procento lidské populace. V současnosti se mluví především o roztočích prachových, žijících v civilizovaných domácnostech, zvyšující výskyt alergických onemocnění (Bronswijk-van a Sinha, 1971; Arlian, 2002). Stejně riziko představují i roztoči napadající skladované potraviny, tzv. skladištní roztoči, kteří navíc hygienickým znečištěním a vlastním napadením potraviny způsobují značné ekonomické ztráty (Erban, 2007). Riziko kontaminace nepředstavují pouze roztoči samotní, ale také produkty jejich metabolismu exkrementy. Ty v potravinách zůstávají i po zbavení potravin roztočů. Exkrementy roztočů nejsou jen hygienicky nepřijatelné, ale navíc právě ony jsou jedním z hlavních zdrojů alergenů (Tovey et al., 1981). Proto je velmi důležitá existence spolehlivé, rychlé a finančně únosné metody, detekující případnou infestaci potravin roztoči, aktuální i minulou. Donedávna používané metody určující kontaminaci potravin skladištními škůdci těmito kritériím nevyhovují. Teprve v současné době se začínají objevovat a optimalizovat moderní způsoby detekce kontaminace potravin roztoči, které splňují všechny uvedené podmínky. Jednou z takových metod detekce je použití protilátek v imunochemických testech.

Mezi hlavní cíle této práce patří právě optimalizace použití polyklonálních protilátek pro detekci roztočů a jejich exkrementů. Konkrétně polyklonálních protilátek vyvinutých proti roztočům *A. siro* a *T. putrescentiae*, kteří patří k jedněm z nejhojněji se vyskytujících skladištních škůdců v potravinách ve středoevropských podmínkách (Žďárková, 1967).

Díky schopnosti protilátek detekovat exkrementy roztočů je nyní možné objasnit některé další aspekty kontaminace potravin těmito škůdci, jejichž znalost by mohla zamezit nebo alespoň snížit poškození skladovaných potravin roztoči. Snaha o minimalizaci ztrát skladovaných potravin způsobená napadením roztoči vedla k vypracování několika studií zabývajících se dynamikou vývoje populace roztočů v různých fyzikálních podmínkách (Cunnington, 1965; Arlian et al., 2001; Aspaly et al., 2007). Byla zjištěna výrazná závislost rozvoje populace roztočů na vlhkosti vzduchu a okolní teplotě (Thind, 2002; Danielsen et al., 2004). Tím se potvrdila



možnost ochrany zásob omezující výskyt roztočů pomocí udržování nízké teploty a vlhkosti (Cunnington, 1965; Fields, 1992). Otázkou zůstávalo, zda teplota a vlhkost ovlivňující dynamiku růstu populace roztočů, má stejný vliv i na produkci exkrementů, tedy alergenů těchto populací. První odpověď přinesla práce Danielsen et al. (2004), která potvrzuje přímou korelaci mezi dynamikou růstu populace a produkcí exkrementů u druhu skladištního roztoče *Lepidoglyphus destructor*. Jiné druhy v tomto ohledu zatím nebyly testovány. Druhá část práce je proto zaměřena na sledování dynamiky produkce exkrementů u rostoucích a vymírajících populací v závislosti na fyzikálních podmínkách u dalšího skladištního roztoče druhu *T. putrescentiae*. K získání dat byla použita polyklonální protilátka vyvinutá v rámci této práce proti druhu *T. putrescentiae*.

Vzhledem k tomu, že velká část známých alergenů roztočů je obsažena v jejich exkrementech (Tovey, 1991; Hage-Hamsten-van, 1998), předpokládáme, že dynamika produkce exkrementů přímo koreluje s dynamikou produkce alergenů do prostředí. K ověření účinnosti testu s připravenou polyklonální protilátkou proti *T. putrescentiae* byla použita komerční polyklonální protilátka připravená přímo proti konkrétnímu alergenu druhu *T. putrescentiae* Tyr p 2 ([www.inbio.com](http://www.inbio.com))

## **1.1 Vstupní hypotézy**

**Cíl I.: Připravit a optimalizovat polyklonální protilátky pro detekci skladištních roztočů *A. siro* a *T. putrescentiae*.**

Příprava a charakterizace polyklonálních protilátek anti-*AcaSir* a anti-*TyrPut*:

- ověření citlivosti a specifčnosti polyklonální protilátky (Pabs)
- optimalizace PTA-ELISA testu pro detekci modelových druhů roztočů
- kalibrace testu pro kvantifikaci jedinců a exkrementů.

Charakterizace komerční alergen-detekující polyklonální protilátky anti-Tyr p 2:

- optimalizace PTA-ELISA testu pro detekci Tyr p 2 v exkrementech

**Cíl II.: Sledování dynamiky produkce alergenů (exkrementů) roztoče u vymírajících a rostoucích populací *T. putrescentiae***

Aplikace připravené (anti-TyrPut) a komerční protilátky (Tyr p 2) v detekci a kvantifikaci kontaminace potravinářských komodit způsobené *T. putrescentiae*:

- sledování dynamiky produkce exkrementů jako hlavního zdroje alergenů do prostředí
- zjištění závislosti produkce exkrementů na populační hustotě roztočů

## 2 Literární přehled

### 2.1 *Synantropní roztoči*

Roztoči (Acari) jsou nejpočetnějším a nejrozmanitějším řádem rozmanité třídy pavoukovců (Arachnida), (Walter et al., 1996). Jedná se o kosmopolitní řád, který je schopen obývat všechna prostředí, počínaje vodou, přes půdu, rostliny, hnízda ptáků, nory savců až po lidská obydlí (O Connor, 1997). Podle fosilií známých ze spodního devonu, tedy přibližně z doby před 400 miliony let, je můžeme zahrnout mezi nejstarší suchozemské živočichy (Kethley et al., 1989). Z toho vyplývá, že lidské příbytky nejsou pro roztoče primárním habitatem, ale osídlili je až v průběhu evoluce. Přesněji v průběhu koevoluce s lidským druhem, v rámci neolitické revoluce, přechodu člověka od společnosti lovců a sběračů ke společnosti usdlé. Jedná se o kontinuální proces, kdy lidé začali soustřeďovat svůj výskyt na jedno místo, začali účelově pěstovat obilí a domestikovat zvířata. Skladováním potravin a vytvářením stálých obytných prostor pro sebe i dobytek tak bezděčně vznikalo optimální prostředí pro různé škůdce, mimo jiné i roztoče. Druhy roztočů, které se adaptovaly na život v blízkosti člověka, jsou v současnosti označovány termínem synantropní roztoči (Erban, 2007).

Synantropní roztoči patří do podřádu Astigmata (Walter et al., 1996). (syn. Acaridida). Rozmanitost habitatu podřádu Astigmata koresponduje s kosmopolitním rozšířením celého řádu. Patří sem nejen druhy, které pronikly do příbytků člověka, ale i velké množství druhů roztočů od parazitických po volně žijící. (Solarz, 2003; Solarz et al., 2003).

#### 2.1.1 Skladištní versus prachoví roztoči

Synantropní roztoči se rozdělují na roztoče prachové tj. zástupce čeledi Pyroglyphidae, žijící především v prachu domácností a roztoče skladištní (čeledě Acaridae, Glycyphagidae, Carpoglyphidae), kteří se usídlili ve skladovaných potravinách (Bronswijk a Sinha, 1971; Hughes, 1976; Solarz et al., 1997). Zmíněné rozdělení není zcela přesné, neboť i ve vzorcích prachu z domácností se vyskytují druhy patřící k tzv. skladištním roztočům. Zástupci obou skupin se žijí

mikroskopickými houbami a bakteriemi, stejně jako odumřelými rostlinnými buňkami. Prachoví roztoči ještě navíc využívají jako potravu odumřelé buňky pokožky a vlasů (Hughes, 1976).

Prachoví roztoči jsou běžní v domácnostech celého světa. V prachu z domácností bylo nalezeno přes 20 druhů roztočů (Solarz, 2000; Solarz, 2001). Nejběžnějšími druhy roztočů pozorovanými v lidských příbytcích v mírném klimatickém pásmu jsou *Dermatophagoides farinae* a *D. pteronyssinus*. V tomto prostředí je pro ně charakteristická výrazná sezónní fluktuace s vysokou densitou během vlhkých letních měsíců a nízkou densitou během zimních měsíců, kdy pokojová relativní vlhkost je typicky nižší než 50% vzhledem k používání nepřirozených horkovzdušných topidel (Arlian, 2002). Rozšíření druhů se nejvíce liší mezi domácnostmi uvnitř geografické oblasti (v závislosti především na teplotních a vlhkostních podmínkách daného bytu) a mezi geografickými oblastmi (v závislosti na celkovém charakteru oblasti), (Arlian, 2002). Společenstva roztočů nacházející se v prachu domácností jsou většinou tvořena jedním druhem, ale i vícedruhovými komplexy. Většinou se vyskytují oba druhy rodu *Dermatophagoides* (Bronswijk a Sinha, 1971) v kombinaci s roztoči „skladištními“ např. druhy *A. siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *T. putrescentiae*. Mimo tyto druhy se především v mediteránu vyskytují druhy *Euroglyphus maynei* a *Blomia tropicalis*, kteří za příznivých podmínek mohou dosáhnout stejné početnosti jako druhy rodu *Dermatophagoides* (Arlian, 2002; Fernandez-Caldas et al., 2004).

Skladištní roztoči jsou kosmopolitní. Je uváděno cca 54 druhů roztočů kontaminujících obilné sklady, mouku a pekárny, 15 druhů vyskytujících se v sýrech, lněných semenech a ořeších, 4 druhy napadající sušené maso a ryby a 3 druhy vyskytující se v sušeném ovoci (Hughes, 1976). V našich podmínkách se z druhů řazených mezi skladištní roztoče nejčastěji vyskytují druhy *Lepidoglyphus destructor*, *A. siro*, *T. putrescentiae* (Stejskal et al., 2003). V letech 1996-1998 byl ve skladech České republiky prováděn faunistický průzkum zaměřený na kontaminaci obilných skladů členovci. Jeho výsledky se ukázaly velmi znepokojující. Napadeno bylo téměř tři čtvrtiny pozorovaných skladů. Z toho jen malou část měli na svědomí brouci či pisivky, do nedávna považovaní za větší hrozbu pro sklady než roztoči. Většina z napadených vzorků, přesně 91%, byla kontaminována roztoči různých druhů, přičemž mezi druhy s největší abundancí patřily právě druhy *A. siro* a *T.*

*putrescentiae*. (modelové druhy pro tuto práci), (Werner et al., 1998; Stejskal et al., 2003).

### **2.1.2 Význam synantropních roztočů pro člověka**

Synantropní roztoči jsou jen malou skupinou z druhově početného řádu Acari, přesto ekonomicky a medicínálně pro člověka neblaze velmi významnou. Ekonomickou hrozbu představují hlavně roztoči skladištní. Napadením skladovaných komodit značně snižují stupeň jejich kvality. Znehodnocují potraviny přítomností živých i mrtvých těl, exuviemi a odpadními produkty metabolismu. Odpadní látky jejich metabolismu uvolněné do prostředí způsobují nepříjemný zápach a změnu zbarvení napadených potravin (Wilkin a Stables, 1985). Velmi důležitým aspektem a pádným důvodem, proč se roztoči zabývat je skutečnost, že kromě samotného fyzického znečištění, představují všechny kontaminanty z nich pocházející silné alergen. Dalším nepříjemným a hlavně zdraví nebezpečným aspektem, který doprovází kontaminaci roztoči, je zavlečení patogenních mikroorganismů (White et al., 1979) a spor mykotoxin-produkujících hub do napadených potravin (Hubert et al., 2003). Ekonomický dopad kontaminace potravin skladištními roztoči není jen v rámci přímého potravinářského řetězce, ale zasahuje i do hospodářského koloběhu. Jelikož takto napadené potraviny jsou nepoužitelné nejen ke konzumaci lidmi, ale nejsou vhodné ani jako potrava pro hospodářská zvířata. Navíc v případě infestace semen určených k setbě způsobují ožerem i nižší produktivnost.

Medicínální význam roztočů se týká především produkce alergenů do skladovaných potravin určených ke konzumaci. Alergenem je označován takový typ cizorodé látky (antigen), která vyvolá reakci imunitního systému, aniž by samotná látka byla pro organismus nebezpečná. Typy odpovědi imunitního systému jedince citlivého k danému alergenu, jsou stejné jako v případě napadení organismu škodlivou cizorodou látkou. Nejčastější alergická reakce je imunitní odpověď typu Th2 založená na IgE protilátkách a odpovídá reakci imunitního systému na napadení mnohobuněčným parazitem (Hořejší a Bartůňková, 2002). Projevy alergické reakce se odvíjejí od charakteru alergenu a místa kontaktu respektive vniku. Zatím není s jistotou známo, jakým mechanismem dochází k senzibilaci imunitního systému pro organismus neškodným antigenem. Alergenem se může stát v podstatě jakákoliv molekula, ale ukazuje se, že některé mají k alergenicitě vyšší potenciál než jiné. Ve

většině případů se jedná o proteiny nebo proteinové komplexy (složené především z glykoproteinů). Zdá se, že za vyvolání alergické reakce mohou často právě polysacharidové komponenty glykoproteinů (Arlian, 2002). U několika skupin organismů bylo zjištěno, že jejich proteázy mimo "pasivní reakce" vyvolávají alergické reakce prostřednictvím své proteolytické aktivity (Stewart a Robinson, 2003). U mnoha příkladů bylo demonstrováno, že alergické reakci lze zabránit, jestliže jsou enzymy blokovány inhibitory a nejsou tedy proteolyticky aktivní (Pernas et al., 2000). Takové alergeny se vyskytují právě i u roztočů (Thomas et al., 1991), v podobě jejich trávicích enzymů. Jak už bylo výše naznačeno, roztoči se v průběhu evoluce adaptovali na využívání širokého spektra potravních zdrojů. Aby uvedené potravní zdroje mohli efektivně využívat, mají k nim přizpůsobeno trávicí ústrojí a jsou vybaveni celou škálou trávicích enzymů, jejichž relativní množství se mění v závislosti na potravních zdrojích (Bowman a Childs, 1982; Siepel a de Ruyter Dijkman, 1993). Z lékařského hlediska, trávicí enzymy roztočů reprezentují jedny z hlavních tříd alergenů (Stewart a Thompson, 1996). U senzitivního jedince mohou vyvolat všechny typy projevů alergie. Od méně závažných jako je alergická rýma, lehké astma, atopická dermatitida a kontaktní alergická dermatitida po životu nebezpečné stavy těžkého astmatu a anafylaktického šoku. (Arlian, 2002). Skladištní roztoči se mohou ve skladovaných potravinách namnožit z počáteční density desítek až stovek jedinců na desetitisíce jedinců na gram potravin. Po požití takto napadených potravin došlo v několika případech k anafylaktickému šoku alergických pacientů (Willey et al., 1998; Chambers, 2002; Matsumoto a Satoh, 2004; Sanchez-Borges et al., 2005). První vědecky podložená práce o alergickém onemocnění způsobeném roztoči pochází z roku 1971 (Bronswijk a Sinha, 1971). Od té doby se roztočům jako producentům alergenů začala věnovat větší pozornost. Zjistilo se, že nejvíce ohroženou skupinou, jsou především lidé pracující s uskladněnými potravinami (Hage-Hamsten et al., 1985). Dokonce v roce 2003 byl doložen případ úmrtí farmáře na následky permanentního vystavení alergenům prachových roztočů (Edston a Hage-Hamsten, 2003).

V současnosti je známo celkem 640 alergenů ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)) ze všech známých skupin živých organismů způsobujících alergie. Z toho přibližně 27% (175 známých alergenů) zabírají alergeny členovců, z nichž téměř 1/2 tvoří alergeny roztočů. Z celkového množství dosud známých alergenů jich je roztoči produkováno 11% .

Z metodického hlediska jsou alergeny izolovány z extraktu celých těl roztočů (whole mite extracts - WME) anebo z frakce obsahující exkrementy. Čisté exkrementy je obtížné izolovat vzhledem k jejich malým rozměrům a hmotnosti. Proto se jako zdroj exkrementů používá chovné médium, na kterém byli roztoči kultivováni a které je zbaveno roztočů (spent growth medium extracts - SGME), (Erban a Hubert, 2008). Exkrementy roztočů jsou velmi stabilní a alergeny v nich se vyskytující jsou nejvýznamnějším zdrojem roztočích alergenů v prachu domácností (Hage-Hamsten a Johansson, 1998; Tovey, 1991). Přítomnost alergenů v exkrementech předpokládá i jejich přítomnost v trávicích procesech (Stewart, 1998). Je tedy zřejmé, že hlavními alergeny prachových roztočů jsou trávicí enzymy, které nejsou vázané na membrány trávicích buněk, ale jsou produkovány střevními buňkami a uvolňovány do lumen střeva (Thomas et al., 1991; Tovey a Baldo, 1990). Ačkoli určité procento těchto enzymů je remobilizováno, zbytek, společně s nestrávenou potravou, prochází střevem v potravním balíčku až do fáze exkrementů.

Výskyt alergenů v prostředí je dán tedy nejen výskytem roztočů, ale i kumulací jejich exkrementů (Danielsen et al., 2004). Proteázové alergeny jsou v exkrementech velmi stabilní. Např. cysteinová proteáza z roztoče *D. farinae* (Der f 1) vykazovala v podmínkách domácností poločas rozpadu okolo 10 let (Sidenius et al., 2002). Tyto výsledky však byly zjištěny pomocí ELISA testů. Dosud není známo, jak se mění proteolytická aktivita v průběhu degradace exkrementů. Rozklad alergenů v prostředí je ovlivněn především teplotou a vlhkostí (Danielsen et al., 2004), které jsou limitujícími faktory pro společenstva koprofágních mikroorganismů žijících v exkrementech.

Pomocí protilátek připravených proti exkrementům nebo alergenům z roztočů se dá určit množství vyprodukovaných exkrementů nebo alergenů roztoči do prostředí. (Chapman, 1987; Luczynska et al., 1989; Danielsen et al., 2004)

## **2.2 Přehled metod sledování skladištních roztočů**

Z uvedených informací vyplývá, že potraviny napadené roztoči se už ani po likvidaci živých zvířat nedají dále použít. Klíčem k úspěšnému boji proti infestaci potravin roztoči je včasná detekce a identifikace zdroje potenciální kontaminace a tím pádem

možnost aplikovat ochranné strategie dříve než dojde k přemnožení populace roztočů (Dunn et al., 2008).

K detekci roztočů v skladovaných komoditách se do nedávna používaly hlavně klasické metody, založené na přímé extrakci roztočů ze vzorků prachu a skladovaných potravin. Podle principu extrakce se klasické metody rozdělují na mechanické, tepelné a fyzikálně chemické. Zástupcem mechanických metod je běžný prosev. Na principu tepelné extrakce je založen Tullgren-Berlese extraktor, využívající negativní reakce roztočů na teplo a světlo (Solomon, 1945). Fyzikálně chemické metody jsou založeny na rozdílné hustotě těl roztočů a jejich vajíček oproti materiálu, v němž se vyskytují, jedná se o tzv. filth-flotaci (Thind, 2000). Obecnou nevýhodou přímých metod je jejich časová i prostorová náročnost, potřeba kvalifikovaného personálu k určování materiálu získaného ze vzorků a především pomocí přímých metod se nedá zjistit historie infestace vzorku. Navíc současný trend vyžaduje především rychlost a snadnost určení infestace. Proto se začaly vyvíjet nové metody, využívající moderních znalostí biochemických, imunologických a molekulárních oborů, tzv. nepřímé metody. V minulosti nejčastěji používaná nepřímá metoda detekce výskytu roztočů byl ACAREX® test, který detekuje guanin z exkrementů roztočů ve vzorcích prachu. Nevýhodou tohoto testu je obtížná interpretovatelnost (Kort et al., 1997), neboť guanin se vyskytuje v exkrementech i ostatních členovců a jeho množství koreluje s množstvím dusíku v potravě.

Požadavkům současné doby nejlépe odpovídají imunochemické nepřímé detekční metody, založené na specifické vazbě protilátky na biologicky aktivní makromolekulární látky (Křížková-Kudlíková et al., 2007a). Protilátky připravené proti specifickým proteinům z těl konkrétních druhů roztočů zajišťují rozbor vzorku až na druhovou úroveň a velmi přesně určí i stupeň kontaminace. Navíc jejich použití je snadné a rychlé a pro zjištění výsledku není potřeba kvalifikovaného personálu. Proto jsou ideální pro využití v komerčních kitech pro detekci roztočů. Existují dva typy protilátek: polyklonální a monoklonální. Pro přípravu detekčních kitů se používají oba dva typy. Výhodou polyklonálních protilátek je snadnější a levnější příprava a také široké spektrum vazeb pro epitopy proteinů z daného druhu roztoče. Možnost vazby na širší škálu proteinů sebou ale nese nebezpečí větší náchylnosti ke křížovým reakcím. Monoklonální protilátky jsou oproti polyklonálním velmi přesné a křížové reakce se u nich objevují zřídka. Jejich nevýhodou je hlavně



mnohem náročnější příprava a tedy i tomu odpovídající vysoká výrobní cena (Křížková-Kudlíková et al., 2007b).

### **2.3 Modelové druhy roztočů**

Jako modelové druhy byli k této práci vybráni v potravinách nejběžněji se nacházející druhy roztočů (Solomon, 1962). Jedná se o druh *Acarus siro* (Linné, 1758), (Obr. 1) a *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781), (Obr. 2). Oba uvedené druhy mají kosmopolitní výskyt (Bartoš a Verner, 1979) a v rámci skladištních roztočů patří mezi největší producenty alergenů. V obilných skladech České republiky se vyskytují s největší hojností a frekvencí (Stejskal et al., 2003).

*A. siro* je kosmopolitní roztoč, dobře se mu daří téměř na všech typech skladovaných potravin, jako jsou různé typy mouky, suchá krmiva (píce), semena a obilí (Solomon, 1962). V podstatě za příznivých podmínek může napadat jakoukoliv potravinu. Byl prokázán výskyt ve všech typech moučných výrobků, ovesných vločkách, koření, léčivých drogách, sušeném ovoci, olejninách, krmivech a krmných směsích, atd. Dokonce ani výskyt ve skladech sýrů není výjimkou (Rosický et al., 1979). Jeho výskyt v potravinách je nežádoucí nejen z medicínálních a hygienických důvodů, ale např. pro obilí je znehodnocující také způsob ožeru. Napadá obilí od klíčku, čímž obilí ztrácí jak svou nutriční hodnotu, tak schopnost klíčit (Hughes, 1961). Z alergenů produkovaných tímto druhem byl zatím popsán pouze alergen Aca s 13, patřící do skupiny proteinů vázající mastné kyseliny. Aca s 13 o molekulové hmotnosti 15 kDa vykazuje 64% sekvenční homologii s Blo t 13 z roztoče *Blomia tropicalis* a je homologní i s ostatními alergeny této skupiny z různých organismů. (Eriksson, 1998). Charakterizace dalších alergenů z tohoto druhu roztoče je jen otázkou času (Thomas et al., 2002; Ferreira et al., 2004)

Obrázek 1: Jedinec druhu *A. siro*. Zástupce čeledi Acaridae patřící mezi ekonomicky nejvýznamnější skladištní škůdce v rámci roztočů (Stejskal et al., 2003).

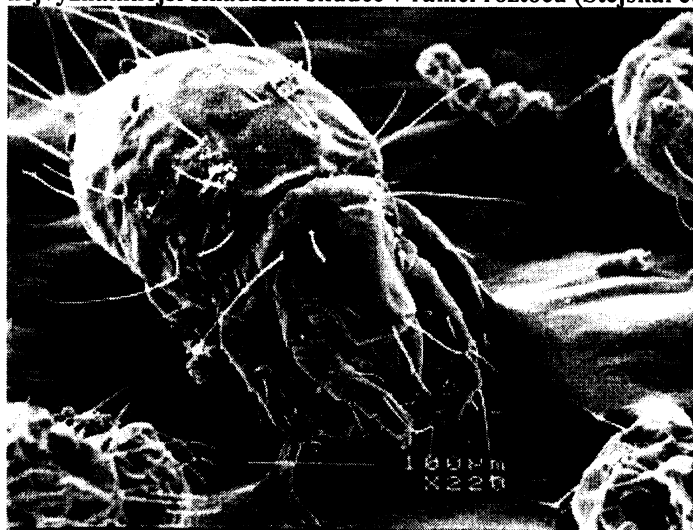


Foto: Klaudyová

*T. putrescentiae* je dalším běžným roztočem s rozmanitým areálem výskytu. Vyskytuje se hojně nejen v obilných a potravinových skladech, ale na rozdíl od druhu *A. siro* je znám také jako častá součást půdní fauny (Smrž a Čatská, 1987), součást spektra druhů roztočů, vyskytujících se v příbytcích ptáků a savců a součást fauny domácího prachu. Specificky lze nalézt v cibulkách rostlin, ve slámě, v domácnostech např. v tapetách, v nábytku, na sušeném ovoci, cereálních potravinách (Stuart, 2003) a je také znám jako škůdce sbírek mikroskopických hub. V obilných a potravinových skladech si vybírá především potraviny s vysokým obsahem tuku a bílkovin, jako jsou různé druhy sýrů, rozličná semena, obilky, atd. (Rosický et al., 1979). V půdě je typickým mykofágem (Smrž a Jungová, 1989). Jeho optimální životní podmínky jsou téměř shodné s optimem druhu *A. siro*, stejně tak jako průběh a doba trvání životního cyklu. Při 23 °C a vlhkosti vzduchu 87 % RH trvá jeho vývoj dva až tři týdny. Na rozdíl od předchozího druhu se přestává rozmnožovat již při teplotě pod 10 °C (Bartoš a Verner, 1979). V současnosti jsou z tohoto roztoče izolovány a popsány 3 alergeny. Tyr p 2 alergen ze skupiny lysozym-like proteinů (Eriksson, 1998), Tyr p 10 označovaný také jako tropomyozin (Jeong et al., 2007) a Tyr p 13 alergen skupiny proteinů vázající mastné kyseliny. Sekvence aminokyselin Tyr p 13 jsou se sekvencemi ostatních alergenů skupiny 13 identické v 61 až 85%. (Jeong et al., 2005).

Obrázek 2: Jedinec druhu *T. putrescentiae*. I tento druh je zástupcem čeledi Acaridae. Patří mezi roztoče nacházející se jak ve volně v půdě, tak ve skladovaných potravinách i v prachu domácností.

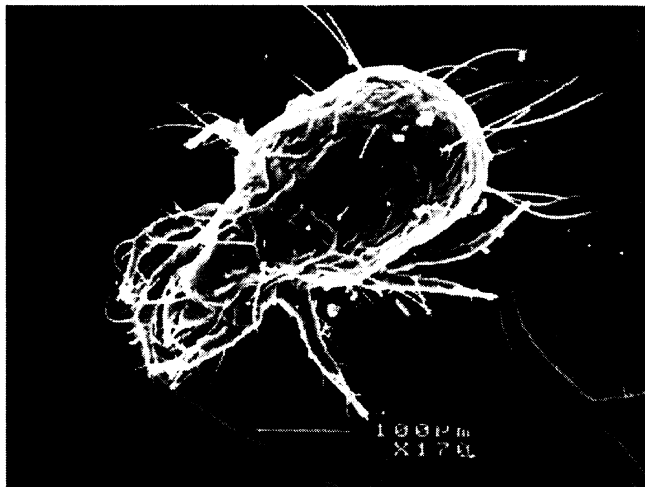


Foto: Klaudyová

## **3 Materiál a metodika**

### **3.1 Modelové druhy roztočů**

Druhy skladištních roztočů použité v této práci pocházely z laboratorních kmenů chovaných v laboratořích Ochrany zásob VÚRV, v.v.i. v Praze. Pro experimenty byli použiti roztoči následujících druhů: *A. siro* (Linné, 1758) a *T. putrescentiae* (Schrank, 1781). Oba druhy byly odchyceny ve skladu obilí v Buštěhradu v dubnu 1996 a přeneseny do laboratorních chovů.

Z obou druhů byl izolován antigen, který byl použit pro přípravu a charakterizaci polyklonálních protilátek anti-AcaSir a anti-TyrPut. Druh *T. putrescentiae* byl využit jako modelový druh pro sledování dynamiky produkce exkrementů v různých teplotních režimech.

### **3.2 Chovy roztočů**

Roztoči byli ve VÚRV, v.v.i. chováni v chovných komůrkách podle metodiky popsané Solomonem a Cunningtonem (1964). Jako chovné komůrky sloužily kultivační lahvičky pro tkáňové kultury s filtrem a s prodyšným víčkem, kde se populace roztočů udržuje na specifické chovné dietě. Zvolené modelové druhy byly chovány na stejném typu diety ve složení: 44 g ovesných vloček, 44g pšeničných klíčků, 10g lyofilizovaného droždí a 2 g sušených koryšů rodu *Daphnia*. Uvedené ingredience se rozmixovaly mlýnkem na prášek a následně přesely na digitálním prosévači. Do každé komůrky se nasypalo  $1.5 \pm 0.25$  g diety. Komůrky s roztoči a dietou byly umístěny ve tmě v chovných boxech s konstantní teplotou 25°C, udržovanou pomocí termostatů a stabilní vlhkostí vzduchu RH 85%, zajištěnou nasyceným roztokem KCl. Ke kontrole stability fyzikálních podmínek byly chovné boxy vybaveny teploměry a vlhkoměry. Pro experimenty byli dospělci ze stěn komůrek sebráni jemným malířským štětečkem a počítáni pod stereo mikroskopem.

### **3.3 Příprava Pabs proti roztočům druhu *A. siro* a *T. putrescentiae***

#### **3.3.1 Příprava imunogenu roztočů *A. siro* a *T. putrescentiae***

Prvním bodem při výrobě kvalitních specifických Pabs je příprava čistého antigenu z objektu, proti němuž má být protilátka připravena a který bude injikován do savce určeného k imunizaci. Takový typ antigenu se nazývá imunogen. Aby výsledná Pabs vykazovala vysokou specifickou vůči danému druhu roztoče, bylo důležité připravit z těl jednotlivých druhů co nejčistší extrakt, který nebyl kontaminovaný cizorodým materiálem. Roztoči se museli nechat před samotnou přípravou imunogenu vyhladovět a jejich těla povrchově sterilizovat.

Vyprázdnění trávicího traktu roztočů se dosáhlo umístěním předběžně očištěných zvířat prosetím přes síto (velikost síťových ok 0,08 mm) do prázdných chovných komůrek na dobu 24 hodin. Povrchová sterilizace byla zajištěna propláchnutím roztočů v čistící aparatuře sestavené z těsně k sobě přiložených polyethylenových pipetových špiček na konci s připevněnou komůrkou, která měla na místě přichycení ke špičce a místo dna nylonovou síťku (velikost síťových ok 0,07 mm). Vzorek roztočů byl promýván jednou až dvakrát ve 100 ml sterilizované destilované vody s přídavkem 0,1 ml Tweenu 20 (detergent), poté desinfikován v 8% chlornanu sodném a následně v 96 % etanolu a nakonec propláchnut ve sterilizované destilované vodě (Hubert et al., 2003). Najednou bylo v čistícím zařízení promýváno přibližně 0,5g hladových roztočů. Pro přípravu imunogenu bylo napěstováno a promyto cca 10g roztočů.

Roztoči byli homogenizováni v chlazeném homogenizátoru v 250 ml extrakčního pufru (0,03M TRIS; 0,005M  $MgCl_2 \times 6H_2O$ ; 0,001M  $Na_2EDTA$ ; 0,001M DTT; 0,001M kys. askorbová; glycerol 20%, pH = 8,8) s přídavkem 10g polyvinylpyrrolidinu (PVP). Extrakce probíhala 24 hodin ve tmě při teplotě 4°C. Druhý den byl homogenát centrifugován (12 000 rpm, 5 min, 4°C). Proteiny ze supernatantu byly izolovány postupnou precipitací chlazeným nasyceným roztokem síranu amonného (pH=7,2) v poměru 1:1, v ledové lázni. Vzniklá směs byla ponechána k odstátí 24 hodin ve tmě při 5°C. Další den byl precipitát oddělen centrifugací (4020xg, 15 min, 1°C), pelet resuspendován ve fosfátovém pufru PBS (pH 7,2) a dialyzován proti 200 krát většímu objemu 50% PBS po dobu 36 hodin

(roztok 3x měněn po 12 hodinách). Proteinový roztok z roztočích těl byl zahuštěn v dialyzačním střívků na 20% polyethylenglykolu. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí DC Protein Assay Kit podle dodaných technických instrukcí k uvedenému výrobku.

### 3.3.2 Imunizace

Druhým krokem při výrobě Pabs je imunizace savce. Tedy proces, při kterém se po opakovaném podání imunogenu vytvoří v krvi imunizovaného zvířete protilátky proti epitopům použitého imunogenu. Tuto práci jsem neprováděla osobně, ale vykonávaly ji zaměstnankyně imunodiagnostické laboratoře VURV, v.v.i., které jsou proškoleny dle zákona Na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb. a zákona č. 77/2004 a mají oprávnění zacházet s pokusnými zvířaty.

K přípravě Pabs proti druhům *A. siro* a *T. putrescentiae* byli zvoleni k imunizaci laboratorní králíci rasy Činčila velká, vždy 2 králíci pro jeden imunogen. Podávání imunogenu probíhalo v 3 týdenních intervalech podkožními injekcemi ve 4 až 5 imunizačních dávkách se zvyšující se koncentrací proteinů imunogenu: ve startovací dávce bylo 100 µg proteinů imunogenu, v 2. dávce 200 µg proteinů, ve 3. dávce 400 µg proteinů a ve 4. dávce 500 µg proteinů. Všechny imunizační dávky obsahovaly AL-SPAN-OIL adjuvans, celkový objem podávaného imunogenu byl 1 ml. Dvanáctý den po podání 4. dávky bylo z marginální ušní žíly králíků odebráno 1-2 ml krve, k provedení předběžného testu, zda již sérum imunizovaných králíků obsahuje dostatečné množství specifických protilátek proti podávanému imunogenu. Test byl prováděn z krevního séra metodou tzv. titrace pomocí techniky PTA-ELISA. Posledním krokem imunizace bylo, opět po 3 týdnech, podání podporovací dávky, tzv. „booster“. Booster byl podáván bez adjuvans a měl nejvyšší obsah proteinů imunogenu (500 - 750µg). Osmý den po podání booster byl imunizovaným králíkům proveden finální odběr krve z marginální ušní žíly. Z každého zvířete bylo odebráno maximálně 50 ml krve. Krev byla odebírána do zkumavek se separačním gelem a aktivátorem srážení (silikagel). Krev ve zkumavkách byla ponechána k vysrážení 1 hod. při 37°C a poté do rána při 4°C. Sérum bylo od sráženiny odděleno centrifugací (1780xg, 10 min, 4°C) a zamraženo při -40°C pro další použití.

### 3.3.3 Izolace IgG

Třetím krokem při výrobě specifických Pabs bylo izolovat ze získaného krevního séra pouze IgG protilátky. Séra z krve imunizovaných zvířat byla ředěna v poměru 3:10 do 10 ml destilované vody. Nejdříve byly sráženy proteiny postupným přidáváním 10 ml chlazeného nasyceného síranu amonného s pH 7,2 za neustálého míchání v ledové lázni. K úplnému vysrážení proteinů bylo sérum ponecháno 24h ve tmě při 5°C. Precipitáty byly odděleny centrifugací (1780xg, 10 min, 4°C), poté rozpuštěny v 10 ml PBS a dialyzovány proti 50% PBS. Následovala izolace IgG afinitní chromatografií na proteinu A. Roztok byl nalit do aktivované kolony, kde se IgG navázalo na protein A v koloně. Kolona byla promyta promývacím pufrem (0,02M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15M NaCl, pH 8,0) o objemu rovnajícimu se 4násobku objemu kolony. Nakonec bylo IgG vymyto pufrem (0,1M kys. citrónové, 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3-4), který uvolnil IgG z vazby na proteinu A. Frakce s IgG byla zachycena do zkumavek obsahujících 100μl 1M Tris-HCl, pH 9,0. Roztok IgG byl dialyzován proti 50% PBS a stabilizačním roztokem (0,5% BSA v PBS, 1mM MgCl<sub>2</sub>) upraven na koncentraci 1mg/ml. Získané IgG bylo pro další použití zamraženo při - 40°C. Specifičnost a citlivost získaných protilátek byla testována technikou PTA-ELISA na mikrotitračních destičkách.

### 3.4 Komerční protilátka anti Tyr p 2

Komerční Pabs králičí anti Tyr p 2 připravená firmou Indoor Biotechnologies přímo proti známému alergenu Tyr p 2 z roztoče *T. putrescentiae* z krve králíka, byla použita k měření dynamiky produkce exkrementů roztoče *T. putrescentiae* v různých teplotních režimech, stejně jako Pabs anti-TyrPut získaná z krve králíka imunizovaného antigenem z roztoče *T. putrescentiae*.

### 3.5 Příprava antigenů a vzorků použitých k charakterizaci anti-AcaSir a anti-TyrPut

K určení specifičnosti připravených Pabs bylo potřeba připravit extrakty z různých druhů zvířat a materiálů, jejichž antigeny by se mohly nacházet ve skladovaných potravinách společně s druhy roztočů, proti kterým byly Pabs anti-AcaSir a anti-TyrPut připraveny. Druhy skladištních škůdců a materiály, ze kterých byly

připraveny antigeny určené k testování specifčnosti Pabs jsou uvedené v tabulce 1. Druhy skladištních škůdců zde uvedené pocházejí z laboratorních kultur uchovávaných ve VURV, v.v.i. . Kmeny saprofytických hub pocházely ze sbírek mikromycetů odd. Mykologie ve VURV, v.v.i..

**Tabulka 1: Materiály a druhy skladištních škůdců použité k výrobě antigenů k určení specifčnosti Pabs. Pokud není uvedeno jinak, jedná se o čištěný typ antigenu. Všechny druhy skladištních členovců pocházejí s chovů držení ve VURV, v.v.i.**

| Skupina        | Typ antigenu   | Poznámky                 |
|----------------|--|--------------------------|
| <b>roztoči</b> | <i>Acarus gracilis</i> (Hughes, 1957)                      | dospělci                 |
|                | <i>Acarus siro</i> (Linnaeus, 1758)                        | dospělci                 |
|                | <i>Aleuroglyphus ovatus</i> (Troupeau, 1878)               | dospělci<br>SGM, totální |
|                | <i>Caloglyphus redickoverzi</i> (Zachvatkin 1941)          | dospělci<br>SGM, totální |
|                | <i>Carpoglyphus lactis</i> (Linnaeus, 1758)                | dospělci                 |
|                | <i>Dermatophagoides farinae</i> (Hughes, 196)              | dospělci                 |
|                | <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Trouessart, 1897)   | dospělci                 |
|                | <i>Lepidoglyphus destructor</i> (Schrank, 1781)            | dospělci<br>totální      |
|                | <i>Tyroborus lini</i> (Oudemans, 1924)                     | dospělci<br>totální      |
|                | <i>Tyrophagus spp.</i> (Oudemans, 1924)                    | mix_dospělci             |
|                | <i>Tyrophagus putrescentiae</i> (Schrank, 1781)            | dospělci<br>SGM, totální |
|                | <i>Tyrophagus brevicrinatus</i> (Robertson, 1959)          | dospělci<br>totální      |
| <b>brouci</b>  | <i>Tribolium castaneum</i> (Herbst, 1797)                  | dospělci<br>larvy        |
|                | <i>Sitophilus granarius</i> (Linnaeus, 1758)               | dospělci                 |
| <b>motýli</b>  | <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller, 1879)                  | larvy                    |
| <b>houby</b>   | <i>Aspergillus niger var. niger</i> (Tiegh. 1867)          |                          |
|                | <i>Aspergillus versicolor</i> (Tirab. 1908)                |                          |
|                | <i>Botrytis cinerea</i> (Pers, 1794)                       |                          |
|                | <i>Cladosporium cladosporioides</i> (G. A. de Vries, 1952) |                          |
| <b>ostatní</b> | chovná dieta   | totální                  |
|                | pšeničné obilky  | totální                  |

V těchto testech byly použity 2 typy antigenů. Čištěné a totální. Způsob přípravy čištěného antigenu odpovídal přípravě imunogenu a je popsán výše (viz. 3.3.1). Totální antigen byl připraven pouhým vyextrahováním vzorku v PBS. Tento



postup byl zvolen v případě SGM, některých dospělců z uvedených druhů, chovné diety a pšeničných obilek. Příprava a množství materiálu v případě SGM a některých dospělců skladištních druhů odpovídala přípravě a množství materiálu u čištěného antigenu. Na přípravu antigenu z chovné diety a pšeničných obilek bylo homogenizováno 10g chovné diety v 15 ml PBS a 10g pšeničných obilek v 20 ml PBS po dobu 2 minut při 17 500 rpm. Homogenizáty byly extrahovány 24 hodin ve tmě při teplotě 4°C. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a bez dalších úprav byl pro následné použití zamražen.

K další charakterizaci Pabs byly použity extrakty proteinů z roztočů *A. siro a T. putrescentiae* v PBS připravené za rozdílných okolností. Jednalo se o přípravu extraktů z celých těl roztočů o určité hmotnosti, z celých těl roztočů o určitém počtu jedinců, z SGM o dané hmotnosti a z čistých exkrementů těchto druhů. Daný vzorek byl vždy extrahován v 1 ml PBS 24h při 5°C a temnu. Poté stočen na centrifuze (4020xg, 10 min, 4°C) a získaný supernatant rovnou použit k měření citlivosti Pabs. V případě celých těl roztočů bylo k extrakci zapotřebí jejich homogenizace. Vzhledem k minimálním navážkám, objemu a nepatrným rozměrům těl roztočů, se homogenizace musela provést alternativní cestou. Těla roztočů obsažená v jednom vzorku byla rozdracena mezi krycími mikroskopovacími sklíčky, rozdraceny obsah byl sklepnut do zkumavky typu ependorff a zbytek přichycený na sklíčkách opláchnut do téže zkumavky 1 ml PBS. Zvláštní způsob sběru bylo nutno uplatnit i v případě čistých exkrementů. K jejich získání bylo zapotřebí vybrat je ručně z SGM pod stereomikroskopem za pomoci tenké jehly a štětečku.

### **3.6 Příprava materiálu pro pokus sledování dynamiky produkce exkrementů roztočů**

K umělé infestaci roztoči byla vybrána potravinářská pšenice *Triticum aestivum* odrůda Nela. Před použitím byla pšenice čištěna, aby se odstranily mechanické nečistoty a povrchově sterilizována. Obilí bylo proseto na prosévači o velikosti síťových ok 2 mm po dobu deseti min, 30 min dezinfikováno 1% roztokem komerčního přípravku SORUN v destilované vodě s následným propláchnutím v čisté destilované vodě. Zpětně sušeno v sušičce při teplotě 85 °C po dobu 6 hodin na hodnotu obsahu vody v obilí (m.c.) nižší než 9%. M.c. bylo měřeno vlhkoměrem. Suché obilí se navlhčilo v dobře uzavřených polyetylenových sáčkách po dobu 24h,

část na 13,5 % m. c. a část na 15% m. c. podle výpočtu kdy na 1000 g obilí se ke zvýšení o 1 % m. c. přidá 11,8 ml destilované vody. Obilí bylo po 350 g rozsypáno do plastových misek umístěných v exsikátorech k vytemperování na danou teplotu. Po 24 h byl ve všech miskách změřen obsah vody v zrně a na základě zjištěných hodnot přidáno takové množství destilované vody, aby hodnoty m. c. odpovídaly tabulce 11 (viz.Příloha). Po dalších 24 h bylo v exsikátorech obilí z misek přesypáno na umělohmotnou tkaninu o velikosti ok 2mm, a tak za občasného promíchání (ob 2 dny) necháno 14 dní k přesnému dovlhčení podle relativní vlhkosti vzduchu a dané teploty v konkrétním exsikátoru. Po té, co obilí v exsikátorech dosáhlo neměnné vlhkosti, přesypalo se do čistých chovných komůrek.

### **3.7 Příprava exsikátorů a termostatů pro pokus sledování dynamiky produkce exkrementů *T.putrescentiae***

Exsikátory a termostaty, určené pro pokusu sledování dynamiky produkce exkrementů roztočů, byly zbaveny roztočů přípravkem Alergoff a omyty 1% roztokem SORUN v destilované vodě. Po vysušení byly do exsikátorů nality příslušné nasycené roztoky solí (NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, KCl) a umístěny do termoboxů.

### **3.8 PTA-ELISA**

Všechny výsledky v této práci byly zjišťovány pomocí techniky PTA-ELISA (plate trapped antigen - enzyme-linked-immunosorbent-assay). Test byl prováděn v mikrotitračních destičkách o 96 jamkách a výsledná absorbance vzorků měřena ELISA readerem při vlnové délce 405 nm. Každé měření zahrnovalo jak pozitivní (kalibrační křivka imunogenu), tak negativní kontrolu (extrakční pufr nebo kontrolní extrakt). Prvním krokem PTA-ELISA techniky je imobilizace antigenu na stěnu jamky mikrotitrační destičky. 100 µl bylo inkubováno 3 hodiny při 25°C a 280 rpm na třepačce. Po inkubaci následovalo promytí jamek 3x promývacím pufrem (PBS obsahující 0.1% Tween 20). Dalším krokem byla blokace neobsazených vazebných míst v jamkách, na které by se potencionálně mohly navázat později přidané molekuly IgG a tak způsobit falešnou pozitivitu vzorku. Do každé jamky bylo napipetováno 200 µl blokačního pufru (1% BSA v PBS s 0.1 % Tween 20). Po 30 min inkubaci (při 25°C a 280rpm) se jamky opět promyly (viz. předchozí). Dalším krokem bylo navázání primární králičí protilátky, která se vážala na antigeny

imobilizované v jamkách. Pab byla naředěna v blokačním pufru na potřebnou pracovní koncentraci (0,1 - 1 µg IgG/ml) a do každé jamky se jí nepipetovalo 100 µl. Inkubace probíhala 3 hodiny při 25 °C a 280 rpm. Poté byly jamky opět promyty. Dalším krokem bylo navázání značené protilátky na volné Fc konce králičích IgG protilátek. K tomuto účelu byla použita komerčně připravená protilátka kozí anti-rabbit IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou, ředěná v poměru 1:2000 resp. 1:5000 v PBS obsahující 0.1% Tween 20. Do jamek byla přidána po 100 µl a inkubována 3 hodin ve 25°C při 280 rpm. Po opětovném promytí byly jamky naplněny roztokem substrátu. Na jednu jamku se opět použilo 100 µl substrátu [p-nitrofenylfosfátu] ředěném v substrátovém pufru (1M diethanolamin, 0.5mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, pH 9.8 bylo upraveno 36% HCl) 1 mg substrátu na 1 ml pufru. Inkubace navázané konjugované protilátky se substrátem probíhala ve tmě při 25°C a 280 rpm. V průběhu inkubační doby fosfatáza konjugovaná s kozí protilátkou štěpila substrát na barevný produkt žlutý p-nitrofenol. Intenzita barvy jamky přímo úměrně závisela na množství fosfatázy resp. kozí protilátky v jamce. Pravidelně po 15 minutách byla u vzorků v jamkách měřena absorbance pomocí ELISA readeru. Měření bylo ukončeno, když absorbance imunogenu o koncentraci 1 µg/ml dosáhla hodnoty 1,8-2,2.

### **3.9 Způsoby charakterizace připravených Pabs**

#### **3.9.1 Titr séra**

Stanovením titru séra vůči imunogenu bylo zjištěno, zda se v krvi imunizovaného králíka vytvořilo již dostatek specifických protilátek proti imunogenu. Sérum ředěné ředící řadou 2<sup>n</sup> bylo testováno proti imunogenu o koncentraci 1 µg/ml. Jako titer séra bylo označeno takové ředění séra, při kterém byla hodnota absorbance ještě pozitivní. Pokud byl titer séra nízký, musela se imunizovanému savci podat další dávka imunogenu a test po 3 týdnech opakovat.

### **3.9.2 Citlivost Pabs**

Antigen, proti kterému byla Pabs připravena, byl naředěn v PBS na koncentrace v rozmezí hodnot od 10 - 0,01  $\mu\text{g/ml}$ . Byla zjišťována citlivost techniky PTA-ELISA s připravenými Pabs vůči imunogenu ze závislosti absorbance na koncentraci imunogenu byla stanovena kalibrační křivka. Technika byla také kalibrována vůči danému počtu jedinců, hmotnosti SGME nebo čistých exkrementů.

### **3.9.3 Specifičnost - Křížové reakce**

Další důležitou vlastností Pabs je její specifičnost, tedy jestli se váže jen na specifické proteiny zvířete, proti kterému byla připravena nebo si vytvořila vazebnou specifičnost i na proteiny, které se mohou vyskytovat zároveň i u jiných druhů živočichů, či mají proteiny s podobnými epitopy těmto proteinům. Připravené protilátky byly testovány proti ostatním skladištním roztočům a skladištním druhům hmyzu vyskytující se běžně v obilných a moučných skladech v ČR (Tab. 1). Dále byla možnost křížové vazby testována proti saprofytickým houbám, které se mohou v skladech s potravinami vyskytnout a extraktu diety na které byli roztoči chováni, extraktu z mouky a z pšeničných zrn (Tab. 1). Připravené antigeny (viz. 3.5) byly pro tyto testy naředěny na koncentraci 5 a 1  $\mu\text{g/ml}$  PBS.

### **3.9.4 Detekční limit**

Detekční limit odpovídá dolní hranici citlivosti Pabs pro konkrétní měření absorbancí vzorků vůči kterým je technika s Pabs testována. Byla zvolena metoda výpočtu detekčního limitu jako průměr hodnot naměřených absorbancí blanku (při kalibraci vůči imunogenu) nebo negativních kontrol (při detekci v infestovaném substrátu) přičtený k trojnásobku směrodatné odchylky těchto hodnot. Koncentrace antigenu ve vzorku, jehož naměřená hodnota absorbance odpovídá detekčnímu limitu vypočítanému pro toto měření, je nejnižší možnou koncentrací antigenu, který je test při dané koncentraci schopen s určitostí detekovat.

### **3.10 Aplikace protilátek v měření dynamiky produkce exkrementů roztočů *T. putrescentiae***

#### **3.10.1 Uspořádání experimentu**

Cílem experimentu bylo sledovat dynamiku produkce exkrementů roztočů v obilí v různých vlhkostních a teplotních režimech. Toho bylo dosaženo kultivací roztočů v obilí v následujících podmínkách. Do 7 termoboxů s teplotami 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C byly dány exsikátory se 3 typy nasycených roztoků solí. Nasycený roztok NaCl k udržení relativní vlhkosti vzduchu 75%, NH<sub>4</sub>Cl pro 80% RH a KCl pro 85% RH. Stabilita uvedených podmínek byla postupně kontrolována datalogry. V každé kombinaci teploty a vlhkosti, tzn. teplotním režimu, bylo navlhčeno obilí (viz. 3.6) a po 25 g rozváženo a přesypáno do kultivačních lahvíček. 350 g obilí z jednoho exsikátoru se rozvážilo 9 x 25 g obilí do kultivačních lahvíček na 8 vzorků připravené pro umělou infestaci roztoči a 1 kontrolu a 100g obilí, které je potřeba na měření m. c. se rozsypalo do 3 kultivačních lahvíček. Zbylých 25 g se zamrazilo při -20 °C jako počáteční kontrola.

Do 8 kultivačních lahvíček bylo přidáno po 10 dospělých roztočů daného druhu, 1 lahvíčka byla ponechána bez roztočů jako kontrola. V teplotách 5 a 10°C probíhala infestace roztoči 42 dní a v teplotách 15, 20, 25, 30 a 35°C 21 dní.

#### **3.10.2 Zpracování vzorků**

Po uplynutí určené doby pro daný režim byly vzorky zpracovány tepelnou extrakcí na Tullgren – Berlese extraktoru. Propad roztočů byl zachycován do skleněných kádinek s 25 ml PBS. Umístění na Tullgren-Berlese extraktor probíhalo následujícím způsobem. Pod trychtýře byly umístěny kalibrované kádinky s 5ml PBS, vzorek z kultivační lahvíčky se vysypal na síto (velikost síťových ok 2 mm) a vnitřek lahvíčky byl propláchnut 20 ml PBS, které z ní bylo přelito do příslušné kádinky pod trychtýřem. Po 24 h bylo obilí ze sít přesypáno a štětečkem vymeteno do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml, kde bylo 3 hodiny extrahováno ve 25 ml PBS. Po uplynulé době byl extrakt slit, 24h ponechán ve tmě při 5°C a nakonec stočen na centrifuze (12 000 rpm, 5 min, 40°C). Supernatant byl slit a použit k dalšímu testování. Roztoči propadlí do kádinek s PBS byli spočítáni pod stereomikroskopem. Dále byl do kádinek s propadem doplněn obsah vypařené vody

z PBS do původních 25 ml a obsah kádinky byl následně stočen na centrifuze (12 000 rpm, 5 min, 4°C), supernatant slit a použit k dalšímu testování.

### 3.10.3 Měření produkce exkrementů

Vzorky obilí infestované druhem roztoče *T. putrescentiae* byly otestovány na obsah exkrementů technikou PTA-ELISA s použitím polyklonální protilátky IgGK61 o pracovní koncentraci 0,1 µg/ml a komerční polyklonální protilátky Tyr p 2 o pracovní koncentraci 1 µg/ml, za použití konjugátu Anti Rabbit IgG-AP ředěného 5000 x a substrátu p-NPP o koncentraci 1 mg/ml. Výsledné absorbance vzorků byly přepočteny na obsah čistých exkrementů ve vzorku podle rovnice kalibrační křivky spočtené lineární regresi absorbancí kalibrační křivky Pabs anti-TyrPut a Tyr p 2 pro čisté exkrementy roztoče *T. putrescentiae* s použitím programu Excel 2007. Produkce exkrementů byla stanovena v mg na komůrku.

Pro roztoče byl očekáván exponenciální nárůst populace roztočů (Aspally et al. 2007), proto pro každou komůrku byla stanovena vnitřní rychlost růstu  $r$  dle vzorce ( $N_t = N_0 e^{rt}$ ), kde  $N_t$  je konečná populace roztoče zjištěná extrakcí,  $N_0$  je počáteční populace, vždy 10 jedinců a  $t$  délka experimentu (21 nebo 42 dní).

### 3.10.4 Analýza dat

Pro analýzu dat byly použity metody lineární regrese v programu XLSTAT 2007. Pro lineárně regresní modely byla závislou proměnou produkce exkrementů (mg na komůrku) stanovena buď pomocí protilátky anti TyrPut K61 nebo Tyr p2.

Vysvětlující proměnné byly vlhkost obilí v komůrce (m. c.), teplota a počet roztočů. Analýzy byly provedeny dohromady a v druhém kroku zvlášť pro komůrky kde (i)  $r > 0$  tj. rostoucí a metabolicky aktivní populace (ii)  $r \leq 0$  tj. pro „vymírající“ populace.

### **3.11 Seznam použité techniky, chemikálií a programů**

|   |                     |
|---|---------------------|
| Kultivační lahvičky pro tkáňové kultury (70 ml)     | IWAKI               |
| Mlýn pro malé množství ZN 200                       | Retsch              |
| Prosévačka AS240 digit                              | Retsch              |
| Exsikátorové boxy Secodar 4.0                       | Secodar™            |
| Stemi 2000-C Stereo Zoom Microscope                 | Carl Zeiss          |
| Osvětlení KL 1500 LCD                               | Carl Zeiss          |
| Mikroanalytická váha Mettler AE 240, ±0,01 mg       | METTLER TOLEDO      |
| Tween 20  | Lach-Ner, s.r.o.    |
| NaClO   | Tescona®            |
| C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH 96%                | Lach-Ner, s.r.o.    |
| Potter-Elvehjem skleněný homogenizér, 5ml           | Kavalier            |
| Tris  | Sigma-Aldrich Co.   |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | Sigma-Aldrich Co.   |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                | Sigma-Aldrich Co.   |
| DTT   | Sigma-Aldrich Co.   |
| Kyselina askorbová                                  | Sigma-Aldrich Co.   |
| Glycerol  | Sigma-Aldrich Co.   |
| PVP   | Sigma-Aldrich Co.   |
| Multifunkční vysokootáčková centrifuga JOUAN MR 23i | JOUAN               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | Sigma-Aldrich Co    |
| Polyethylenglykol                                   | Lach-Ner, s.r.o.    |
| DC Protein Assay Kit                                | BioRad®             |
| AL-SPAN-OIL adjuvant                                | Sigma-Aldrich Co    |
| Greiner Bio-One Vacuette Tubes                      | Greiner             |
| Protein A Sepharose™ 4 Fast Flow                    | Amersham Bioscience |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | Lach-Ner, s.r.o.    |
| NaCl  | Lach-Ner, s.r.o.    |
| Kyselina citrónová                                  | Lach-Ner, s.r.o.    |
| Tris-HCl  | Sigma-Aldrich Co.   |
| BSA   | Sigma-Aldrich Co.   |
| MgCl <sub>2</sub>                                   | Lach-Ner            |

|  |  |
|--|--|
| Mikrotitrační destičky Nunc Maxi-Sorp (96 jamek)<br>anti Tyr p 2 (PA-TP2-1)        | Neptune, N. J<br>Indoor<br>Biotechnologies |
| Ultra-Turrax T25 basic homogenizér   | IKA®                                       |
| Mikrozkumavka 1,5 ccm s uzávěrem - eppendorf<br>SORUN (složení: 5% chlornan sodný) | GAMA GROUP a.s.<br>Chopa s r.o. ČR         |
| Sušárna Memmert UE 400   | Memmert                                    |
| Vlhkoměr Agricomputer (VB)   | Agricomputer                               |
| Alergoff   | Alergoff                                   |
| NH <sub>4</sub> Cl   | Lach-Ner, s.r.o.                           |
| KCl  | Lach-Ner, s.r.o.                           |
| ELISA reader Emax  | Molecular Devices                          |
| THERMOstar Incubator Shaker  | Thermostar                                 |
| Koží anti-Rabbit IgG - Alkaline Phosphatase antibody                               | Sigma-Aldrich Co.                          |
| P-nitrofenylfosfát   | Sigma-Aldrich Co.                          |
| Diethanolamin  | Sigma-Aldrich Co.                          |
| HCl (36% )   | Sigma-Aldrich Co.                          |
| Data Loggers, TinyTalk   | Gemini                                     |
| Centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem (50 ml)                               | P-lab                                      |
| PipetmanConcept C8x300, 20 -300µl  | Gilson                                     |
| PipetmanConcept C1200, 100 -1200µl   | Gilson                                     |
| Pipeta Research vari® 3111 10 - 100 ul   | Eppendorf                                  |
| Eppendorf Reference, adjustable, 0,5-10  | Eppendorf                                  |
| Pipeta Research vari® 3111 20 - 200 ul   | Eppendorf                                  |
| Microsoft Office Excel 2007  | Microsoft                                  |
| XLSTAT 2007  | Addinsoft USA, New<br>York, NY, USA        |



## 4 Výsledky

### 4.1 Charakterizace Pabs

Imunizací laboratorních králíků antigenem (imunogenem) z roztoče *A. siro* a *T. putrescentiae* byly připraveny Pabs anti-AcaSir K53 a K54 a anti-TyrPut K60 a K61. Všechny čtyři Pabs byly izolovány z krevního séra odebraného z imunizovaných králíků po 4. imunizační dávce na základě pozitivního titru séra, kdy titr sér převyšoval ředění séra 1: 102400.

Tabulka 2: Koncentrace proteinů jednotlivých připravených antigenů.

| Zdroj antigenu                        | Koncentrace proteinů<br>μg/ml |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| <i>A. gracilis</i> _dospělci          | 1842                          |
| <i>A. siro</i> _dospělci              | 2390                          |
| <i>A. ovatus</i> _dospělci            | 394                           |
| <i>A. ovatus</i> _SGM, totální        | 4200                          |
| <i>C. redickoverzi</i> _dospělci      | 321                           |
| <i>C. redickoverzi</i> _SGM, totální  | 4100                          |
| <i>C. lactis</i> _dospělci            | 800                           |
| <i>D. farinae</i> _dospělci           | 2640                          |
| <i>D. pteronyssinus</i> _dospělci     | 1800                          |
| <i>L. destructor</i> _dospělci        | 7200                          |
| <i>L. destructor</i> _totální         | 1500                          |
| <i>T. lini</i> _dospělci              | 2170                          |
| <i>Tyrophagus</i> spp.                | 520                           |
| <i>T. putrescentiae</i> _dospělci     | 2327                          |
| <i>T. putrescentiae</i> _SGM, totální | 2248                          |
| <i>T. brevicrinatus</i> _dospělci     | 2170                          |
| <i>T. brevicrinatus</i> _totální      | 3750                          |
| <i>T. castaneum</i> _dospělci         | 1300                          |
| <i>T. castaneum</i> _larvy            | 5020                          |
| <i>S. granarius</i> _dospělci         | 2319                          |
| <i>E. kuehniella</i> _larvy           | 3060                          |
| <i>A. niger</i>                       | 4175                          |
| <i>A. vericolor</i>                   | 2075                          |
| <i>B. cinerea</i>                     | 854                           |
| <i>C. cladosporioides</i>             | 469                           |

### 4.1.1 Příprava antigenů

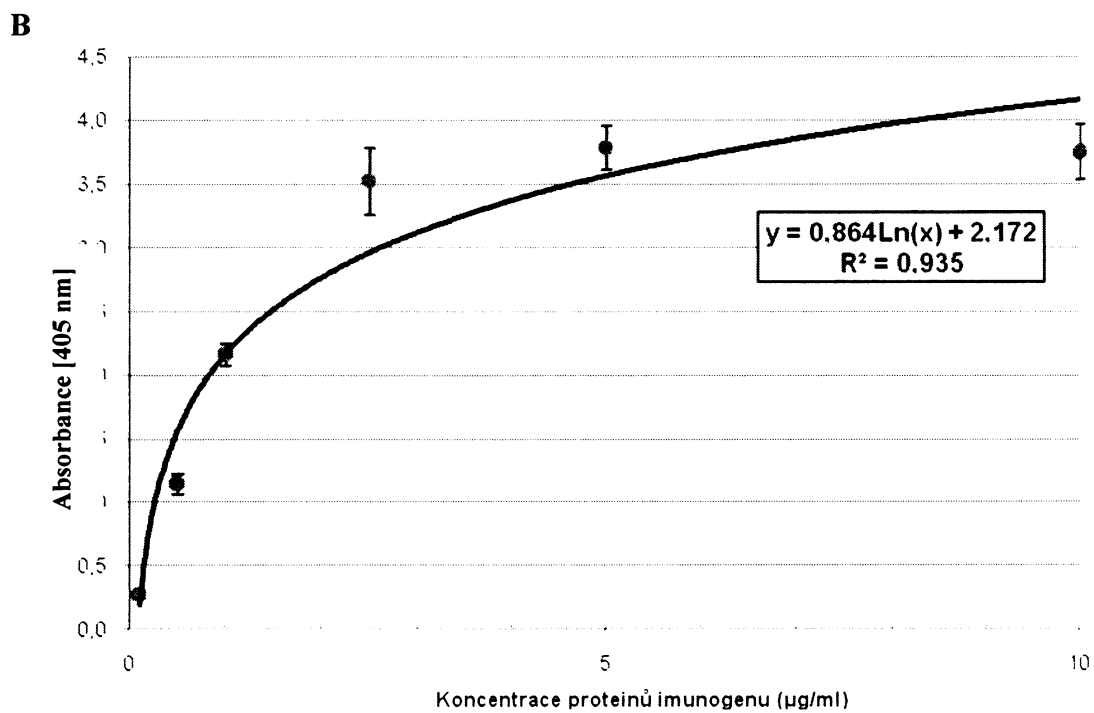
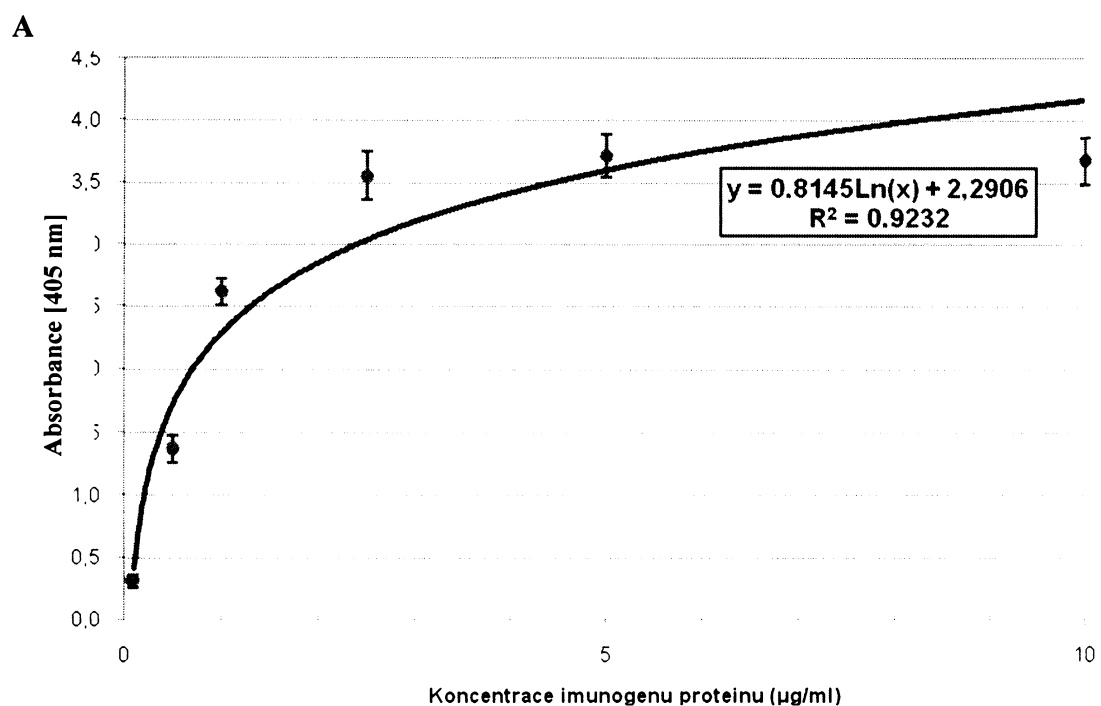
Pro přípravu a charakterizaci Pabs anti-AcaSir a anti-TyrPut byla připravena celá řada antigenů z organismů a materiálů vyskytujících se s vysokou pravděpodobností ve skladovaných potravinách spolu s roztoči. Kromě antigenů z chovné diety a pšeničných obilek byly všechny připravené antigeny otestovány na obsah proteinů (Tab. 2).

### 4.1.2 Pabs anti-AcaSir

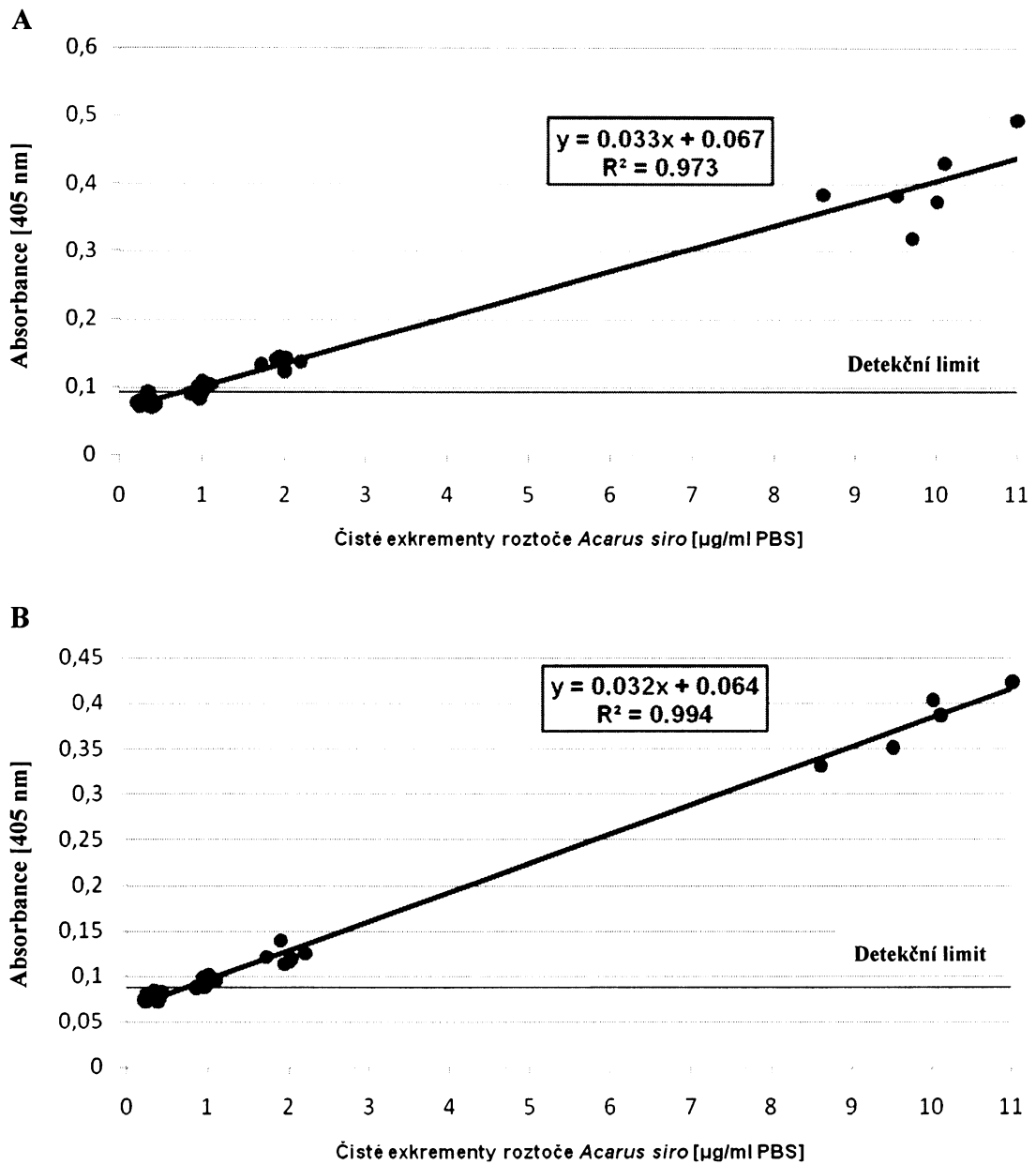
Citlivost techniky PTA-ELISA s připravenými protilátkami anti-AcaSir K53 a K54 k imunogenu byla hodnocena v rozmezí koncentrace imunogenu od 0 do 10  $\mu\text{g/ml}$ . Při pracovní koncentraci protilátek 1  $\mu\text{g}$  imunoglobulinu/ml byl detekční limit K53 i K54 0,1  $\mu\text{g}$  proteinů imunogenu/ml. V rozmezí koncentrace imunogenu 0 – 1  $\mu\text{g/ml}$  měla závislost absorbance na koncentraci imunogenu u obou použitých Pabs lineární průběh podle rovnice  $y = 2,555x + 0,069$ . S narůstající koncentrací imunogenu se závislost začala projevovat logaritmickým průběhem (Obr. 3).

K dalšímu testování citlivosti techniky PTA-ELISA s použitím protilátky anti-AcaSir K53 a K54 byla zvolena opět pracovní koncentrace protilátek 1  $\mu\text{g}$  imunoglobulinu/ml. Kalibrace testu na čisté exkrementy o koncentraci 0 – 11  $\mu\text{g/ml}$  vykazovala lineární průběh. Citlivost testu v obou případech dosáhla hodnoty 1  $\mu\text{g}$  čistých exkrementů/ml (Obr. 4). Nejnižší detekovaná koncentrace SGM byla 10  $\mu\text{g/ml}$ , také u obou použití Pabs (Obr. 5). A stejně tak i citlivost testu vůči jedincům u použití obou protilátek dosáhla ekvivalentního detekčního limitu, tedy hodnoty 3 roztoči/1 ml PBS (Obr. 6). Testování specifčnosti ukázalo, že Pabs anti-AcaSir K53 nemá křížové reakce vůči ostatním antigenům, jen k antigenu z druhu roztoče *Acarus gracilis*, druhá Pab anti-AcaSir vykazovala křížové reakce nejen k druhu *Acarus gracilis*, ale také k dalším druhům skladištních roztočů a to k druhům *Carpoglyphus lactis*, *Tyrophagus lini*, *Tyrophagus spp* (Obr. 7; Tab. 3).

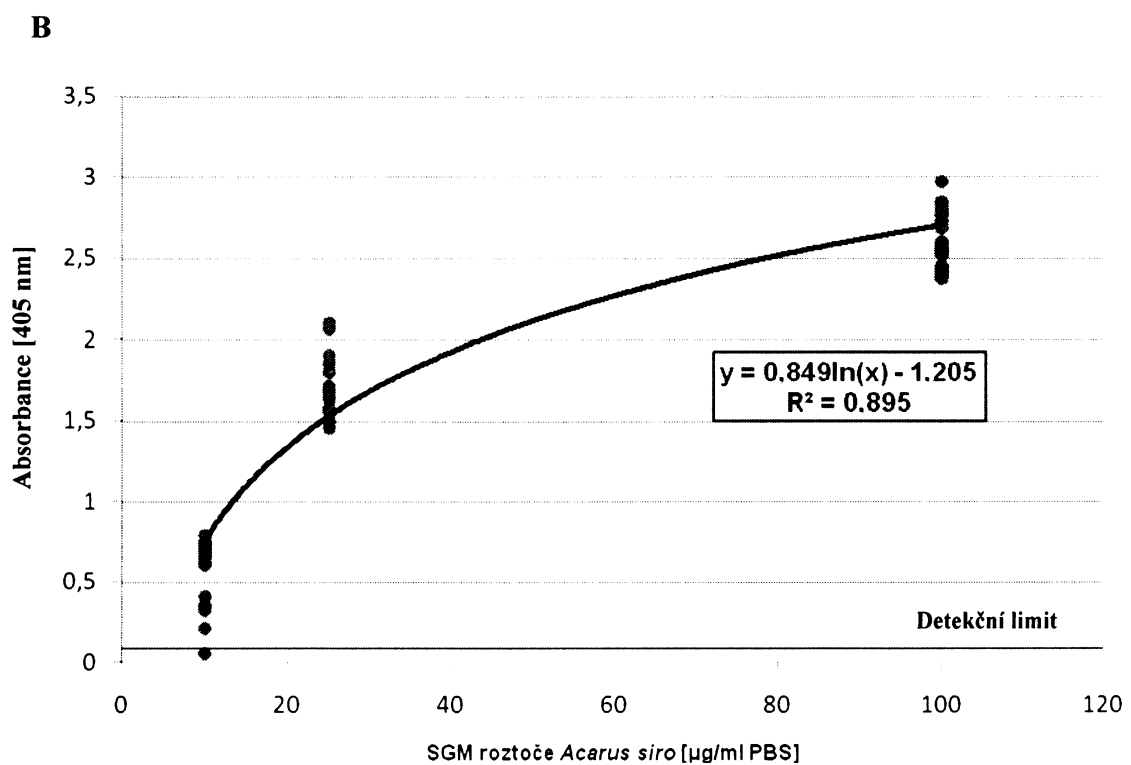
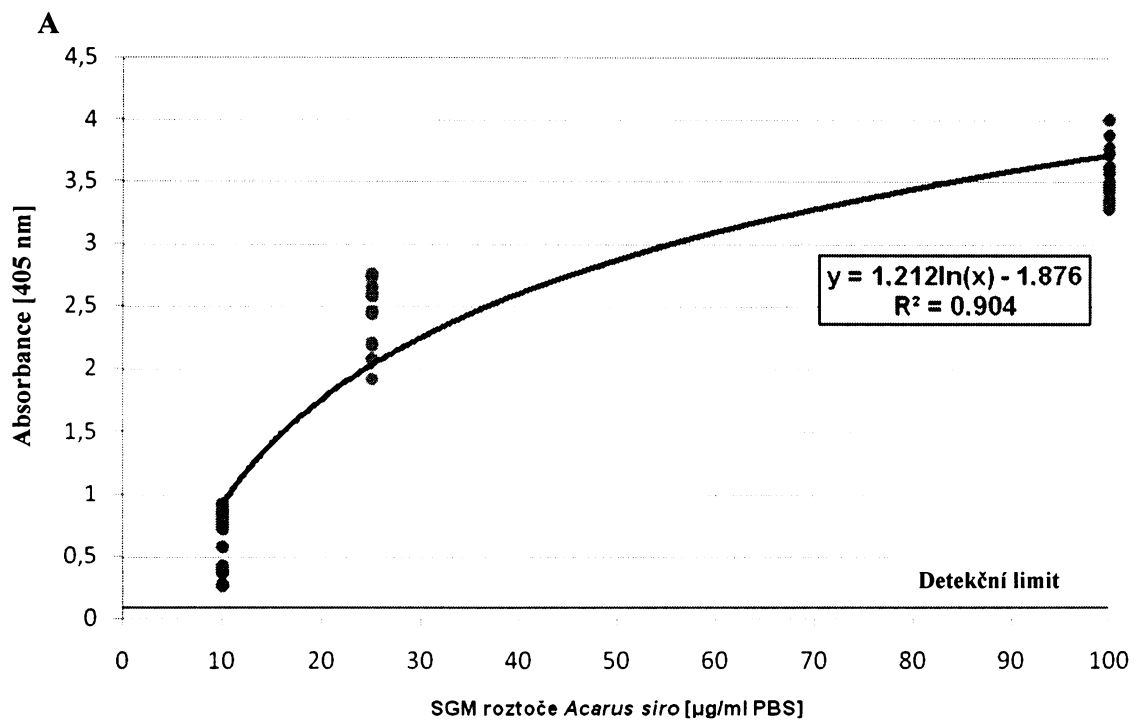
Obrázek 3: Kalibrace techniky PTA-ELISA vůči imunogenu s použitím PAB připravené proti druhu *Acarus siro*: A) anti-AcaSir K53 při pracovní koncentraci Pab 1 µg IgG/ml. B) anti-AcaSir (IgG K54) při pracovní koncentraci Pab 1 µg IgG/ml. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.



Obrázek 4: Kalibrace techniky PTA-ELISA na čisté exkrementy roztoče druhu *A. siro.* s použitím PAB připravené proti druhu *A. siro* A) anti-AcaSir (IgG K53) při pracovní koncentraci Pab 1 µg IgG/ml. B) anti-AcaSir (IgG K54) při pracovní koncentraci Pab 1 µg IgG/ml.

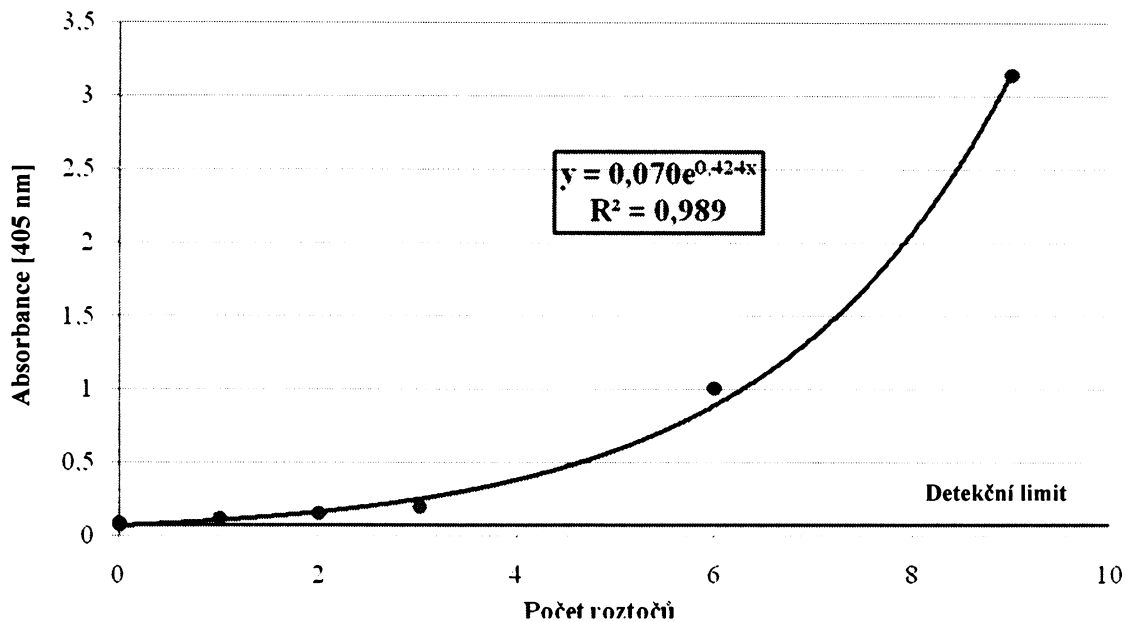


Obrázek 5: Citlivost techniky PTA-ELISA na SGM roztoče druhu *A. siro* s použitím PAB připravené proti druhu *A. siro* A) anti-AcaSir (IgG K53) při pracovní koncentraci Pab 1 µg IgG/ml. B) anti-AcaSir (IgG K54) při pracovní koncentraci Pab 1 µg IgG/ml.

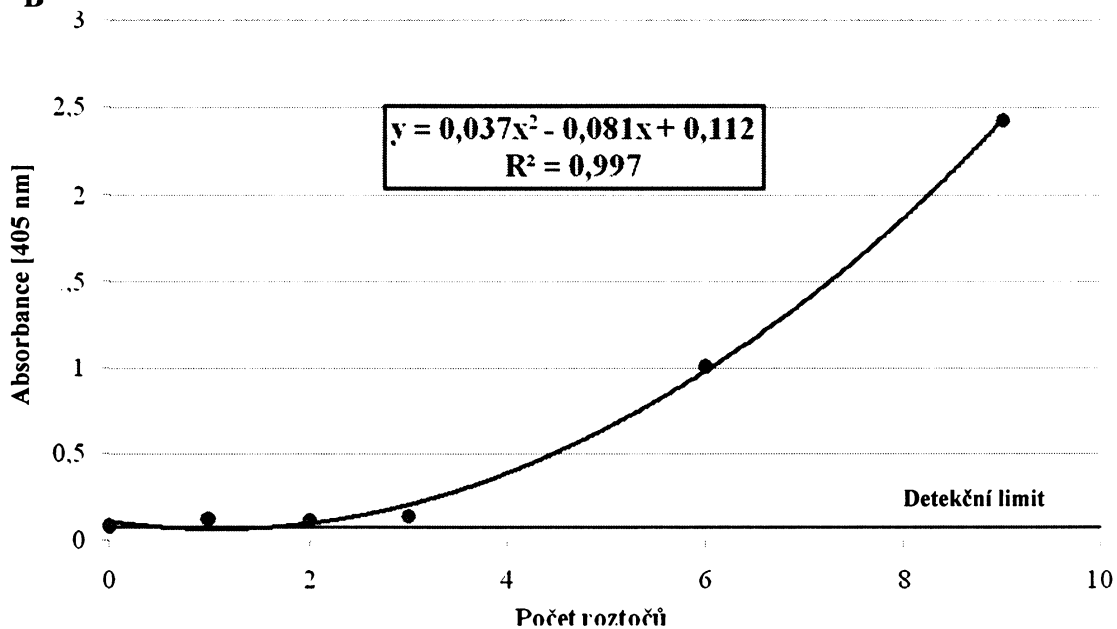


Obrázek 6: Citlivost techniky PTA-ELISA na jedince roztoče druhu *A. siro* s použitím PAB připravené proti druhu *A. siro* A) anti-AcaSir (IgG K53) při pracovní koncentraci Pab 1 µg IgG/ml. B) anti-AcaSir (IgG K54) při pracovní koncentraci Pab 1 µg IgG/ml.

A

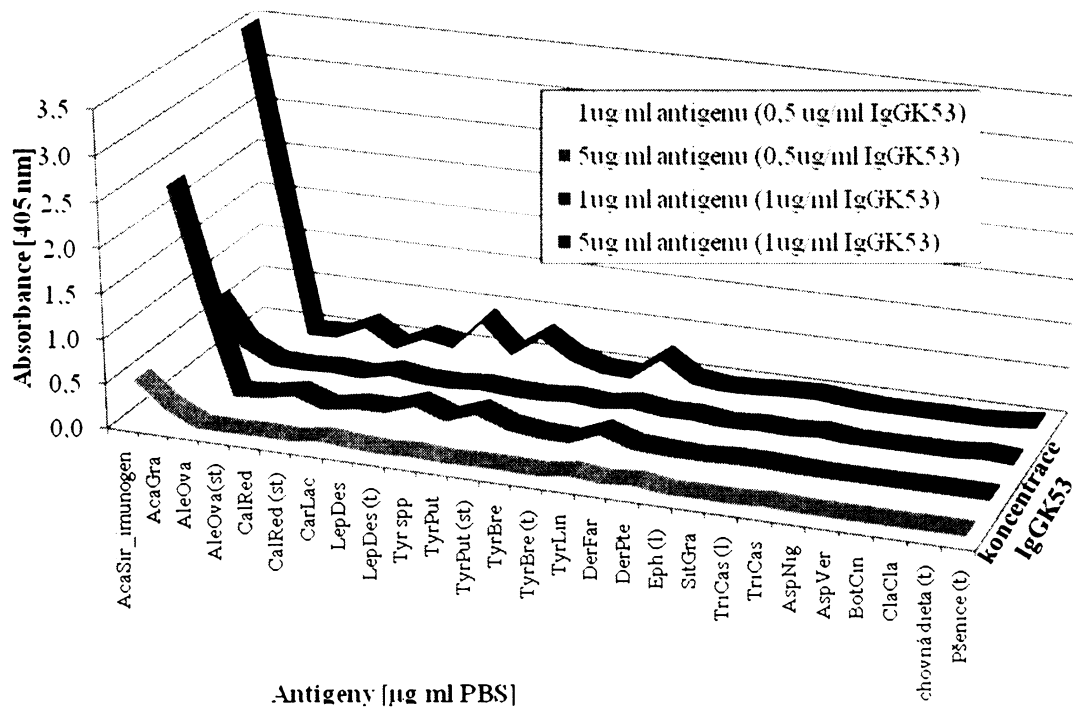


B

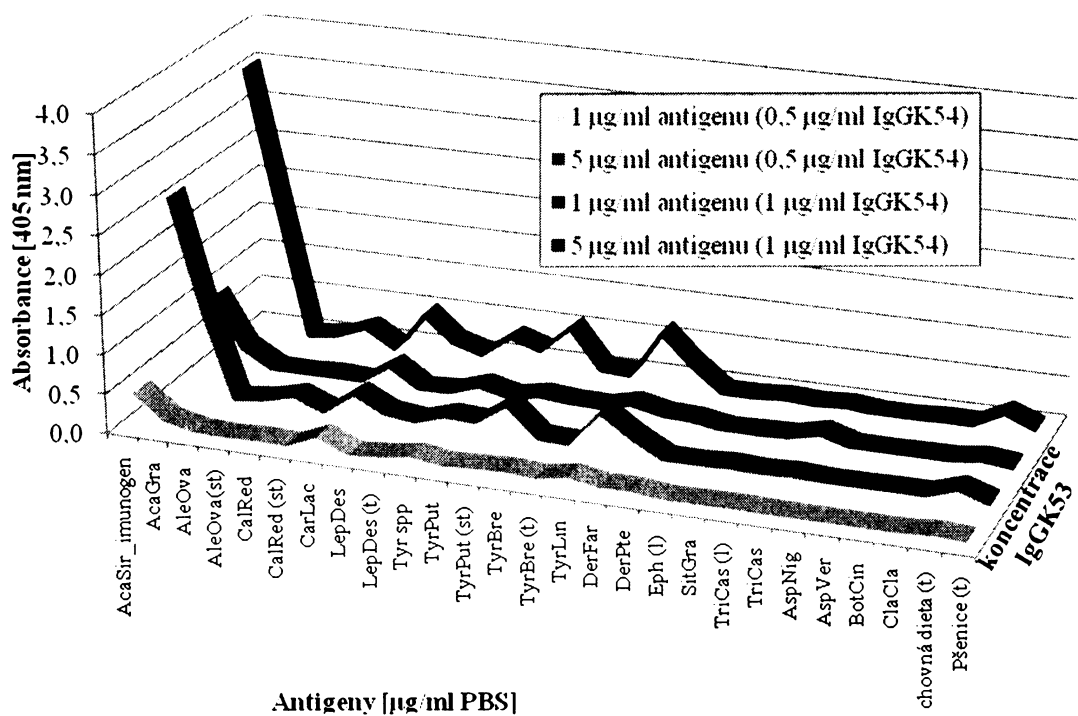


Obrázek 7: Specifičnost techniky PTA-ELISA s použitím PAB připravené proti druhu *A. siro*  
 A) anti-AcaSir (IgG K53). B) anti-AcaSir (IgG K54).

A



B



**Legenda:** *Acarus siro* (dospělci\_imunogen) – AcaSir\_imunogen; *Acarus gracilis* (dospělci) – AcaGra; *Aleuroglyphus ovatus* (dospělci) – AleOva; *Aleuroglyphus ovatus* (SGM, totální) – AleOva(st); *Caloglyphus redickoverzi* (dospělci) – CalRed; *Caloglyphus redickoverzi* (SGM, totální) – CalRed (st); *Carpoglyphus lactis* (dospělci) – CarLac; *Lepidoglyphus destructor* (dospělci) – LepDes; *Lepidoglyphus destructor* (totální) – LepDes (t); *Tyrophagus spp.* – Tyr spp.; *Tyrophagus putrescentiae* (dospělci) – TyrPut (t); *Tyrophagus putrescentiae* (SGM, totální) – TyrPut (st); *Tyrophagus brevicrinatus* (dospělci) – TyrBre; *Tyrophagus brevicrinatus* (totální) – TyrBre(t); *Tyroborus lini* – TyrL; *Dermatophagoides farinae* (dospělci) – DerF; *Dermatophagoides pteronyssinus* (dospělci) – DerP; *Ephestia kuehniella* (larvy) – Eph (l); *Sitophilus granarius* (dospělci) – SitGra; *Tribolium castaneum* (dospělci) – TriCas; *Tribolium castaneum* (larvy) – TriCas (l); *Aspergillus niger var. Niger* – AspNig; *Aspergillus versicolor* – AspVer; *Botrytis cinerea* – BotCin; *Cladosporium cladosporioides* – ClaCla; chovná dieta (totální) – chovná dieta (t); pšenice (totální – pšenice (t)

### 4.1.3 Pabs anti-TyrPut

Citlivost techniky PTA-ELISA s protilátkami anti-TyrPut K60 a K61 k imunogenu byla zjišťována v rozmezí koncentrace imunogenu od 0 do 1 µg/ml. K testování byly použity 3 různé pracovní koncentrace protilátek, v rozmezí 0,1 - 1 µg imunoglobulinu/ml. Detekční limit testu byl v případě anti-TyrPut K60 i K61 0,05 µg proteinů imunogenu/ml (Obr. 8) u všech použitých koncentrací. Pro detekci nativních proteinů z *T. putrescentiae* byla použita jen PAB anti-TyrPut K61 (Obr. 9) v pracovní koncentraci 0,1 µg/ml. Bylo prokázáno, že test detekuje jak dospělé, tak jejich exkrementy ve formě čistých exkrementů i SGM. Kalibrace testu na čisté exkrementy o koncentraci 0 – 2,5 mg/ml vykazovala logaritmický průběh  $\exp(\text{abs}-1,6132)/0,2642$ . Tato rovnice byla použita pro výpočet obsahu exkrementů v experimentu sledování produkce exkrementů roztočů. Citlivost testu dosáhla 0,4 µg čistých exkrementů/ml (Obr. 10). Nejnižší detekovaná koncentrace SGM byla 3 µg/ml (Obr. 11). Citlivost testu vůči jedincům dosáhla hodnoty 6 roztočů/0,5 ml PBS (Obr. 13). Při měření specifčnosti testu s anti-TyrPut K61 se ukázalo, že tato protilátka má křížové reakce se zástupci příbuzných čeledí (Obr. 12; Tab. 4).

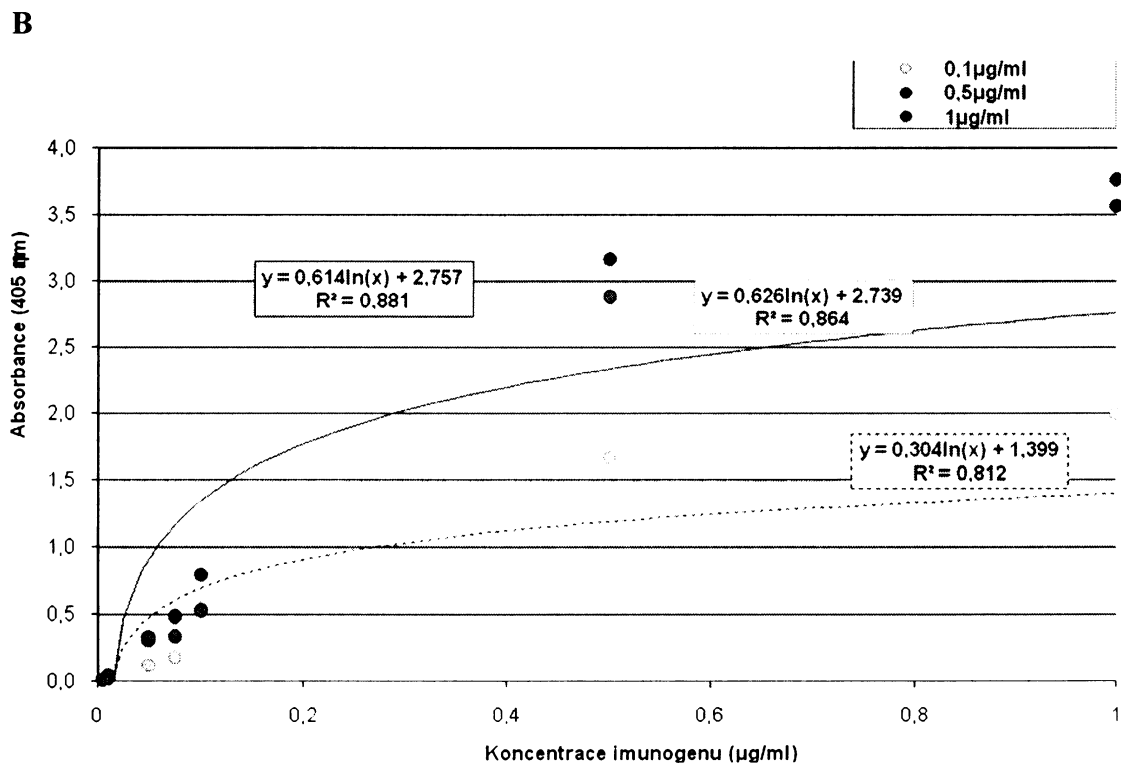
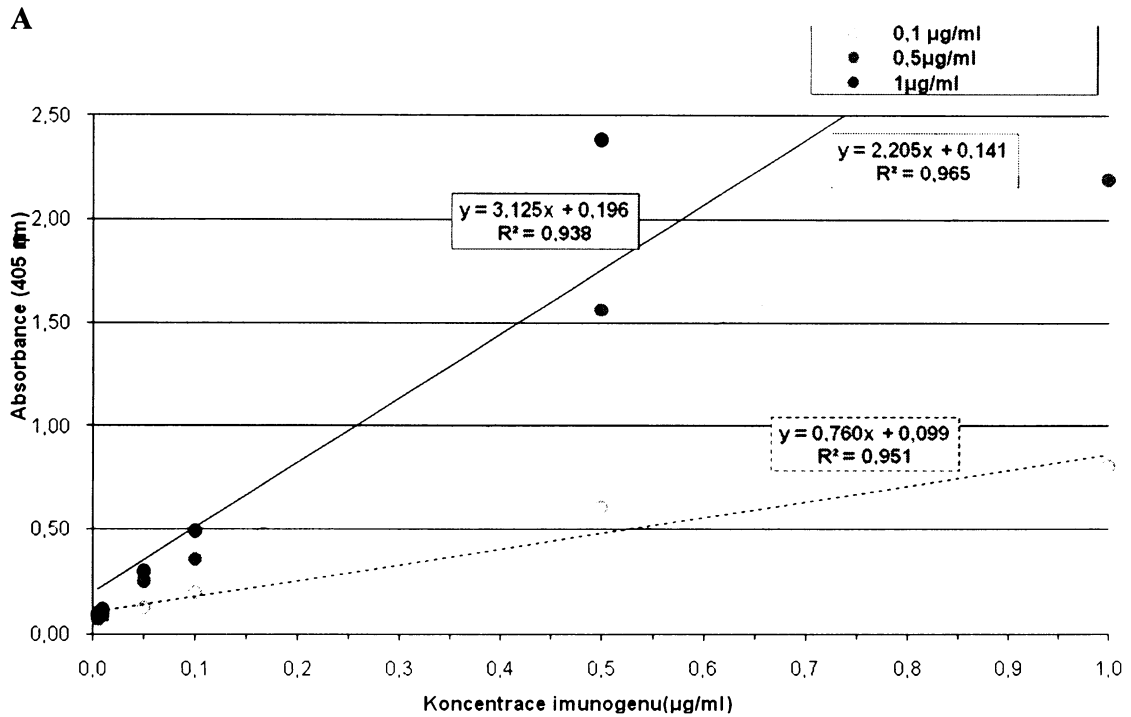


**Tabulka 3: Specifičnost techniky PTA-ELISA s použitím PAB připravené proti druhu *Acarus siro* anti-AcaSir K53 a K54.**

| koncentrace<br>antigenu | koncentrace K53 |        |        |        | koncentrace K54 |        |        |        |
|-------------------------|-----------------|--------|--------|--------|-----------------|--------|--------|--------|
|                         | 0,5µg/ml        |        | 1µg/ml |        | 0,5µg/ml        |        | 1µg/ml |        |
|                         | 1µg/ml          | 5µg/ml | 1µg/ml | 5µg/ml | 1µg/ml          | 5µg/ml | 1µg/ml | 5µg/ml |
| typ antigenu            | [%]             |        |        |        |                 |        |        |        |
| AcaSir_imunogen         | 100             | 100    | 100    | 100    | 100             | 100    | 100    | 100    |
| AcaGra                  | 38              | 47     | 28     | 50     | 25              | 44     | 27     | 50     |
| AleOva                  | 1               | 1      | 3      | 1      | 4               | 1      | 1      | 2      |
| AleOva (st)             | 0               | 2      | 2      | 1      | 1               | 3      | 0      | 3      |
| CalRed                  | 2               | 5      | 5      | 6      | 5               | 6      | 2      | 7      |
| CalRed (st)             | 0               | 0      | 1      | 0      | 2               | 1      | 0      | 1      |
| CarLac                  | 11              | 3      | 13     | 5      | 39              | 12     | 29     | 15     |
| LepDes                  | 5               | 3      | 6      | 3      | 8               | 2      | 3      | 3      |
| LepDes (t)              | 1               | 8      | 5      | 13     | 0               | 4      | 0      | 6      |
| Tyr spp                 | 6               | 3      | 10     | 3      | 22              | 7      | 17     | 11     |
| TyrPut                  | 0               | 8      | 6      | 10     | 13              | 16     | 14     | 17     |
| TyrPut (st)             | 4               | 3      | 5      | 4      | 9               | 6      | 6      | 7      |
| TyrLin                  | 13              | 6      | 13     | 8      | 27              | 19     | 20     | 20     |
| TyrBre                  | 4               | 1      | 10     | 1      | 17              | 2      | 10     | 3      |
| TyrBre(t)               | 2               | 0      | 5      | 1      | 11              | 2      | 10     | 2      |
| DerFar                  | 5               | 2      | 6      | 1      | 11              | 9      | 10     | 9      |
| DerPte                  | 12              | 1      | 7      | 0      | 12              | 0      | 8      | 0      |
| Eph (l)                 | 0               | 0      | 0      | 1      | 0               | 0      | 0      | 0      |
| SitGra                  | 1               | 1      | 4      | 1      | 2               | 1      | 1      | 1      |
| TriCas (l)              | 0               | 1      | 2      | 2      | 1               | 1      | 13     | 1      |
| TriCas                  | 5               | 1      | 6      | 1      | 3               | 0      | 3      | 1      |
| AspNig                  | 1               | 0      | 0      | 0      | 0               | 0      | 0      | 0      |
| AspVer                  | 0               | 0      | 0      | 0      | 0               | 0      | 0      | 0      |
| BotCin                  | 0               | 0      | 1      | 0      | 0               | 0      | 1      | 1      |
| ClaCla                  | 0               | 0      | 1      | 0      | 0               | 0      | 1      | 1      |
| Chovná dieta (t)        | 2               | 0      | 6      | 1      | 8               | 5      | 7      | 6      |
| Pšenice (t)             | 1               | 0      | 3      | 2      | 1               | 2      | 1      | 2      |

**Legenda:** *Acarus siro* (dospělci imunogen) – AcaSir\_imunogen; *Acarus gracilis* (dospělci) – AcaGra; *Aleuroglyphus ovatus* (dospělci) – AleOva; *Aleuroglyphus ovatus* (SGM, totální) – AleOva(st); *Caloglyphus redickoverzi* (dospělci) – CalRed; *Caloglyphus redickoverzi* (SGM, totální) – CalRed (st); *Carpoglyphus lactis* (dospělci) – CarLac; *Lepidoglyphus destructor* (dospělci) – LepDes; *Lepidoglyphus destructor* (totální) – LepDes (t); *Tyrophagus spp.* – Tyr spp.; *Tyrophagus putrescentiae* (dospělci) – TyrPut (t); *Tyrophagus putrescentiae* (SGM, totální) – TyrPut (st); *Tyrophagus brevicrinatus* (dospělci) – TyrBre; *Tyrophagus brevicrinatus* (totální) – TyrBre(t); *Tyroborus lini* – TyrL; *Dermatophagoides farinae* (dospělci) – DerF; *Dermatophagoides pteronyssinus* (dospělci) – DerP; *Ephestia kuehniella* (larvy) – Eph (l); *Sitophilus granarius* (dospělci) – SitGra; *Tribolium castaneum* (dospělci) – TriCas; *Tribolium castaneum* (larvy) – TriCas (l); *Aspergillus niger var. Niger* – AspNig; *Aspergillus versicolor* – AspVer; *Botrytis cinerea* – BotCin; *Cladosporium cladosporioides* – ClaCla; chovná dieta (totální) – chovná dieta (t); pšenice (totální – pšenice (t)

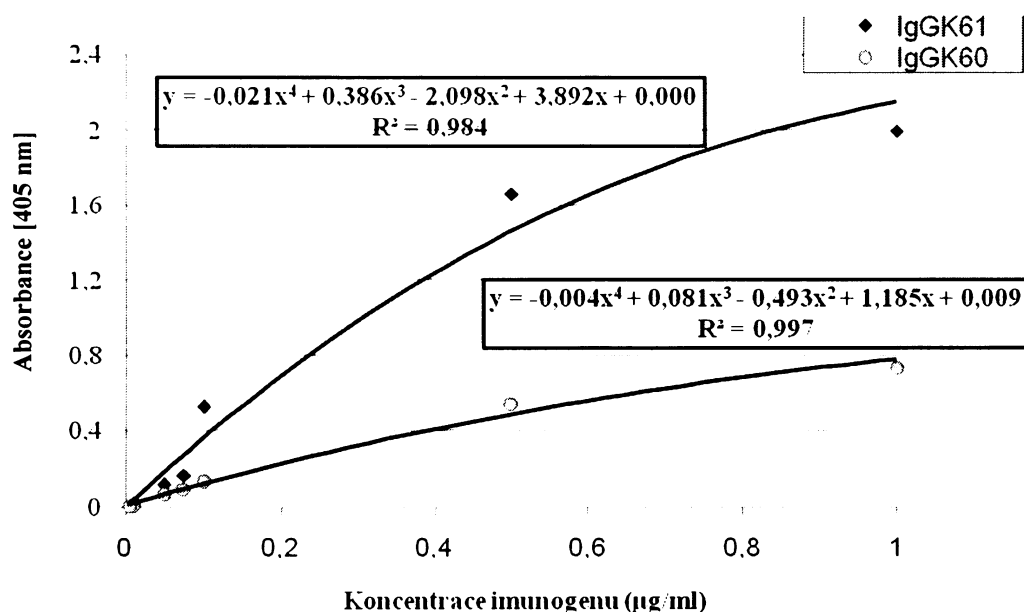
Obrázek 8: Kalibrace techniky PTA-ELISA vůči imunogenu s použitím PAB připravené proti druhu *Tyrophagus putrescentiae* A) anti- TyrPut (IgG K60) s rozmezím pracovní koncentrace protilátky 0,1 - 1 µg IgG/ml. B) Pabs anti- TyrPut (IgG K61) vůči imunogenu s rozmezím pracovní koncentrace protilátky 0,1 - 1 µg IgG/ml.



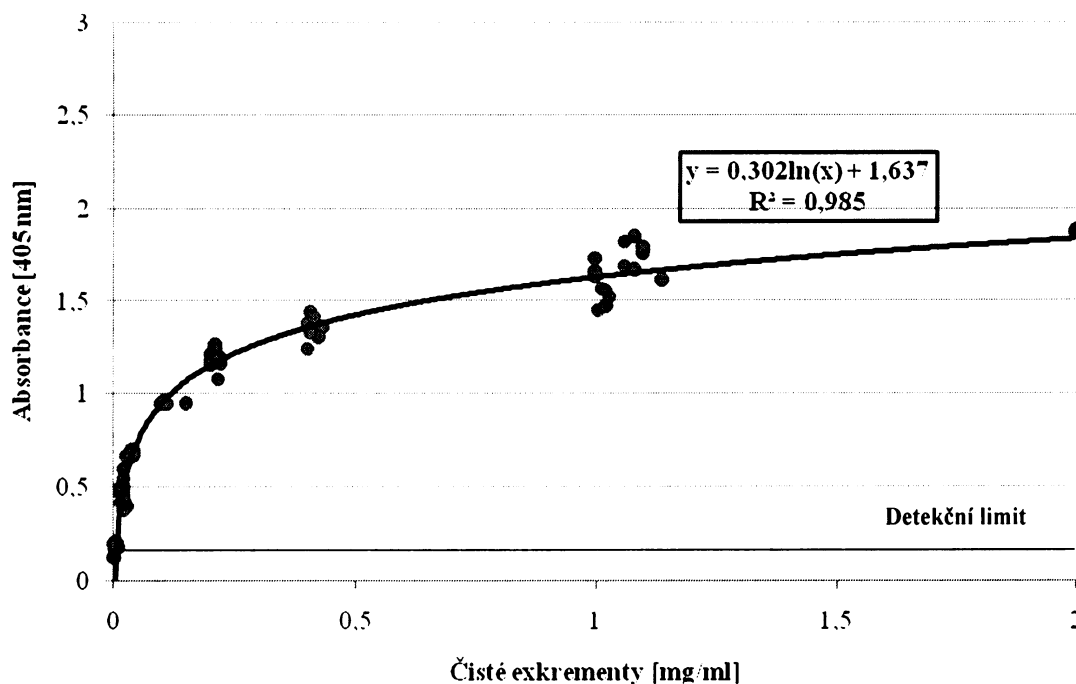
## 4.2 Komerční protilátka anti-Tyr p 2

Byla provedena kalibrace techniky PTA-ELISA s použitím komerční protilátky anti-Tyr p 2 s pracovní koncentrací 1 µg/ml vůči čistým exkrementům roztoče *T. putrescentiae*. Kalibrace testu na čisté exkrementy o koncentraci 0 – 2,5 mg/ml měla logaritmický průběh a se zápisem průběhu funkce  $y = 0,331\ln(x) + 2,282$  (Obr. 14)

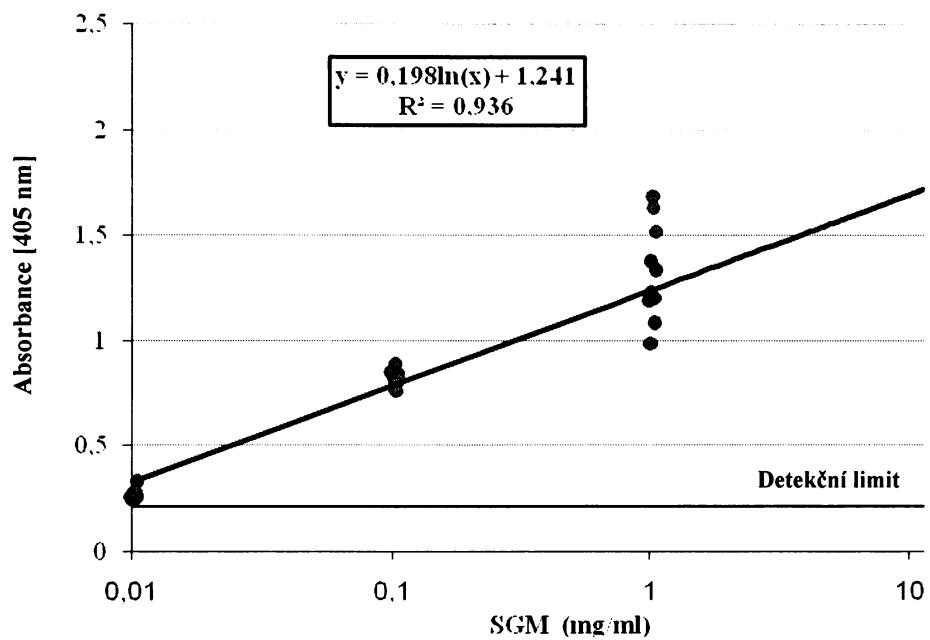
Obrázek 9: Srovnání citlivosti techniky PTA-ELISA s použitím Pabs anti-TyrPut IgGK60 a s IgGK61 vůči imunogenu při nejnižší pracovní koncentraci protilátky 0,1 µg IgG/ml.



Obrázek 10: Citlivost techniky PTA-ELISA s použitím Pab anti-TyrPut (IgG K61) při pracovní koncentraci Pab 0,1 µg IgG/ml na čisté exkrementy roztoče *T. putrescentiae*.



Obrázek 11: Citlivost techniky PTA-ELISA s použitím Pabs anti-TyrPut (IgG K61) při pracovní koncentraci Pab 0,1 µg IgG/ml na SGM roztoče *T. putrescentiae*.



**Tabulka 4: Specifičnost techniky PTA-ELISA s použitím Pabs anti-TyrPut K61.**

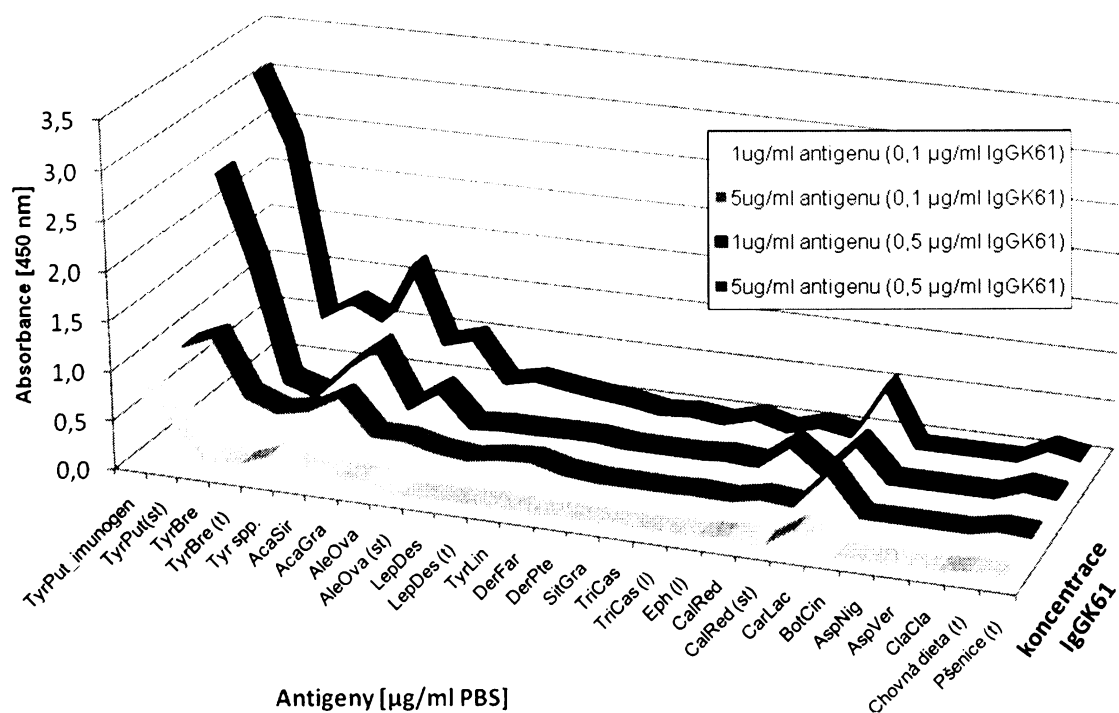
| koncentrace antigenu | koncentrace IgGK61 |         |           |         |
|----------------------|--------------------|---------|-----------|---------|
|                      | 0,1 µg/ml          |         | 0,5 µg/ml |         |
|                      | 1 µg/ml            | 5 µg/ml | 1 µg/ml   | 5 µg/ml |
| typ antigenu         | [%]                |         |           |         |
| TyrPut_imunogen      | 100                | 100     | 100       | 100     |
| TyrPut (st)          | 45                 | 58      | 65        | 116     |
| TyrBre               | 10                 | 19      | 13        | 47      |
| TyrBre (st)          | 6                  | 25      | 12        | 33      |
| Tyr spp.             | 20                 | 20      | 29        | 41      |
| AcaSir               | 31                 | 40      | 21        | 62      |
| AcaGra               | 6                  | 15      | 15        | 20      |
| AleOva               | 1                  | 1       | 0         | 2       |
| AleOva (t)           | 15                 | 18      | 16        | 20      |
| LepDes               | 2                  | 7       | 1         | 7       |
| LepDes (t)           | 2                  | 5       | 2         | 13      |
| TyrLin               | 2                  | 4       | 4         | 15      |
| DerFar               | 2                  | 3       | 2         | 5       |
| DerPte               | 0                  | 1       | 1         | 1       |
| SitGra               | 0                  | 2       | 0         | 1       |
| TriCas               | 0                  | 0       | 0         | 1       |
| TriCas (l)           | 1                  | 3       | 1         | 3       |
| Eph (l)              | 0                  | 0       | 0         | 0       |
| CalRed               | 11                 | 3       | 6         | 8       |
| CalRed (st)          | 0                  | 1       | 0         | 5       |
| CarLac               | 15                 | 21      | 31        | 48      |
| BotCin               | 0                  | 0       | 0         | 0       |
| AspNig               | 0                  | 0       | 0         | 1       |
| AspVer               | 0                  | 0       | 0         | 1       |
| ClaCla               | 0                  | 0       | 0         | 0       |
| Chovná dieta (t)     | 5                  | 6       | 6         | 8       |
| Pšenice              | 2                  | 4       | 3         | 3       |

**Legenda:**

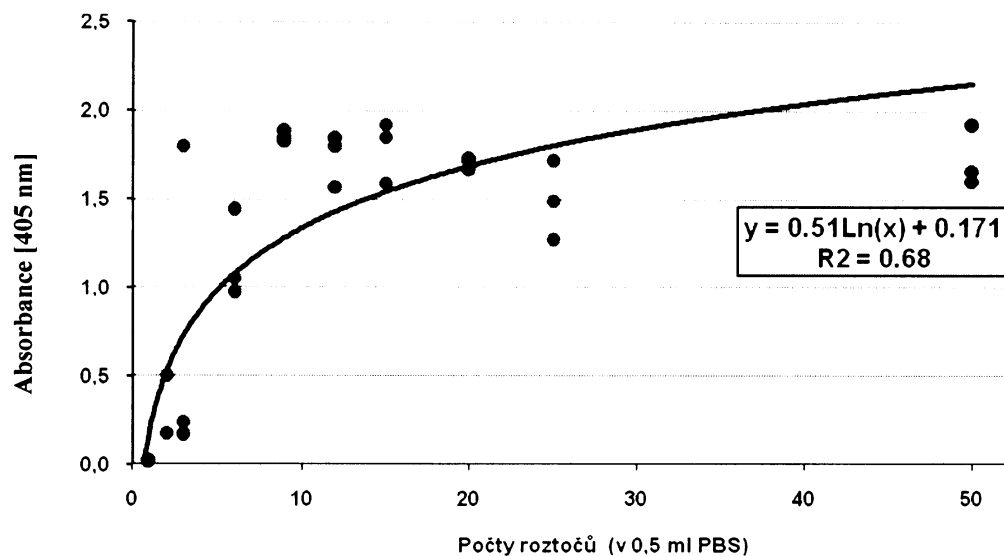
*Tyrophagus putrescentiae* (dospělci\_imunogen) – TyrPut\_imunogen; *Tyrophagus putrescentiae* (SGM, totální) - TyrPut (st); *Tyrophagus brevicrinatus* (dospělci) – TyrBre; *Tyrophagus brevicrinatus* (SGM, totální) - TyrBre(st); *Tyrophagus* spp. – Tyr spp.; *Acarus gracilis* (dospělci) – AcaGra; *Acarus siro* (dospělci) – AcaSir; *Aleuroglyphus ovatus* (dospělci) – AleOva; *Aleuroglyphus ovatus* (SGM, totální) - AleOva(st); *Caloglyphus redickoverzi* (dospělci) - CalRed; *Caloglyphus redickoverzi* (SGM,

totální)- CalRed (st); *Carpoglyphus lactis* (dospělci) – CarLac; *Dermatophagoides farinae* (dospělci) – DerF; *Dermatophagoides pteronyssinus* (dospělci) – DerP; *Lepidoglyphus destructor* (dospělci) – LepDes; *Lepidoglyphus destructor* (totální) - LepDes (t); *Tyroborus lini* (dospělci) – TyrL; *Sitophilus granarius* (dospělci) – SitGra; *Tribolium castaneum* (dospělci) – TriCas; *Tribolium castaneum* (larvy) - TriCas (l); *Ephestia kuehniella* (larvy) - Eph (l); *Aspergillus niger* var. *Niger* – AspNig; *Aspergillus versicolor* – AspVer; *Botrytis cinerea* - BotCin; *Cladosporium cladosporioides* – ClaCla; chovná dieta (totální) – chovná dieta (t)

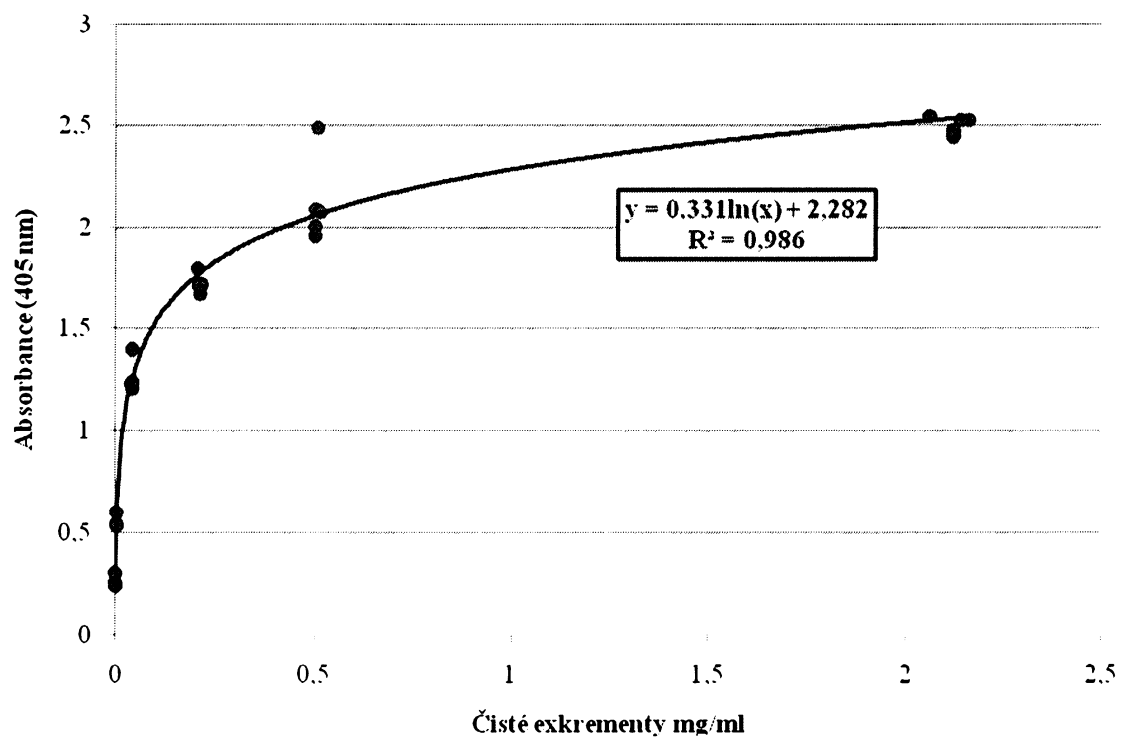
**Obrázek 12: Specifičnost techniky PTA-ELISA s použitím Pab anti-TyrPut (IgG K61).**



Obrázek 13: Citlivost techniky PTA-ELISA s použitím Pab anti-TyrPut (IgG K61) při pracovní koncentraci Pab 0,1 µg IgG/ml vůči jedincům roztoče *T. putrescentiae*.



Obrázek 14: Kalibrace techniky PTA-ELISA s použitím Pab komerční anti-Tyr p 2 při pracovní koncentraci Pab 1 µg IgG/ml vůči čistým exkrementům.





### 4.3 Aplikace Pabs anti-TyrPut K61 a komerční anti-Tyr p 2 v měření dynamiky produkce exkrementů roztočů *T. putrescentiae* v závislosti na vnitřní rychlosti růstu populace (*r*).

Rychlost růstu populace roztoče *T. putrescentiae* závisela na teplotě a vlhkosti. Při nízké vlhkosti (rozsah m.c. od 11,6% do 15,8%) obilí byl sledován nárůst populace roztoče při teplotách 15-25°C (Obr.15 A). Při středních vlhkostech v rozsahu (rozsah m.c. od 12,47% do 16,47%) narůstala populace roztočů od 15 do 30°C (Obr.15 B). Při nejvyšších vlhkostech (rozsah m.c. od 16% do 18,1%) narůstala populace roztočů od 15 do 35°C (Obr.15 C).

Produkce exkrementů v komůrkách měřená pomocí protilátky anti-TyrPut K61 (Tab.12, viz. Příloha) byla korelována s velikostí populace, teplotním režimem a m.c. v komůrkách (Tab. 5). Tato korelace však nebyla pozorována, jestliže byla produkce exkrementů stanovena pomocí protilátky anti-Tyr p 2. (Tab.12, viz. Příloha )

**Tabulka 5: Matice korelačních koeficientů pro všechny populace (rostoucí  $r>0$  i nerostoucí  $r<0$ ). Sledované parametry (Tab.12, viz. Příloha): N-(počet roztočů); T(teplota); m.c.(obsah vody v obilí); K61 (produkce exkrementů sledována anti-TyrPut K61); Tyr p 2 (produkce exkrementů sledována anti-Tyr p 2).**

| Variables      | N            | T            | m.c.         | k61          | tp2          |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>N</b>       | <b>1.000</b> | 0.296        | 0.255        | 0.881        | 0.034        |
| <b>T</b>       | 0.296        | <b>1.000</b> | -0.609       | 0.294        | 0.056        |
| <b>m.c.</b>    | 0.255        | -0.609       | <b>1.000</b> | 0.309        | 0.202        |
| <b>K61</b>     | 0.881        | 0.294        | 0.309        | <b>1.000</b> | 0.166        |
| <b>Tyr p 2</b> | 0.034        | 0.056        | 0.202        | 0.166        | <b>1.000</b> |

Lineárně regresní model vysvětlující vliv teplotního režimu, vlhkosti obilí a velikosti populace na produkci exkrementů pomocí anti-TyrPut K61 byl signifikantní ( $F_{(6,161)}=240$ ,  $p<0.001$ ,  $R^2=0.899$ ). V tomto modelu nebyl prokázán signifikantně významný vliv velikosti populace (N) a vlhkosti obilí (m.c) na produkci exkrementů, zatímco signifikantní byl vliv teploty (T) a interakcí velikosti populace s teplotou a vlhkostí, stejně tak jako interakce teploty a vlhkosti (Tab. 6).

**Tabulka 6: Vliv teplotního režimu, vlhkosti obilí a velikosti populace na produkci exkrementů vysvětlený pomocí anti-TyrPut K61. N-(počet roztočů); T(teplota); m.c.(obsah vody v obilí); \* interakce proměnných.**

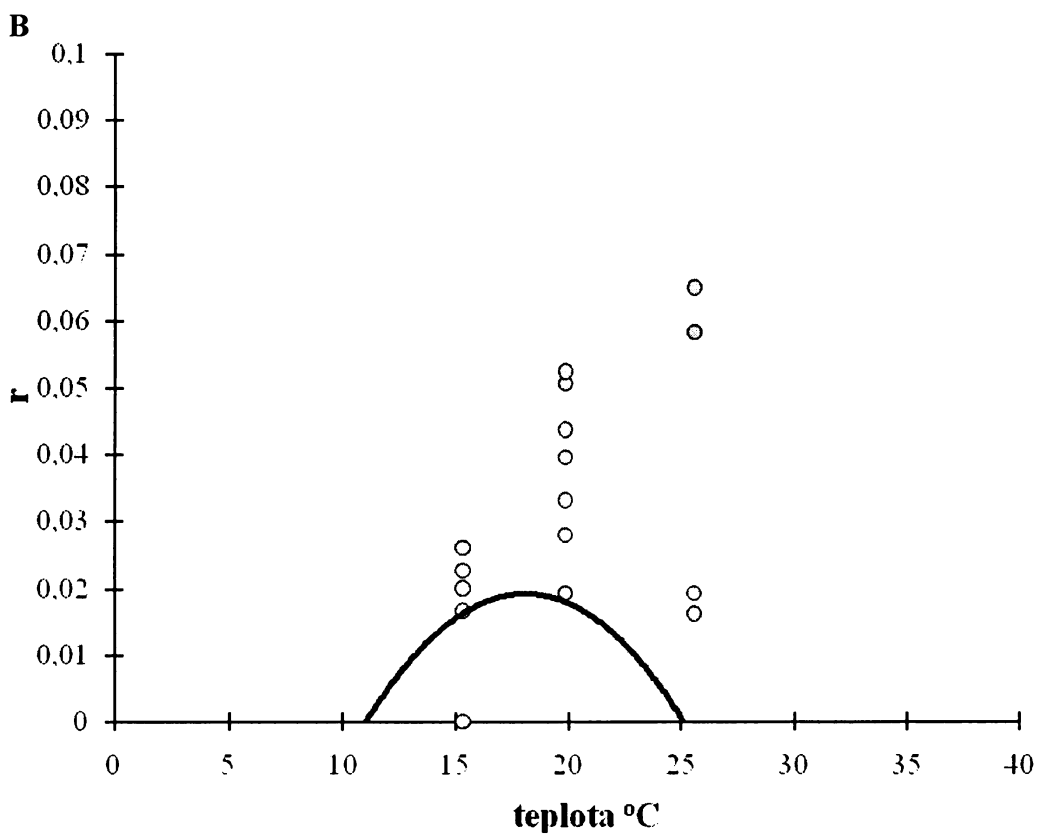
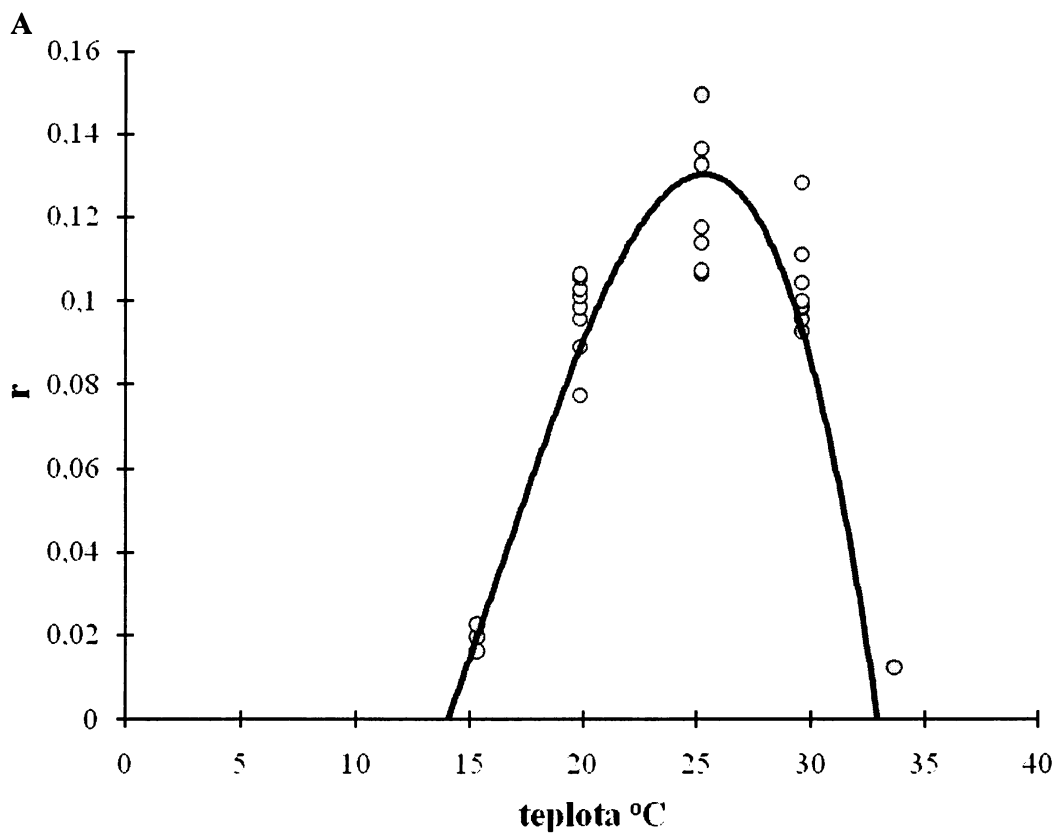
| Source        | DF | Sum of squares | Mean squares | F      | Pr > F             |
|---------------|----|----------------|--------------|--------|--------------------|
| <b>N</b>      | 1  | 0.082          | 0.082        | 2.903  | 0.090              |
| <b>T</b>      | 1  | 0.194          | 0.194        | 6.871  | <b>0.010</b>       |
| <b>m.c.</b>   | 1  | 0.001          | 0.001        | 0.034  | 0.853              |
| <b>N*T</b>    | 1  | 1.587          | 1.587        | 56.333 | <b>&lt; 0.0001</b> |
| <b>N*m.c.</b> | 1  | 0.208          | 0.208        | 7.378  | <b>0.007</b>       |
| <b>T*m.c.</b> | 1  | 0.277          | 0.277        | 9.818  | <b>0.002</b>       |

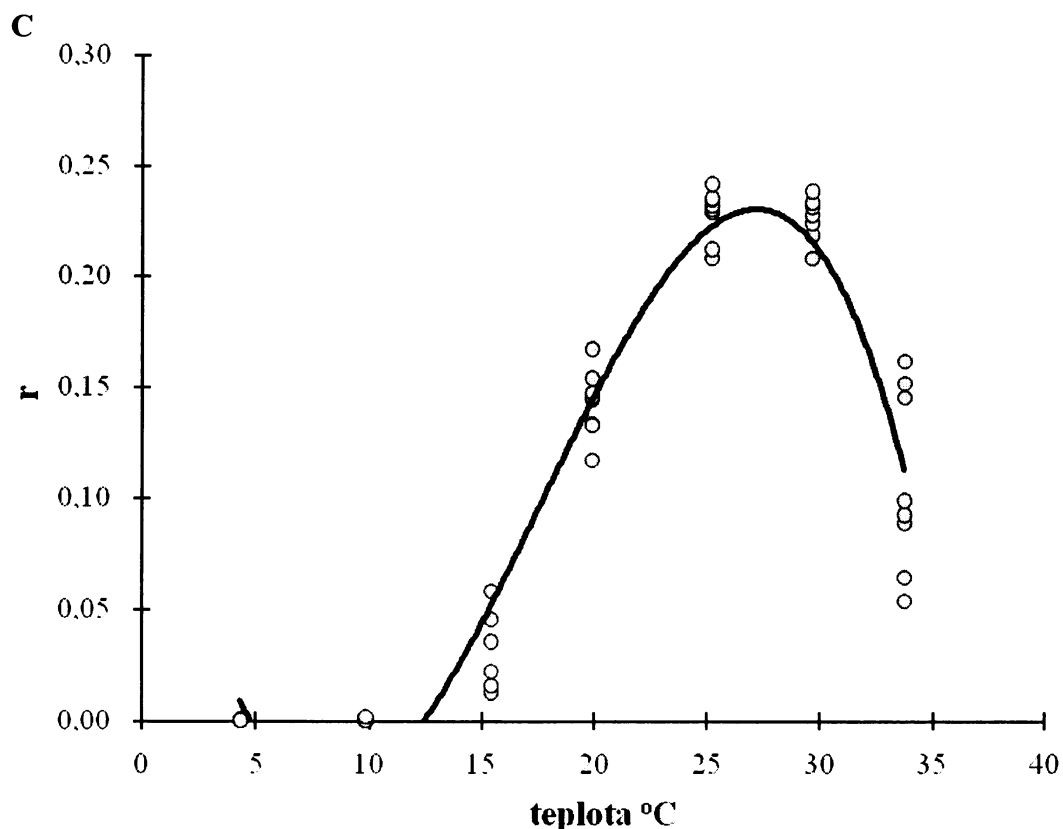
V další analýze byla data rozdělena podle vnitřní rychlosti růstu na rostoucí ( $r > 0$ ) a vymírající ( $r \leq 0$ ) populace. V analýze pro rostoucí populace byl lineárně regresní model vysvětlující vliv teplotního režimu, vlhkosti obilí a velikosti populace na produkci exkrementů pomocí anti-TyrPut K61 signifikantní ( $F(6,81) = 138, p < 0.001, R^2 = 0.911$ ). V tomto modelu byl prokázán signifikantně významný vliv velikosti populace (N), avšak nesignifikantní vliv vlhkosti obilí (m.c.) a teploty (T) na produkci exkrementů. Signifikantní však byly některé interakce (Tab. 7).

**Tabulka 7: Vliv teplotního režimu, vlhkosti obilí a velikosti populace na produkci exkrementů vysvětlený pomocí anti-TyrPut K61 pro rostoucí populace. N-(počet roztočů); T(teplota); m.c.(obsah vody v obilí); \*( interakce proměnných).**

| Source          | DF | Sum of squares | Mean squares | F      | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|--------------|--------|--------|
| <b>N</b>        | 1  | 0.434          | 0.434        | 11.448 | 0.001  |
| <b>T</b>        | 1  | 0.006          | 0.006        | 0.169  | 0.682  |
| <b>m.c.</b>     | 1  | 0.118          | 0.118        | 3.103  | 0.082  |
| <b>N*T</b>      | 1  | 0.398          | 0.398        | 10.513 | 0.002  |
| <b>T*m.c.</b>   | 1  | 0.001          | 0.001        | 0.031  | 0.860  |
| <b>N*T*m.c.</b> | 1  | 0.189          | 0.189        | 5.002  | 0.028  |

Obrázek 15: Závislost vnitřního růstu populace ( $r$ ) na teplotě ( $T$ ) při obsahu vody v zrně (m.c.):  
A) od 11,6% do 15,8%; B) od 12,47% do 16,47%; C) od 16% do 18,1%.





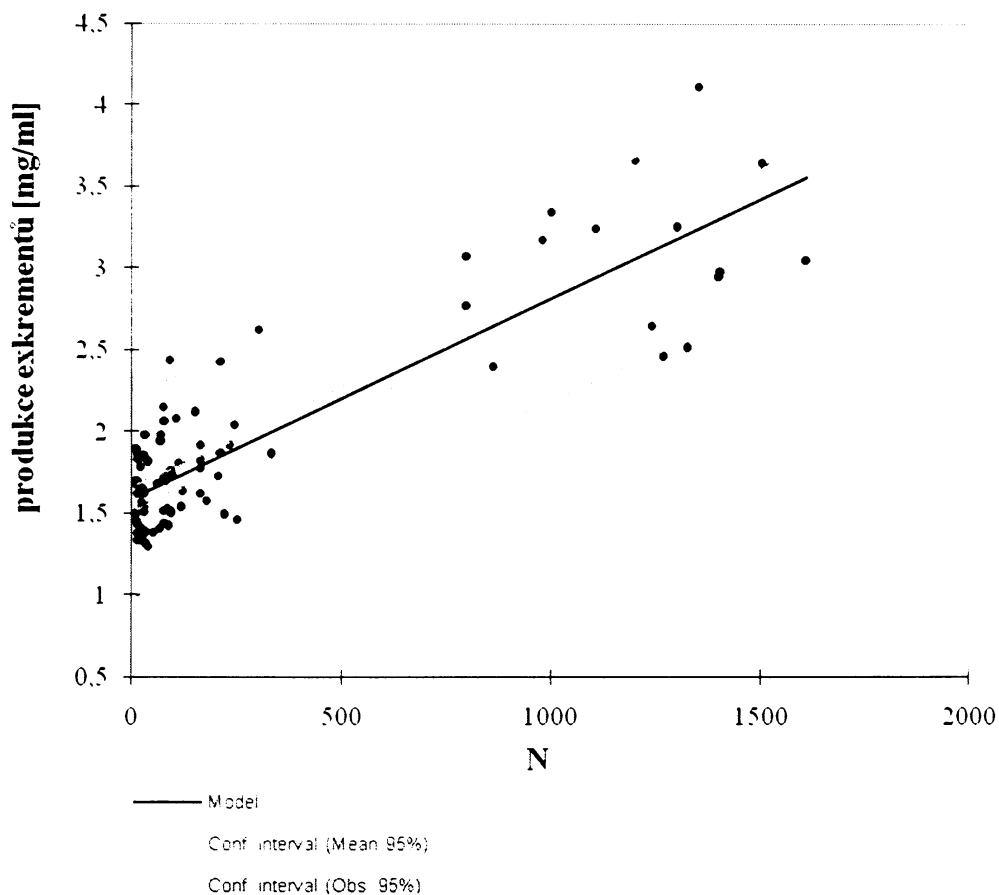
Pomocí lineární regrese byla stanovena závislost produkce exkrementů (zjišťovaná pomocí testu s anti-TyrPut K61) na velikosti populace (Obr. 16). Lineárně regresní model byl signifikantní ( $F_{(1,86)}=275$ ,  $p<0.001$ ,  $R^2=0.762$ ), stejně tak jako parametry regresní přímky (Tab. 8).

**Tabulka 8: Parametry lineárně regresního modelu produkce exkrementů v závislosti na velikosti populace roztoče *T. putrescentiae*. Stanoveno pomocí testu s anti TyrPut K61.**

| Source    | Value | Standard error | t      | Pr >  t  | Lower bound (95%) | Upper bound (95%) |
|-----------|-------|----------------|--------|----------|-------------------|-------------------|
| Intercept | 1.593 | 0.039          | 40.819 | < 0.0001 | 1.515             | 1.670             |
| N         | 0.001 | 0.000          | 16.601 | < 0.0001 | 0.001             | 0.001             |

Pro vymírající populaci byl lineárně regresní model vysvětlující vliv teplotního režimu, vlhkosti obilí a velikosti populace na produkci exkrementů pomocí anti-TyrPut K61 signifikantní ( $F_{(7,72)}= 5$ ,  $p<0.001$ ,  $R^2=0.34$ ), avšak nebyl prokázán signifikantní vliv jednotlivých faktorů ani jejich interakcí (Tab. 9).

Obrázek 16: Závislost produkce exkrementů zjišťované pomocí testu s anti TyrPut K61 na velikosti populace (N).  $R^2=0.762$ .



Tabulka 9: Vliv teplotního režimu, vlhkosti obilí a velikosti populace na produkci exkrementů vysvětlený pomocí anti-TyrPut K61 pro vymírající populace. N-(počet roztočů); T(teplota); m.c.(obsah vody v obilí); \* (interakce proměnných).

| Source   | DF | Sum of squares | Mean squares | F     | Pr > F |
|----------|----|----------------|--------------|-------|--------|
| N        | 1  | 0.002          | 0.002        | 0.152 | 0.697  |
| T        | 1  | 0.002          | 0.002        | 0.204 | 0.652  |
| m.c.     | 1  | 0.019          | 0.019        | 1.599 | 0.210  |
| N*T      | 1  | 0.006          | 0.006        | 0.507 | 0.479  |
| N*m.c.   | 1  | 0.000          | 0.000        | 0.028 | 0.868  |
| T*m.c.   | 1  | 0.000          | 0.000        | 0.013 | 0.910  |
| N*T*m.c. | 1  | 0.012          | 0.012        | 0.998 | 0.321  |

Lineárně regresní model vysvětlující vliv teplotního režimu, vlhkosti obilí a velikosti populace na produkci exkrementů pomocí komerční Pab anti-Tyr p 2 byl signifikantní ( $F_{(6,161)}= 12$ ,  $p<0.001$ ,  $R^2=0.32$ ). Byl prokázán signifikantní vliv jednotlivých faktorů a jejich interakcí (Tab. 10).

**Tabulka 10: Vliv teplotního režimu, vlhkosti obilí, a velikosti populace na produkci exkrementů vysvětlený pomocí komerční Pab anti – Tyr p 2. N-(počet roztočů); T(teplota); m.c.(obsah vody v obilí); \* (interakce proměnných).**

| Source | DF | Sum of squares | Mean squares | F      | Pr > F   |
|--------|----|----------------|--------------|--------|----------|
| N      | 1  | 7.127          | 7.127        | 7.968  | 0.005    |
| T      | 1  | 31.317         | 31.317       | 35.011 | < 0.0001 |
| m.c.   | 1  | 10.083         | 10.083       | 11.273 | 0.001    |
| N*T    | 1  | 1.541          | 1.541        | 1.723  | 0.191    |
| N*m.c. | 1  | 7.089          | 7.089        | 7.925  | 0.005    |
| T*m.c. | 1  | 39.667         | 39.667       | 44.347 | < 0.0001 |

Avšak nepodařilo se prokázat pomocí lineární regrese vztah mezi produkcí exkrementů a velikostí populace. Lineárně regresní model nebyl signifikantní ( $F_{(1,166)} = 0.98$ ,  $p = 0,66$ ,  $R^2 = 0.001$ ).

## 5 Diskuze

### 5.1 Použití Pabs anti-AcaSir a anti-TyrPut v komerčních kitech

Hlavním cílem této práce bylo připravit a optimalizovat použití polyklonálních protilátek pro detekci roztočů *A. siro* a *T. putrescentiae*. Pro každý z modelových druhů byly připraveny dvě polyklonální protilátky, které byly hodnoceny jako vysoce citlivé a schopné detekovat skladištní roztoče. Podobně citlivé protilátky se používají v komerčních kitech na detekci prachových roztočů (Mistrello, 1998; Chapman, 2001; [www.inbio.com](http://www.inbio.com)). Spektrum protilátek proti prachovým roztočům používaných pro komerční účely je již v současné době široké ([www.inbio.com](http://www.inbio.com); [www.abcam.com](http://www.abcam.com); [www.genetex.com](http://www.genetex.com); <http://www.good-biotech.com>; [www.novusbio.com](http://www.novusbio.com)), zatímco na skladištní roztoče není žádný spolehlivý kit ještě na trhu, přestože v posledních letech byly vyvinuty protilátky již proti několika druhům skladištních roztočů, konkrétně proti proteinům z roztočů *Lepidoglyphus destructor* (Harfast, 1996), *Glycyphaus domesticus*, *Tyrophagus longior* (Dunn, 2008) a dokonce i na stejné modelové druhy *A. siro* a *T. putrescentiae* (Dunn, 2003). Většinou se jedná o protilátky monoklonální. Jejich výhodou je téměř 100% specifická, ale na druhou stranu jsou cílené pouze na jeden epitop jednoho konkrétního proteinu ze všech možných specifických proteinů z těl roztočů. Polyklonální protilátky zabírají širokou škálu proteinů z daného druhu roztoče a proto jsou ideální pro rychlou detekci infestace potravin různými proteiny roztoče jednoho druhu. Protilátky připravené při řešení této diplomové práce jsou svými vlastnostmi velmi vhodné pro použití v komerčních kitech pro detekci skladištních roztočů.

Dunn et al. (2008) také vyvinuli polyklonální protilátky schopné detekce stejných modelových druhů, ale jejich protilátky jsou podle výsledků testů zaměřeny na jiné spektrum proteinů. ELISA testy s jejich protilátkami prokázaly citlivost i vůči vajíčkům na rozdíl od námi připravených protilátek. Dunn et al. (2003) ve své práci prokázali, že epitopy proteinů na které se protilátka váže, jsou stabilní během celého životního cyklu druhu *A. siro*. Vzhledem k tomu, že námi vyvinutý test detekuje jak metabolicky aktivní životní stádia (dospělce a juvenilní stádia), tak SGME, ale je

negativní pro vajíčka, lze předpokládat, že epitopy, na které se váží námi připravené protilátky, se nacházejí především na trávicích enzimech modelových druhů roztočů. To ostatně potvrzuje i níže uvedené hodnocení testu měření dynamiky produkce exkrementů. Celkově byla potvrzena použitelnost imunotestu PTA-ELISA v detekci infestace roztoči.

### **5.1.1 Charakteristika Pabs anti-*A.siro*K53 a anti-*A.siro*K54**

Proti druhu *A. siro* byly připraveny dvě protilátky s pracovním označením anti-AcaSir K53 a anti-AcaSir K54. Detekční limity stanovené technikou PTA-ELISA s použitím uvedených Pabs byly shodné. Obě Pabs měly na proteiny z těl roztočů a jejich exkrementů v podstatě stejnou citlivost. Ale citlivost testu vůči čistým exkrementům a SGME byla vyšší než vůči jedincům. Protože trávicí enzymy se v exkrementech koncentrují (Tovey et al., 1981; Hage-Hamsten-van, 1998), potvrzuje tento výsledek domněnku, že anti-AcaSir se váže především na epitopy trávicích enzymů.

Dále byla sledována specifická připravených Pabs anti-AcaSir K53 a K54. Protilátka anti-AcaSir K53 byla hodnocena jako specifická vůči rodu *Acarus* s křížovými reakcemi vůči ostatním testovaným živočišným druhům vyskytujícími se ve skladovaných potravinách do 13%. Tyto nízké křížové reakce umožňují spolehlivou kvantifikaci cílových antigenů z *A. siro* (Fremy a Usleber, 2003). Křížové reakce s *A. gracilis* jsou dle nových taxonomických metod, založených na molekulární biologii, hodnoceny méně závažně, neboť bylo zjištěno, že existuje velká podobnost uvnitř komplexu *A.siro* a *A.gracilis* (Webster et al., 2004). Druhá Pab anti-AcaSir K54 se jevila méně specificky. Vykazovala křížové reakce nad 13% i k druhům roztočů *Carpoglyphus lactis*, *Tyrobrys lini*, *Tyrophagus spp.* I přesto, že citlivost obou připravených protilátek byla v zásadě stejná, díky vyšší specifčnosti byla pro další využití zvolena pouze Pab anti-AcaSir K53.

### **5.1.2 Charakteristika Pabs Anti-*Tyr-put* K61**

Proti druhému modelovému druhu, *Tyrophagus putrescentiae* byly připraveny dvě Pabs anti-TyrPut K60 a anti-TyrPut K61. Při použití v testu PTA-ELISA vykazovaly obě Pabs vysokou citlivost, ale optimální pracovní koncentrace anti-TyrPut K61 pro rutinní použití byla nižší (0.1 – 1 µg imunoglobulinu/ml) než optimální pracovní koncentrace anti-TyrPut K60 (0.5-1 µg imunoglobulinu/ml), proto pro další měření byla vybrána jen Pab anti-TyrPut K61. Při aplikaci v testu



ELISA k detekci jedinců a exkrementů bylo opět prokázáno, že i tato protilátka se váže především na epitopy trávicích enzymů. Důkazem byl detekční limit testu při detekci exkrementů, který odpovídal produkci exkrementů méně jak jednoho roztoče do ml extrakčního pufru (4 µg/ml). Použitím testu pro detekci jedinců se podařilo dosáhnout pouze limitu 4-12 roztočů na ml extrakčního pufru. Citlivost testu závisela na spolehlivosti homogenizace, čili spolehlivosti uvolnění antigenů do homogenizačního pufru. Ale i v případě stoprocentní homogenizace, nedosahoval test pro detekci jedinců srovnatelné citlivosti vůči exkrementům. Získaný detekční limit pro určení počtu jedinců ze vzorku koresponduje s detekčním limitem PTA-ELISA s použitím Pabs proti *A. siro* (3 jedinci/ml).

Při testování specifičnosti Pab anti-TyrPut K61 byla zjištěna silná křížová reaktivita k roztočům z čeledi Acaridae, Carpoglyphidae a Glycyphagidae (tzn. k druhům *Aleuroglyphus ovatus*, *Acarus siro*, *A. gracilis*, *Carpoglyphus lactis*, *Lepidoglyphus destructor* a *Tyrophagus brevicrinatus*). Žádná křížová reakce nebyla naměřena k produktům skladištního hmyzu, k chovné dietě (droždí a pšeničná dieta) a k extraktům z pšeničných obilek. Křížové reakce k druhu *T. brevicrinatus* mohou být způsobeny tím, že se nejedná o samostatný druh, nýbrž kulturu roztoče *T. putrescentiae* (Klimov, pers. com.). Přesto křížové reakce vůči ostatním druhům roztočů indikují na možnost použití této protilátky v detekci širokého spektra roztočů. Dalším krokem může být kombinace více připravených protilátek (Křížková-Kudlíková et al., 2007b), v případě roztočů v kombinaci s předešlými připravenými protilátkami (Tsay et al., 2002; Dunn et al., 2002, 2003). Obdobně byla takto aplikována protilátka proti svalovému myozinu hmyzu Quinn et al. (1992), která se v testu ELISA využívá k obecné detekci kontaminace skladovaných potravin hmyzem (Atui et al., 2003a, 2003b).

Připravené Pabs anti-AcaSir a anti-TyrPut vykazují v testu vyšší citlivost na exkrementy než na jedince. V porovnání s účinností extrakce resp. detekce jedinců s konvenčními metodami jako je extrakce na Tullgren-Berlese extraktoru (účinnost 70%) nebo prosev (účinnost 86%) je použití PTA-ELISA testu méně vhodné (Křížková-Kudlíková et al., 2007a). Ovšem zjištění exkrementů ve vzorku a tedy i zjištění historie kontaminace vzorku je možné pouze nekonvenčními metodami (Křížková-Kudlíková et al., 2007b). Pro tyto účely je test PTA-ELISA s Pabs anti-AcaSir a anti-TyrPut velmi spolehlivý.

## **5.2 Aplikace PABs anti-TyrPut K61 a komerční anti-Tyrp2 při sledování dynamiky produkce alergenů (exkrementů) u vymírajících a rostoucích populací roztoče *T. putrescentiae***

Druhým cílem této práce bylo pomocí testu s Pab anti-TyrPut K61 zjistit dynamiku produkce exkrementů resp. alergenů, druhu *T. putrescentiae* v 21 teplotních režimech. Výsledky měření ukázaly, že dynamika produkce exkrementů odpovídá dynamice růstu populace v rozmezí optimálních hodnot pro rozmnožování druhu *T. putrescentiae* (Aspaly et al., 2007). Roztoči patří mezi živočichy, jejichž teplota těla je závislá na teplotě okolí a tedy i jejich metabolická aktivita je výrazně ovlivněna abiotickými podmínkami (Schowalter, 2006). Především teplotou, relativní vlhkostí vzduchu a s tím související vlhkostí substrátu ve kterém se vyskytují (Sinha, 1990). Udržování teploty a vlhkosti, nevyhovující pro přežití roztočů, je jedním z hlavních mechanismů ochrany zásob (Fields, 1992; Arlian et al., 2001). Obecně se uvádí, že roztoči nepřežijí v substrátu o obsahu vlhkosti nižším pod 13% m.c. (Wilkin, 1984). Výsledky našeho testu potvrzují že, že vlhkost substrátu a nízká teplota (pod 10°C) jsou limitujícími faktory pro rozmnožování a samotné přežití roztočů, ale také, že množství exkrementů je dáno vstupní velikostí populace, tzn. dojde-li k infestaci potraviny ještě před snížením teploty a vlhkosti substrátu, následné snížení teploty a vlhkosti bude mít vliv pouze na eliminaci živých roztočů v potravinách, nikoliv na eliminaci alergenů. To vysvětluje, proč v případě podmínek pod optimem roztočů, nekorespondovala produkce exkrementů s aktuálním počtem roztočů. Produkce exkrementů neodpovídala aktuálnímu počtu roztočů ani v případě teplot nad optimem roztočů. Pravděpodobným důvodem je degradace alergenů při vysokých teplotách.

Zpracování dat lineární regrese potvrdilo závislost produkce exkrementů na změně teploty, počtu roztočů a vlhkosti substrátu stejně jako ve studii provedené Danielsen et al. 2003. Měření dynamiky produkce exkrementů do obilí ukázalo, že nejvyšší produkce byla při obsahu vlhkosti v obilí od 16,8 % a teplotním rozpětí 25-30°C. Průběh produkce exkrementů druhu *T. putrescentiae* do obilí koresponduje s průběhem produkce alergenu Lep d 2 zjištěný Danielsen et al. (2003).

Logicky lze očekávat, že množství exkrementů vyprodukované jedincem za den odpovídá množství zkonsumované potravy. Několik studií uvádí výpočet

spotřeby potravy vyjádřený jako váhový úbytek diety roztoče. Žďárková a Reška (1967) stanovili průměrnou hmotnost zkonzumované stravy u exponenciálně rostoucí populace *T. putrescentiae* 6 $\mu$ g a u *A. siro* (Schrank) 12 $\mu$ g na den diety roztočů. Tyto hodnoty jsou v souladu s výsledky získanými Szlendakem a Kraszpulskim (1991), kteří uvádějí spotřebu žitných obilí 126  $\mu$ g na 20 dnů u dospělce *A. siro*. V případě druhu *T. putrescentiae* lze tedy předpokládat, že jedinec může za jeden den zpracovat a vyprodukovat až zmíněných 6 $\mu$ g exkrementů. Známe-li dobu trvání aktuální infestace, můžeme na základě těchto údajů, podle měření zjištěného množství exkrementů, přibližně odhadnout velikost populace roztočů na testovaný vzorek.

Pro ověření úspěšnosti testu s použitím anti-TyrPut K61 pro detekci exkrementů respektive alergenů druhu *T. putrescentiae* byly vzorky testovány zároveň i testem s komerční Pab anti-Tyr p 2, připravené přímo proti alergenu Tyr p 2, jehož výskyt se předpokládá v exkrementech i v těle roztočů (Errikson et al., 1998). Kalibrace Pab anti-Tyr p 2 na čisté exkrementy prokázala oproti námi připravené Pab anti-TyrPut K61 (4  $\mu$ g/ml při pracovní koncentraci Pab 0,1 $\mu$ g/ml) nižší citlivost Pab anti-Tyr p 2 vůči exkrementům (7  $\mu$ g/ml při pracovní koncentraci Pab 1 $\mu$ g/ml). Navíc se pomocí testu s anti-Tyr p 2 nepodařilo prokázat souvislost mezi počtem aktuálním počtem roztočů ve vzorku a zjištěnou produkcí exkrementů do vzorku. Důvodem byla pravděpodobně opět rychlá degradace alergenu Tyr p 2 v nastavených podmínkách.

### 5.2.1 Využití Pabs anti-AcaSir a anti-TyrPut

Výsledky této práce potvrzují úspěšnost použití imunochemických metod v detekci kontaminace skladovaných potravin skladištními škůdci (Rajendran, 2007). Použitím námi připravené polyklonální protilátky anti-AcaSir v testu ELISA lze dosáhnout velmi přesného stanovení kontaminace skladovaných potravin druhem *A. siro*, ještě před namnožením tohoto škůdce. Použitím druhé vyvinuté protilátky anti-TyrPut v testu ELISA lze určit již nízký stupeň kontaminace potravin druhu skladištních roztočů z čeledi Acaridae, Carpoglyphydea a Glycyphagidae. Navíc pomocí obou testů lze na základě detekce exkrementů určit historii kontaminace vzorku zmíněnými roztoči, tedy určit kontaminaci potravin nebezpečnými alergeny a tím zabránit, aby se takto napadené potraviny dostaly ke spotřebiteli, u kterého by mohly vyvolat závažné zdravotní komplikace. Druhá část práce potvrzuje hypotézu, že

produkce exkrementů respektive alergenů druhu roztoče *T. putrescentiae* je závislá na teplotě, relativní vlhkosti vzduchu a době kontaminace vzorku. Tyto informace společně s efektivním využitím aplikace imunochemických metod mohou být použity v rámci lepší organizace zlepšení kvality a zdravotní nezávadnosti zásob pro spotřebitele.

## 6 Závěr

- Byly připraveny 2 vysoce citlivé polyklonální protilátky proti druhům *A. siro* a *T. putrescentiae*.
- Obě Pabs se podařilo optimalizovat pro aplikaci v ELISA testu pro detekci jedinců a exkrementů skladištních roztočů. Ve všech případech testování byl zjištěn velmi nízký detekční limit testů, ale u obou testů se potvrdila vyšší citlivost na exkrementy roztočů než na jedince.
- Pro detekci druhu *A. siro* byla připravena Pab anti-AcaSir. Ta se při použití v testu ELISA ukázala jako velmi citlivá a vysoce specifická. Při pracovní koncentraci 1 µg Pab/ml bylo testem možno zjistit již 3 jedince v 1 ml extrakčního pufru a 1 µg čistých exkrementů /ml pufru, což odpovídá produkci exkrementů méně jak 1 roztoče. Křížové reakce k ostatním skladištním škůdcům se nevyskytly anebo byly velmi nízké.
- Pro detekci druhu *T. putrescentiae* byla připravena Pab anti TyrPut, která byla hodnocena také jako vysoce citlivá, resp. citlivější než Pab anti-AcaSir. Už při pracovní koncentraci 0,1 µg /ml byl test citlivý na 3 jedince v 1 ml extrakčního pufru a množství exkrementů 0,4 µg/ml pufru. Specifičnost anti-TyrPut ale byla nižší než u anti-AcaSir. Křížové reakce se objevily i na ostatní druhy skladištních roztočů čeledí Acaridae, Carpoglyphydea a Glycyphagidae. To nabízí možnost využít Pab anti-TyrPut k detekci širokého spektra skladištních roztočů.
- Díky citlivosti na proteiny v exkrementech roztočů nabízejí obě Pabs anti AcaSir a anti TyrPut snadnou a rychlou cestu, jak zjistit aktuální, ale i předešlou infestaci skladovaných potravin roztoči daných druhů.
- Potvrdila se hypotéza, že polyklonálními protilátkami připravenými proti proteinům z těl roztoče, je možno měřit dynamiku produkce exkrementů resp. alergenů. Zároveň bylo zjištěno, že produkce exkrementů resp. alergenů roztočů do okolí, je proces závislý na teplotě, počtu roztočů a relativní vlhkosti substrátu.

- U druhu *Tyropahgus putrescentiae* byly zjištěny optimální podmínky pro maximální produkci alergenů v teplotním rozmezí 25 až 30°C při vlhkosti substrátu nad 16,8 %. Naopak kombinace vlhkosti substrátu pod 14% a teplota pod 10°C a nad 35°C se ukázala pro aktivitu metabolismu roztočů jako limitní.

## 7 Literatura:

- Arlian L.G., Neal J.S., Morgan M.S., Vyszynski-Moher D.L., Rapp C.M., Alexander A.K. (2001): Reducing relative humidity is a practical way to control dust mites and their allergens in homes in temperate climates. *J.Allergy Clin. Immunol.*, Jan,107(1):99-104
- Arlian L.G. (2002): Arthropod allergens and human health. *Annu Rev Entomol*, 47: 395-434.
- Aspaly G., Stejskal V., Pekár S., Hubert J. (2007): Temperature-dependent population growth of three species of stored product mites (Acari: Acaridida). *Exp Appl Acarol*, 42(1):37-46.
- Atui, M.B., Lazzari, S.M.N., Lazzari, F.A., Flinn, P.W. (2003a): Comparison of ELISA and fragment count methods for detection of insects in wheat flour. – Advances in stored product protection. Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection. York, UK, 22-26 July 2002: 135-138.
- Atui, M.B., Flinn, P.W., Lazzari, F.A., Lazzari, S.M.N. (2003b): Degradation of insect myosin affects reliability of ELISA test for internal insect infestation of wheat. –Advances in stored product protection. Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection. York, UK, 22-26 July 2002: 263-266.
- Bartoš, J., Verner, P. (1979): Ochrana proti skladištním škůdcům a chorobám. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Bowman C.E., Childs M. (1982): Polysaccharides in astigmatid mites (Arthropoda: Acari). *Comp Biochem Physiol*, 72B:551–557.
- Bronswijk-van J.E.M.H., Sinha R.N. (1971):Pyroglyphid mites (Acari) and house dust allergy. *J Allergy*, 47: 31-51.
- Cunnington A.M. (1965): Physical Limits for Complete Development of the Grain Mite, *Acarus siro* L. (Acarina, Acaridae), in Relation to Its World Distribution. *J Appl Ecol*, 2:295-306
- Danielsen C., Hansen L.S., Nachman G., Herling C. (2004): The influence of temperature and relative humidity on the development of *Lepidoglyphus destructor* (Acari: Glycyphagidae) and its production of allergens: a laboratory experiment. *Exp Appl Acarol*, 32(3):151-170.

- Dunn J.A., Danks C., Thind B.B., Banks J.N. and Chambers J. (2002b): Development of a rapid immunoassay for detection of storage mite pests in cereals. Advances in stored product protection. – In: Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection, 22-26.6. 2002, UK, p. 179-182.
- Dunn J.A., Thind B.B., Banks J. and Chambers J. (2002a): The Development of ELISA for the Detection of Storage Mites in Grain. - Food Agr Immunol, 14: 323-327.
- Dunn J.A., Thind B.B., Danks C., Chambers J. (2008): Rapid method for the detection of storage mites in cereals: feasibility of an ELISA based approach. Bull Entomol Res, Apr; 98(2):207-13
- Edston E., van Hage-Hamsten M. (2003): Death in anaphylaxis in a man with house dust mite allergy. Int J Legal Med, Oct;117(5):299-301.
- Erbán T. (2007): Skladištní a prachoví roztoči jsou významní škůdci v zemědělství. Úroda, 55(10): 25-27
- Erbán T., Hubert J. (2008): Digestive function of lysozyme in synanthropic acaridid mites enables utilization of bacteria as a food source. Exp Appl Acarol, 44: 199-212
- Eriksson T.L.J., Johansson E., Whitley P., Schmidt M., Elsayed S., van Hage-Hamsten M., (1998): Cloning and characterisation of a group II allergen from the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. Eur J Biochem, 251 (1-2) , 443–447
- Fernandez-Caldas E., Lockey R.F. (2004): *Blomia tropicalis*, a mite whose time has come. Allergy, 59(11):1161-1164.
- Ferreira F., Hawranek T., Gruber P., Wopfner N., Mari A. (2004): Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. Allergy, 59(3):243-267
- Fields P.G. (1992): The control of stored-product insects and mites with extreme temperatures. J. Stored Prod. Res, 28(2):89-I 18
- Härfast B., Johansson E., Johansson S. G. and Hage-Hamsten M. (1996): ELISA method for detection of mite allergens in barn dust: comparison with mite counts. Allergy, 51: 257-261.
- Hořejší, V., a Bartůňková, J. (2002): Základy imunologie; Triton, Praha, 260str.
- Hubert, J., Stejskal V., Kubátová A., Munzbergová Z., Váňová M. and Žďárková E. (2003): Mites as selective fungal carriers in stored grain habitats.- Exp Appl Acarol, 29: 69-87.



- Hughes A.M. (1976): The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Technical Bulletin, 9: 1-400.
- Chambers J. (2002): How to decide whether the presence of storage mites in food and feedstuffs actually matters. In: Creland PE, Armitage DM., Bell CH., Cogan PM., Higley E. (eds) Proceedings: "Advances in stored Product Protection", 8th International Working Conference on Stored Product Protection, 428-434.
- Chapman M.D., Heymann P.W., Wilkins S.R., Brown M.J., Platts-Mills T.A. (1987): Monoclonal immunoassays for major dust mite (*Dermatophagoides*) allergens, Der p I and Der f I, and quantitative analysis of the allergen content of mite and house dust extracts. J.Allergy Clin. Immunol., Aug;80(2):184-94
- Jeong K.Y., Kim W.K., Lee J.S., Lee J., Lee I.Y., Kim K.E., Park J.W., Hong C.S., Ree H.I., Yong T.S. (2005): Immunoglobulin E Reactivity of Recombinant Allergen Tyr p 13 from *Tyrophagus putrescentiae* Homologous to Fatty Acid Binding Protein. Clin Diagn Lab Immunol, 12(5):581-585
- Jeong KY, Lee H, Lee JS, Lee J, Lee IY, Ree HI, Hong CS, Yong TS (2007): Molecular Cloning and the Allergenic Characterization of Tropomyosin from *Tyrophagus putrescentiae*. Protein Pept Lett, 14(5):431-436
- Kethley J.B., Norton R.A., Bonamo P.M., Shear W.A. (1979): A terrestrial alicorhagiid mite (Acari: Acariformes) from the Devonian of New York. Micropaleontology, 35: 367-373
- Kort H.S., Schober G., Koren L.G., Scharringa J. (1997): Mould-devouring mites differ in guanine excretion from dust-eating Acari, a possible error source in mite allergen exposure studies. Clin Exp Allergy, 27(8):921-925.
- Křížková-Kudlíková I., Stejskal V., Hubert J., (2007a): Comparison of detection methods for *Acarus siro* (Acari: Acaridida: Acarididae) contamination in grain. J Econ Entomol, 100(6): 1928-1937
- Křížková-Kudlíková I., Hubert J. (2007b): The application of immunochemical methods in detection and traceability of arthropod contaminants in stored food , IOBC/wprs Bulletin 30(2): 117-126
- Luczynska Ch.M., Arruda L.K., Platts-Mills T.A.E., Miller J.D., Lopez M., Chapman M.D., (1989): A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides spp.* allergens, Der p I and Der f I. J Immunol Meth, 118: 227-235

- Matsumoto T., Satoh A., (2004): The occurrence of mite-containing wheat flour. *Pediatr Allergy Immunol*, 15(5):469-471.
- Musken H., Franz J.T., Wahl R., Paap A., Cromwell O., Masuch G., Bergmann, K.C. (2003): Sensitization to different mite species in German farmers: in vitro analyses. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 13(1):26-35.
- O'Connor B.M. (1979): Evolutionary origins of astigmatid mites inhabiting stored products. *Rec. Adv. Acarol.*, 1:273–278
- Olsson S., van Hage-Hamsten M. (2000): Allergens from house dust and storage mites: similarities and differences, with emphasis on the storage mite *Lepidoglyphus destructor*.- *Clin Exp Allergy*, 30: 912-919.
- Pernas M., Sanchez-Ramos I., Sanchez-Monge R., Lombardero M., Arteaga C., Castanera P., Salcedo G. (2000): Der p 1 and Der f 1, the highly related and major allergens from house dust mites, are differentially affected by a plant cystatin. *Clin Exp Allergy*, 30(7): 972-978
- Quinn F.A., Burkholder W., Barrie-Kitto G. (1992): Immunological technique for measuring insect contamination of grain.- *J Econ Entomol*, 85: 1463-1470.
- Rajendran S. (1999): Detection of insect infestation in stored food commodities 2007, *J Food Sci Tech*, Vol. 36, no4, pp. 283-300 (3 p.3/4)
- Rosický B., Černý V., Daniel M., Dusábek F., Palička P., Samšišák K. (1979): Roztoči a klíšťata škodící zdraví člověka. *Academia, edice Cesty k věděni, Praha*
- Sanchez-Borges M., Suarez-Chacon R., Capriles-Hulett A., Caballero-Fonseca F. (2005): An update on oral anaphylaxis from mite ingestion. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 94(2):216- 220.
- Seberová E. (2004): Alergická rýma. *Interní Med.*, 3: 130-135
- Sidenius K.E., Hallas T.E., Stenderup J., Poulsen L.K., Mosbech H. (2002): Decay of house-dust mite allergen Der f 1 at indoor climatic conditions. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 89(1):34-37.
- Siepel H., de Ruitter-Dijkman E.M. (1993): Feeding guilds of oribatid mites based on their carbohydrase activities. *Soil Biol Biochem*, 25:1491-1497
- Sinha, R. N. and Kawamoto, H. (1990): Dynamics and distribution patterns of acarine populations in stored-oat ecosystems. *Res. Popul. Ecol.*, 32, 33-46.
- Smrž J., Jungova E., (1989): The ecology of a field population of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridida). *Pedobiologia*, 33: 183-192

- Smrz J., Catska V. (1987): Food selection of the field population of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari, Acarida). *J Appl Entomol*, 104:329–335
- Solarz K. (2000): Some species of mites (Acari) from house dust in Upper Silesia (Poland). *Acta Zoolog Cracov*, 43: 241-259.
- Solarz K. (2001): Risk of exposure to house dust pyroglyphid mites in Poland. *Ann Agr Environ Med*, 8: 11-24.
- Solarz K., Szilman P., Szilman E. (1997): Preliminary study on the occurrence and species composition of astigmatic mites (Acari: Astigmata) in samples of dust, debris and residues from farming environments in Poland. *Ann Agr Environ Med*, 4: 249-253.
- Solarz K., Senczuk L., (2003): Allergenic acarofauna of synanthropic outdoor environments in a densely populated urban area in Katowice, upper Silesia, Poland. *Int J Acarol*, (Vol. 29) (No. 4): 403-420
- \*<sup>1</sup>Solarz K.(2003): Pyroglyphidae (Acari:Astigmata) Polski: Fauna, biologia, ekologia i epidemiologia. Ryzyko ekspozycji na roztocze kurzu domowego z rodziny pyroglyphidae w polsce. *Slaska Academia Medyczna w Katowicach*, 243 str.
- Solomon M.E. (1945): Tyroglyphid mites in stored products Methods for the study of population density. *Ann Appl Biol*, 32 (1): 71–75
- Stejskal, V., Hubert, J., Kučerová, Z., Munzbergová, Z., Lukáš, J., Žďárková, E., (2003):. The influence of the type of storage on pest infestation of stored grain in the Czech Republic. *Plant Soil Environ*, 49: 49-54.
- Stewart G.A., Hage-Hamsten-van M., Krska K, Thopson P.J., Olsson S. (1998): An enzymatic analysis of the storage mite *Lepidoglyphus destructor*. *Comp Biochem Physiol*, 119B:341–347.
- Stewart G.A., Robinson C. (2003): The immunobiology of allergenic peptidases. *Clin Exp Allergy*, 33(1):3-6.
- Stewart G.A., Thopson P.J (1996): The biochemistry of common aeroallergens. *Clin Exp Allerg* 1996, 26(9):1020–1044.
- Thind B. B. (2000): Determination of low levels of mite and insect contaminants in food and feedstuffs by a modified flotation method. *Journal of AOAC International*, 83(1): 113-119.

---

<sup>1</sup> sekundární citace

- Thind B.B., Dunn J.A. (2002): A laboratory evaluation of a regulated airflow through wheat at four combinations of temperature and humidity on the productivity of three species of stored product mites. *Exp Appl Acarol*, 27(1-2):89-102
- Thomas B., Heap P., Carswell F. (1991): Ultrastructural localization of the allergen Der p I in the gut of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 94(1-4): 365-367.
- Thomas W.R., Smith W.A., Hales B.J., Mills K.L., O'Brien R.M. (2002): Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 129(1):1-18
- Tovey E.R., Chapman M.D., Plat-Mills T.A. (1981): Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature (London)*, 289: 592-593.
- Tovey E.R., Baldo B.A. (1990): Localization of antigens and allergens in thin sections of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J Med Entomol*, 27(3):368-376.
- Tsay, A., Williams, L., Mitchell, E.B., Chapman, M.D. (2002): A rapid test for detection of mite allergens in homes. *Clin Exp Allergy*, 32: 1596-1601
- van Bronswijk J.E., Sinha R.N. (1971): Pyroglyphid mites (Acari) and house dust allergy. *J Allergy*, Jan 47(1):31-52.
- van Hage-Hamsten M., Johansson S.G., Höglund S, Tüll P, Wirén A, Zetterstrom O. (1985): Storage mite allergy is common in a farming population. *Clin Allergy*, Nov 15(6):555-64.
- van Hage-Hamsten M., Johansson E., (1998): Clinical and immunologic aspects of storage mite allergy. *Allergy*, 53(Suppl.):49-53.
- Walter D.E., Krantz G., Lindquist E. (1996): Acari. The Mites. Version 13 December 1996. <http://tolweb.org/Acari/2554/1996.12.13> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Webster L.M., Thomas R.H., McCormack G.P. (2004): Molecular systematics of *Acarus siro* s. lat., a complex of stored food pests. *Mol Phylogenet Evol*, 32(3): 817-822.
- Werner P., Kučerová Z., Stejskal V., Ždárková E. (1998): Stored product pests in stored grain in the Czech Republic. Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-product Protection Oct., Beijing, China, Volume 1: 64-68

- White N.D.G., Henderson L.P., Sinha R.N. (1979): Effects of infestations by three stored product mites on fat acidity, seed germination, microflora of stored wheat. *J Econ Entomol*, 72: 763-766
- Willey K.B., Prickett A.J., MacNicoll A.D., Chambers J., Thind B.B. (1998): The contribution of resistance in U.K. stored product pests to control failure and subsequent food contamination. *British Proceeding Crop Protection Council, Pest and Diseases Conference 2, Brighton*, 503-510.
- Wilkin D.R., Stables L.M. (1985): The effects of dusts containing etrimfos, methacrifos or pirimiphos-methyl on mites in the surface layers of stored barley. *Exp Appl Acarol, Issue Vol. 1, N 3*: 203-211
- Yu F.Y., Chi T.F., Liu B.H., Su C.C. (2005): Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ochratoxin A. *J Agr Food Chem*, 53(17): 6947-53.
- Žďárková, E. (1967):. Stored food mites in Czechoslovakia. *Stored Prod. Res.*, Vol.3: 155-175

Internetové zdroje:

[www.allergen.org](http://www.allergen.org)

## 8 Příloha

**Tabulka 11: Hodnoty obsahu vody (m.c.) pšenice při různé relativní vlhkosti vzduchu (RH) a teplotě (T), které byly orientačně použity k vlhčení obilí pro experiment sledování dynamiky produkce exkrementů roztoči. Hodnoty byly získané na základě práce Danielsen et al. (2004).**

| T[°C] | 5        | 10    | 15    | 20    | 25    | 30    | 35    |
|-------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| RH[%] | m.c. [%] |       |       |       |       |       |       |
| 85    | 18,22    | 17,98 | 17,27 | 17,05 | 17    | 16,55 | 15,71 |
| 80    | 16,18    | 16,5  | 15,93 | 14,88 | 14,42 | 13,85 | 12,76 |
| 75    | 15,48    | 15,38 | 13,88 | 13,68 | 13,38 | 12,38 | 12,19 |

**Tabulka 12: Data získaná v rámci experimentu sledování dynamiky produkce exkrementů roztočů v obilí použité ke statistickému zpracování. T (teplota), RH (relativní vlhkost vzduchu), m.c. (obsah vody v obilí), N (počet roztočů), r (vnitřní růstová rychlost), K61 (koncentrace exkrementů naměřená za použití Pab K61), Tyr p 2 (koncentrace exkrementů naměřená za použití komerční Pab Tyr p 2)**

| T[°C] | RH[%] | m.c.[%] | N | K61 [µg/ml] | Tyr p 2 [µg/ml] | r    |
|-------|-------|---------|---|-------------|-----------------|------|
| 4,3   | 75,8  | 15,80   | 0 | 1,94        | 1,72            | xxx  |
| 4,3   | 75,8  | 15,80   | 0 | 1,63        | 1,41            | xxx  |
| 4,3   | 75,8  | 15,80   | 0 | 1,54        | 1,81            | xxx  |
| 4,3   | 75,8  | 15,80   | 1 | 1,56        | 1,04            | 0,00 |
| 4,3   | 75,8  | 15,80   | 2 | 1,72        | 1,43            | 0,00 |
| 4,3   | 75,8  | 15,80   | 2 | 1,54        | 1,87            | 0,00 |
| 4,3   | 75,8  | 15,80   | 2 | 1,48        | 1,55            | 0,00 |
| 4,3   | 75,8  | 15,80   | 3 | 1,55        | 1,80            | 0,00 |
| 4,3   | 86    | 16,20   | 0 | 1,46        | 1,65            | xxx  |
| 4,3   | 86    | 16,20   | 0 | 1,40        | 1,43            | xxx  |
| 4,3   | 86    | 16,20   | 1 | 1,60        | 1,61            | 0,00 |
| 4,3   | 86    | 16,20   | 1 | 1,54        | 1,55            | 0,00 |
| 4,3   | 86    | 16,20   | 1 | 1,44        | 1,05            | 0,00 |
| 4,3   | 86    | 16,20   | 2 | 1,64        | 1,37            | 0,00 |
| 4,3   | 86    | 16,20   | 2 | 1,44        | 1,67            | 0,00 |
| 4,3   | 86    | 16,20   | 3 | 1,57        | 1,86            | 0,00 |
| 4,3   | 94,2  | 17,90   | 0 | 1,43        | 1,02            | xxx  |
| 4,3   | 94,2  | 17,90   | 1 | 1,45        | 2,43            | 0,00 |
| 4,3   | 94,2  | 17,90   | 2 | 1,64        | 1,68            | 0,00 |
| 4,3   | 94,2  | 17,90   | 2 | 1,60        | 1,57            | 0,00 |
| 4,3   | 94,2  | 17,90   | 2 | 1,54        | 1,44            | 0,00 |
| 4,3   | 94,2  | 17,90   | 2 | 1,37        | 1,39            | 0,00 |
| 4,3   | 94,2  | 17,90   | 3 | 1,59        | 1,60            | 0,00 |
| 4,3   | 94,2  | 17,90   | 3 | 1,42        | 1,02            | 0,00 |

| T[°C] | RH[%] | m.c.[%] | N  | K61  | Tyr p 2 | r    |
|-------|-------|---------|----|------|---------|------|
| 9,9   | 76,8  | 15,50   | 1  | 1,45 | 2,48    | 0,00 |
| 9,9   | 76,8  | 15,50   | 2  | 1,50 | 1,03    | 0,00 |
| 9,9   | 76,8  | 15,50   | 4  | 1,84 | 1,97    | 0,00 |
| 9,9   | 76,8  | 15,50   | 4  | 1,36 | 2,16    | 0,00 |
| 9,9   | 76,8  | 15,50   | 4  | 1,32 | 1,55    | 0,00 |
| 9,9   | 76,8  | 15,50   | 5  | 1,36 | 1,37    | 0,00 |
| 9,9   | 76,8  | 15,50   | 6  | 1,46 | 1,46    | 0,00 |
| 9,9   | 76,8  | 15,50   | 7  | 1,61 | 1,77    | 0,00 |
| 9,9   | 89,4  | 16,47   | 1  | 1,61 | 1,97    | 0,00 |
| 9,9   | 89,4  | 16,47   | 1  | 1,43 | 2,53    | 0,00 |
| 9,9   | 89,4  | 16,47   | 2  | 1,42 | 1,09    | 0,00 |
| 9,9   | 89,4  | 16,47   | 2  | 1,36 | 1,74    | 0,00 |
| 9,9   | 89,4  | 16,47   | 4  | 1,41 | 1,36    | 0,00 |
| 9,9   | 89,4  | 16,47   | 5  | 1,63 | 1,46    | 0,00 |
| 9,9   | 89,4  | 16,47   | 7  | 1,72 | 2,81    | 0,00 |
| 9,9   | 89,4  | 16,47   | 7  | 1,61 | 1,73    | 0,00 |
| 9,9   | 92    | 18,10   | 2  | 1,39 | 1,40    | 0,00 |
| 9,9   | 92    | 18,10   | 3  | 1,51 | 1,33    | 0,00 |
| 9,9   | 92    | 18,10   | 3  | 1,36 | 1,09    | 0,00 |
| 9,9   | 92    | 18,10   | 4  | 1,40 | 2,02    | 0,00 |
| 9,9   | 92    | 18,10   | 5  | 1,42 | 1,35    | 0,00 |
| 9,9   | 92    | 18,10   | 9  | 1,41 | 1,03    | 0,00 |
| 9,9   | 92    | 18,10   | 9  | 1,31 | 1,81    | 0,00 |
| 9,9   | 92    | 18,10   | 11 | 1,46 | 1,43    | 0,00 |
| 15,4  | 80,5  | 13,90   | 5  | 1,51 | 1,02    | 0,00 |
| 15,4  | 80,5  | 13,90   | 10 | 1,38 | 3,19    | 0,00 |
| 15,4  | 80,5  | 13,90   | 20 | 1,79 | 2,69    | 0,02 |
| 15,4  | 80,5  | 13,90   | 23 | 1,57 | 3,67    | 0,02 |
| 15,4  | 80,5  | 13,90   | 23 | 1,54 | 2,94    | 0,02 |
| 15,4  | 80,5  | 13,90   | 26 | 1,54 | 4,08    | 0,02 |
| 15,4  | 80,5  | 13,90   | 30 | 1,63 | 2,87    | 0,03 |
| 15,4  | 80,5  | 13,90   | 30 | 1,54 | 3,10    | 0,03 |
| 15,4  | 82,9  | 16,33   | 6  | 1,59 | 3,89    | 0,00 |
| 15,4  | 82,9  | 16,33   | 6  | 1,60 | 3,52    | 0,00 |
| 15,4  | 82,9  | 16,33   | 8  | 1,51 | 3,01    | 0,00 |
| 15,4  | 82,9  | 16,33   | 8  | 1,55 | 2,80    | 0,00 |
| 15,4  | 82,9  | 16,33   | 9  | 1,69 | 2,67    | 0,00 |
| 15,4  | 82,9  | 16,33   | 14 | 1,38 | 1,02    | 0,02 |
| 15,4  | 82,9  | 16,33   | 15 | 1,63 | 3,55    | 0,02 |
| 15,4  | 82,9  | 16,33   | 16 | 1,68 | 3,30    | 0,02 |
| 15,4  | 89,4  | 17,23   | 13 | 1,90 | 4,23    | 0,01 |
| 15,4  | 89,4  | 17,23   | 13 | 1,71 | 3,22    | 0,01 |
| 15,4  | 89,4  | 17,23   | 14 | 1,87 | 1,03    | 0,02 |
| 15,4  | 89,4  | 17,23   | 14 | 1,84 | 1,18    | 0,02 |
| 15,4  | 89,4  | 17,23   | 16 | 1,70 | 2,47    | 0,02 |
| 15,4  | 89,4  | 17,23   | 21 | 1,84 | 2,63    | 0,04 |
| 15,4  | 89,4  | 17,23   | 26 | 1,66 | 4,29    | 0,05 |
| 15,4  | 89,4  | 17,23   | 34 | 1,98 | 1,17    | 0,06 |
| 19,9  | 74,8  | 13,90   | 15 | 1,34 | 1,04    | 0,02 |
| 19,9  | 74,8  | 13,90   | 15 | 1,34 | 2,26    | 0,02 |
| 19,9  | 74,8  | 13,90   | 18 | 1,37 | 1,57    | 0,03 |
| 19,9  | 74,8  | 13,90   | 20 | 1,35 | 2,48    | 0,03 |
| 19,9  | 74,8  | 13,90   | 23 | 1,41 | 2,64    | 0,04 |
| 19,9  | 74,8  | 13,90   | 25 | 1,39 | 1,88    | 0,04 |
| 19,9  | 74,8  | 13,90   | 29 | 1,38 | 1,78    | 0,05 |
| 19,9  | 74,8  | 13,90   | 30 | 1,51 | 1,45    | 0,05 |

| T[°C] | RH[%] | m.c.[%] | N    | K61  | Tyr p 2 | r    |
|-------|-------|---------|------|------|---------|------|
| 19,9  | 79,1  | 14,97   | 51   | 1,39 | 2,88    | 0,08 |
| 19,9  | 79,1  | 14,97   | 65   | 1,41 | 2,12    | 0,09 |
| 19,9  | 79,1  | 14,97   | 75   | 1,52 | 2,71    | 0,10 |
| 19,9  | 79,1  | 14,97   | 79   | 1,44 | 2,06    | 0,10 |
| 19,9  | 79,1  | 14,97   | 84   | 1,53 | 1,02    | 0,10 |
| 19,9  | 79,1  | 14,97   | 87   | 1,42 | 2,22    | 0,10 |
| 19,9  | 79,1  | 14,97   | 92   | 1,50 | 1,69    | 0,11 |
| 19,9  | 79,1  | 14,97   | 93   | 1,52 | 2,44    | 0,11 |
| 19,9  | 84,2  | 16,90   | 117  | 1,54 | 3,73    | 0,12 |
| 19,9  | 84,2  | 16,90   | 162  | 1,83 | 1,02    | 0,13 |
| 19,9  | 84,2  | 16,90   | 163  | 1,62 | 2,78    | 0,13 |
| 19,9  | 84,2  | 16,90   | 205  | 1,74 | 1,03    | 0,14 |
| 19,9  | 84,2  | 16,90   | 212  | 1,87 | 2,50    | 0,15 |
| 19,9  | 84,2  | 16,90   | 220  | 1,49 | 1,80    | 0,15 |
| 19,9  | 84,2  | 16,90   | 250  | 1,46 | 2,47    | 0,15 |
| 19,9  | 84,2  | 16,90   | 330  | 1,86 | 1,51    | 0,17 |
| 25,6  | 74,2  | 13,40   | 4    | 1,35 | 1,02    | 0,00 |
| 25,6  | 74,2  | 13,40   | 8    | 1,49 | 1,44    | 0,00 |
| 25,6  | 74,2  | 13,40   | 9    | 1,34 | 1,38    | 0,00 |
| 25,6  | 74,2  | 13,40   | 14   | 1,43 | 1,53    | 0,02 |
| 25,6  | 74,2  | 13,40   | 15   | 1,38 | 1,36    | 0,02 |
| 25,6  | 74,2  | 13,40   | 34   | 1,39 | 1,46    | 0,06 |
| 25,6  | 74,2  | 13,40   | 34   | 1,32 | 1,53    | 0,06 |
| 25,6  | 74,2  | 13,40   | 39   | 1,30 | 1,52    | 0,06 |
| 25,2  | 79,8  | 14,87   | 94   | 1,77 | 1,20    | 0,11 |
| 25,2  | 79,8  | 14,87   | 95   | 1,74 | 1,42    | 0,11 |
| 25,2  | 79,8  | 14,87   | 110  | 1,81 | 1,30    | 0,11 |
| 25,2  | 79,8  | 14,87   | 119  | 1,65 | 1,03    | 0,12 |
| 25,2  | 79,8  | 14,87   | 162  | 1,92 | 1,30    | 0,13 |
| 25,2  | 79,8  | 14,87   | 162  | 1,78 | 1,42    | 0,13 |
| 25,2  | 79,8  | 14,87   | 177  | 1,58 | 1,30    | 0,14 |
| 25,2  | 79,8  | 14,87   | 231  | 1,92 | 1,22    | 0,15 |
| 25,2  | 85,1  | 16,80   | 800  | 2,77 | 2,42    | 0,21 |
| 25,2  | 85,1  | 16,80   | 861  | 2,40 | 1,81    | 0,21 |
| 25,2  | 85,1  | 16,80   | 1239 | 2,65 | 2,53    | 0,23 |
| 25,2  | 85,1  | 16,80   | 1265 | 2,46 | 2,22    | 0,23 |
| 25,2  | 85,1  | 16,80   | 1324 | 2,52 | 1,93    | 0,23 |
| 25,2  | 85,1  | 16,80   | 1400 | 2,95 | 4,29    | 0,24 |
| 25,2  | 85,1  | 16,80   | 1403 | 2,99 | 2,09    | 0,24 |
| 25,2  | 85,1  | 16,80   | 1608 | 3,05 | 1,19    | 0,24 |
| 29,6  | 73,4  | 12,43   | 0    | 1,30 | 1,20    | xxx  |
| 29,6  | 73,4  | 12,43   | 1    | 1,48 | 1,04    | 0,00 |
| 29,6  | 73,4  | 12,43   | 1    | 1,32 | 1,41    | 0,00 |
| 29,6  | 73,4  | 12,43   | 2    | 1,44 | 1,17    | 0,00 |
| 29,6  | 73,4  | 12,43   | 2    | 1,39 | 1,23    | 0,00 |
| 29,6  | 73,4  | 12,43   | 2    | 1,35 | 1,23    | 0,00 |
| 29,6  | 73,4  | 12,43   | 3    | 1,50 | 1,19    | 0,00 |
| 29,6  | 73,4  | 12,43   | 6    | 1,31 | 1,14    | 0,00 |
| 29,6  | 79,8  | 13,80   | 70   | 1,94 | 1,97    | 0,09 |
| 29,6  | 79,8  | 13,80   | 75   | 2,16 | 2,08    | 0,10 |
| 29,6  | 79,8  | 13,80   | 79   | 1,73 | 1,26    | 0,10 |
| 29,6  | 79,8  | 13,80   | 80   | 1,73 | 1,15    | 0,10 |
| 29,6  | 79,8  | 13,80   | 82   | 1,70 | 1,72    | 0,10 |
| 29,6  | 79,8  | 13,80   | 90   | 2,44 | 1,61    | 0,10 |
| 29,6  | 79,8  | 13,80   | 104  | 2,08 | 1,64    | 0,11 |
| 29,6  | 79,8  | 13,80   | 149  | 2,12 | 2,01    | 0,13 |



| T[°C] | RH[%] | m.c.[%] | N    | K61  | Tyr p 2 | r    |
|-------|-------|---------|------|------|---------|------|
| 29,6  | 89    | 16,50   | 800  | 3,08 | 1,14    | 0,21 |
| 29,6  | 89    | 16,50   | 980  | 3,18 | 1,53    | 0,22 |
| 29,6  | 89    | 16,50   | 1000 | 3,35 | 1,58    | 0,22 |
| 29,6  | 89    | 16,50   | 1105 | 3,25 | 1,19    | 0,22 |
| 29,6  | 89    | 16,50   | 1200 | 3,67 | 1,42    | 0,23 |
| 29,6  | 89    | 16,50   | 1300 | 3,25 | 1,53    | 0,23 |
| 29,6  | 89    | 16,50   | 1350 | 4,12 | 1,69    | 0,23 |
| 29,6  | 89    | 16,50   | 1500 | 3,65 | 1,32    | 0,24 |
| 33,7  | 72,2  | 11,60   | 2    | 1,34 | 1,20    | 0,00 |
| 33,7  | 72,2  | 11,60   | 2    | 1,31 | 1,21    | 0,00 |
| 33,7  | 72,2  | 11,60   | 2    | 1,28 | 1,10    | 0,00 |
| 33,7  | 72,2  | 11,60   | 3    | 1,38 | 1,03    | 0,00 |
| 33,7  | 72,2  | 11,60   | 4    | 1,32 | 1,17    | 0,00 |
| 33,7  | 72,2  | 11,60   | 7    | 1,36 | 1,21    | 0,00 |
| 33,7  | 72,2  | 11,60   | 9    | 1,35 | 1,25    | 0,00 |
| 33,7  | 72,2  | 11,60   | 9    | 1,33 | 1,20    | 0,00 |
| 33,7  | 76    | 12,47   | 0    | 1,39 | 1,23    | xxx  |
| 33,7  | 76    | 12,47   | 3    | 1,38 | 1,15    | 0,00 |
| 33,7  | 76    | 12,47   | 4    | 1,39 | 1,14    | 0,00 |
| 33,7  | 76    | 12,47   | 4    | 1,35 | 1,04    | 0,00 |
| 33,7  | 76    | 12,47   | 6    | 1,45 | 1,21    | 0,00 |
| 33,7  | 76    | 12,47   | 7    | 1,48 | 1,22    | 0,00 |
| 33,7  | 76    | 12,47   | 8    | 1,38 | 1,19    | 0,00 |
| 33,7  | 76    | 12,47   | 13   | 1,50 | 1,12    | 0,01 |
| 33,7  | 83,9  | 16,00   | 31   | 1,85 | 5,64    | 0,05 |
| 33,7  | 83,9  | 16,00   | 39   | 1,82 | 3,65    | 0,06 |
| 33,7  | 83,9  | 16,00   | 64   | 1,69 | 2,80    | 0,09 |
| 33,7  | 83,9  | 16,00   | 69   | 1,99 | 2,79    | 0,09 |
| 33,7  | 83,9  | 16,00   | 79   | 2,07 | 6,19    | 0,10 |
| 33,7  | 83,9  | 16,00   | 212  | 2,44 | 4,76    | 0,15 |
| 33,7  | 83,9  | 16,00   | 243  | 2,05 | 1,75    | 0,15 |
| 33,7  | 83,9  | 16,00   | 300  | 2,63 | 10,20   | 0,16 |

# Characterization of polyclonal antibodies against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae)

IVA KUDLÍKOVÁ, ANDREA KLAUDYOVÁ, JULIE CHALUPNÍKOVÁ & JAN HUBERT

Kudlíková, I., Klauďová, A., Chalupníková, J. & Hubert, J.: Characterization of polyclonal antibodies against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae).

Contributions to Soil Zoology in Central Europe II. Tajovský, K., Schlaghamerský, J. & Pižl, V. (eds.): 89-92. ISB BC AS CR, v.v.i., České Budějovice, 2007. ISBN 978-80-86525-08-2

*Tyrophagus putrescentiae* is a widely distributed species of medical importance inhabiting agriculture soil, nests of birds and rodents, stored food and house dust. Detection of *T. putrescentiae* is currently based mainly on classical methods such as extraction in Tullgren-Berlese funnels, and there is an acute need for rapid detection techniques. Therefore we developed polyclonal antibodies (Pabs) for the detection of *T. putrescentiae*. Two Pabs (*anti-TyrPut* K60 and *anti-TyrPut* K61) were prepared against an antigen in the form of protein fraction from whole body homogenates of the mite. Specificity and sensitivity of the purified Pabs were evaluated by PTA-ELISA in a range of working concentrations of the Pabs from 0.01 to 1 µg/ml. The test with both Pabs have identical detection limit 50 ng of antigen proteins/ml in working concentration 1 µg of IgG/ml. The Pabs showed strong cross-reactivities to mites of Acaridae, Carpglyphidae and Glyciphagidae family. No cross-reaction was found for the mite family Pyroglyphidae, stored product insects, micro-fungi, the rearing diet of mites (yeast and wheat diet) and extracts from wheat kernels. The test with the obtained antibodies enabled to detect (i) the mites; (ii) their faeces and (iii) mite remnants in the gut of their predators. The potential of the obtained antibodies for a rapid detection of *T. putrescentiae* in the environment is discussed.

Keywords: Detection, grain, storage, mite, ELISA.

Iva Kudlíková (corresponding author), Julie Chalupníková, Jan Hubert, Research Institute of Crop Production, Drnovská 507, CZ-161 06 Praha 6, Ruzyně, Czech Republic. E-mail: kudlikova@vurv.cz

Andrea Klauďová, Research Institute of Crop Production, Drnovská 507, CZ-161 06 Praha 6, Ruzyně and Department of Zoology, Charles University, Viničná 7, CZ-110 00 Praha 2, Czech Republic.

## Introduction

*Tyrophagus putrescentiae* is a widely distributed species inhabiting agriculture soil (Smrž and Jungová, 1989), nest of birds and rodents, stored food and house dust (Thind et al., 2001; Stejskal et al., 2003; Szilman et al., 2004). This species is of medical importance due to its production of allergens (Gafvelin et al., 2001) and transmission of mycotoxin producing fungi (Stejskal et al., 2002).

There is an urgent need for rapid detection techniques for mites in synanthropic environments. The currently applied detection techniques are based on extraction in Tullgren-Berlese funnels, filth tests and traps (Thind, 2005). A rapid detection technique for *T. putrescentiae* is still missing. Immunochemical methods using ELISA represent a suitable approach to the detection of mites or their specific proteins (Konishi and Uehara, 1990; Dunn et al., 2002). The aim of this study was therefore to develop and characterize polyclonal antibodies (Pabs) for the detection of *Tyrophagus putrescentiae* by ELISA.

## Methods and material

*Tyrophagus putrescentiae* and the stored product arthropods for cross reactivity tests (see Fig. 1) originated from laboratory cultures reared on the Research Institute of Crop Production. *T. putrescentiae* was kept in rearing chambers on a mixture of yeast, wheat germs and dry fish food (85 % moisture, 25 ± 1°C temperature, in darkness).

Mites for the antibody preparation were removed from rearing chambers and cleaned of contaminants by a standard procedure (Kudlikova et al., 2004, 2005). The total weight of 10 grams of mites was homogenized with UltraTurax T25 basic homogenizer (IKA) for 2 minutes at 17 500 rpm in 70 ml PBS (pH 7.4). The homogenate was centrifuged (12 000 rpm, 5 minutes, 4°C, JOUAN® 23MRi) and the supernatant frozen (-40°C) until use. Proteins were precipitated by saturated solution of ammonium sulphate and crystalline (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to 80 % saturation. The precipitate was separated by centrifugation (4020xg, 15 minutes, 1°C, JOUAN® 23MRi), resuspended in phosphate buffer

| ORDER     | SUBORDER    | FAMILY   | SPECIES                               | Relative assay response (%) |        |
|-----------|-------------|--|---------------------------------------|-----------------------------|--------|
|           |             |  |                                       | concentration 1µg           | 10µg   |
| Astigmata | Acaridia    | Carpoglyphidae   | <i>Carpoglyphus lactis</i>            | 46                          | 88     |
|           |             | Glycyphagidae  | <i>Lepidoglyphus destructor</i>       | 5                           | 8      |
|           | Acaridae    |  | <i>Acarus siro</i>                    | 5                           | 93     |
|           |             |  | <i>Acarus gracilis</i>                | 9                           | 28     |
|           |             |  | <i>Aleuroglyphus ovatus</i>           | 6                           | 90     |
|           |             |  | <i>Tyrophagus putrescentiae</i>       | 100                         | 100 *1 |
|           |             |  | <i>Tyrophagus brevicrinatus</i>       | 58                          | 73     |
|           |             |  | <i>Caloglyphus redickoverzi</i>       | 7                           | 9      |
|           |             |  | <i>Dermatophagoides farinae</i>       | 6                           | 5      |
|           | Psoroptidia | Pyroglyphidae  | <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> | 5                           | 6      |
|           | Prostigmata | Cheyletidae  | <i>Cheyletus malaccensis</i>          |                             | 7      |
|           |             | <i>Ephestia kuehniella</i> larvae                            | 5                                     | 5                           |        |
|           |             | <i>Tribolium castaneum</i> larvae                            | 5                                     | 5                           |        |
|           |             | <i>Cheyletus malaccensis</i> feed on <i>T. putrescentiae</i> |                                       | 49 *2                       |        |
|           |             | mite's diet  | 5                                     | 6                           |        |
|           |             | wheat kernels  | 5                                     | 6                           |        |

Fig. 1. Cross reactivity of *anti-TyrPut* K61 to other stored product arthropods and rearing diets. Legends: \*1 Pab reaction to the immunogen (*T. putrescentiae*) represents 100 %, \*2 Sample of 8 individuals of *Cheyletus malaccensis* fed on *T. putrescentiae*.

saline pH 7.2 (PBS) and dialyzed against 50 % PBS with three changes over 36 hours. The antigen/protein solution was concentrated (in dialysis tubing (Sigma, D0405) on 20 % polyethyleneglycol) and its protein concentration was determined using DC Protein Assay Kit (BioRad) according to the manufacturer's instructions.

Purified protein antigen isolated from *T. putrescentiae* was used as immunogen. Immunization of laboratory rabbits (*Chinchilla* breed) was carried out according to Kudlíková et al. (2005). IgGs were isolated by precipitation with ammonium sulphate and subsequent affinity chromatography on protein A-Sepharose (Amersham Bioscience, 17-0402-03) according to the manufacturer's instructions.

The procedure to obtain unpurified antigens (total homogenates) of stored-product insects and other material was carried out as described above, except that the step with precipitation by ammonium sulphate was omitted.

The specificity and sensitivity of the obtained antibodies were evaluated by PTA-ELISA on microtitration plates (Gama) (Kudlíková et al., 2005).

For cross reactivity tests, total homogenates of stored product mites and insects (see Fig. 1) were used. In addition, the cross reactivity was tested against saprophytic fungi (*Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium viridicatum*) and extracts from the rearing diet of mites, flour and wheat grain.

PTA-ELISA with the obtained Pabs were tested to detect (i) the homogenized *T. putrescentiae* mites (ii) the faeces of *T. putrescentiae* collected together with debris of the growth medium (spent growth medium - SGM/ Stewart et al. 1992); (iii) the remnants of *T. putrescentiae* in the gut of its predator *Cheyletus malaccensis*. Eight individuals of *C. malaccensis* fed on *T. putrescentiae* were used for the detection and 8 starved individuals as control (see Fig. 1). The predatory mites were prepared by the same methods as the material for cross reactivity tests.

## Results and discussion

Two highly sensitive Pabs (*anti-TyrPut* K60 and *anti-TyrPut* K61) were prepared against an antigen in the form of protein fraction from whole body

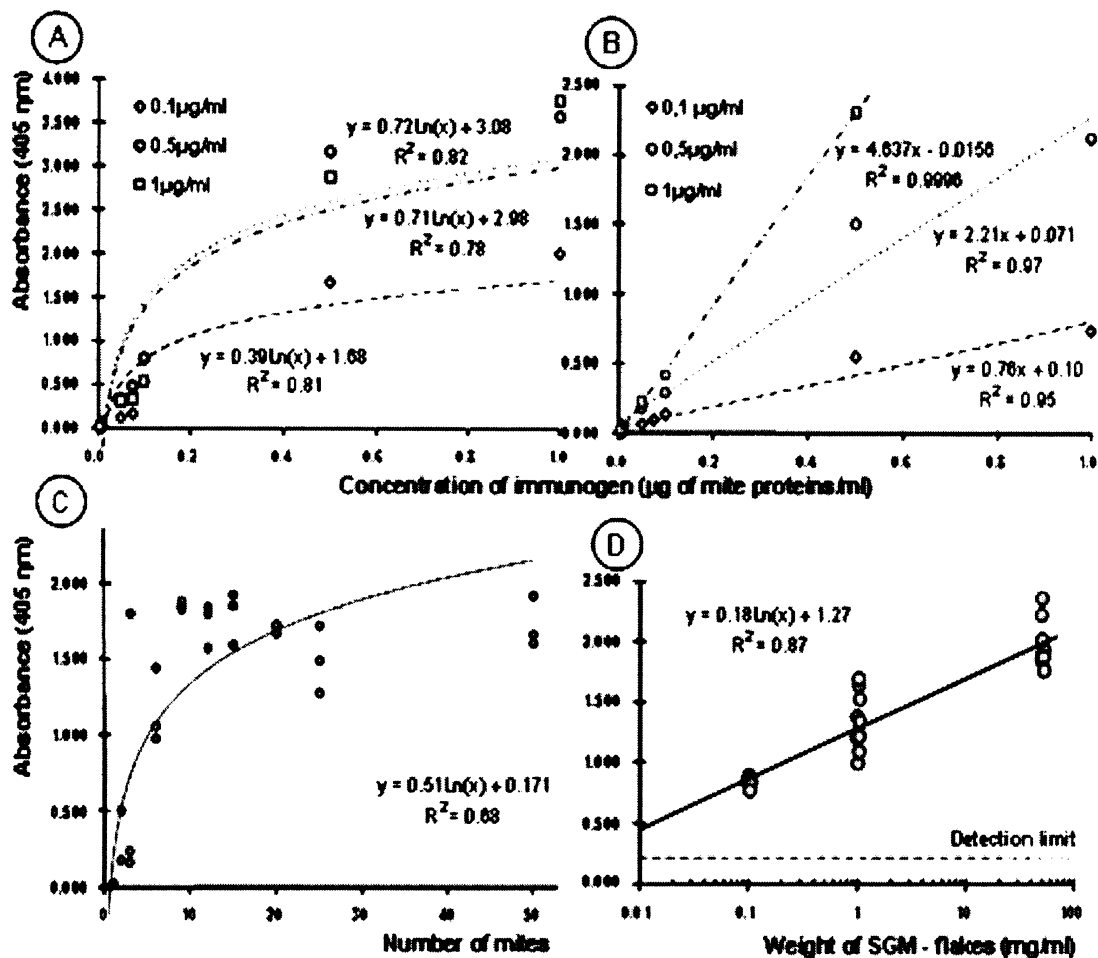


Fig. 2. The characterization of Pabs, A - In vitro sensitivity of PTA-ELISA with PAb anti-TyrPut K61 and anti-TyrPut K60 (B) against a concentration range of the immunogen (0.05 - 1.00 µg/ml) in three dilutions of immunoglobulins (0.1, 0.5 and 1 µg/ml), C - Sensitivity of PTA-ELISA with anti-TyrPut K61 in detection of *T. putrescentiae* mites; D - Sensitivity of PTA-ELISA with anti-TyrPut K61 in detection of *T. putrescentiae* faeces in spent growth medium.

homogenates of *T. putrescentiae*. Both Pabs anti-TyrPut showed very high and similar titre exceeding 1:204800, based on reactivity of the antisera anti-TyrPut K60 and anti-TyrPut K61 against constant concentration of the immunogen (1 µg/ml).

The prepared Pabs showed very high sensitivity as evaluated by PTA-ELISA in the range of working concentration from 0.01 to 1 µg of IgG/ml. The optimal working concentration of anti-TyrPut K61 for routine tests was within the evaluated range (0.1 - 1 µg of immunoglobulins/ml). The test with anti-TyrPut K60 was less sensitive, i.e. optimal working concentration of IgGs was higher (0.5-1 µg of immunoglobulins/ml) (cf. Fig. 2A and B). The test with both Pabs had the same *in vitro* detection limit - 50 ng of antigen proteins/ml, so anti-TyrPut K61 was chosen for further assays because of its lower optimal working concentration.

Anti-TyrPut K61 showed strong cross reactivities to mites of Acaridae, Carpoglyphydeae and Glycyphagidae family (i.e. to *Aleuroglyphus ovatus*, *Acarus siro*, *A.*

*gracilis*, *Carpoglyphus lactis*, *Lepidoglyphus destructor* and *Tyrophagus brevicrinatus*). No cross-reaction was found to stored product insects, the rearing diet of mites (yeast and wheat diet) and extracts from wheat kernels (Fig. 1). It indicates that the PAb could be applied in detection of a broad spectrum of mites, especially in combination with previously prepared antibodies (Tsay et al., 2002; Dunn et al., 2002, 2003).

Anti-TyrPut K61 was applied to detect individuals of *T. putrescentiae* and their faeces (Fig. 2C and D). The mite's antigens were successfully detected in homogenates of precise weight of frozen mites (-40°C). The detection threshold of the test was 2.2 µg of mites/ml, calculated as the weight corresponding to the mean + 3\*SD of 10 absorbance values of the blank.

The ability of the test to detect and quantify the antigen of *T. putrescentiae* in homogenates of different numbers of individuals was investigated as well (Fig. 2A). In this case, the detection threshold depended on the reliability of the homogenization and thus on the

release of antigens into the homogenization buffer. PTA-ELISA reliably detected the target antigens in homogenates of 6 specimens of *T. putrescentiae* per 0.5 ml of homogenization buffer (Fig. 2D). The test gave positive reaction even for 2 individuals when successfully homogenized. These results corresponded with the detection limit obtained for the weighted frozen mites, according to which the test was positive for less than one individual of *T. putrescentiae* (with the average weight of 3.5 µg).

The obtained limit corresponds to the detection limit of PTA-ELISA with Pabs against *Acarus siro* (*anti-A.siroK53* and *anti-A.siroK54*) published previously (Kudliková et al., 2004, 2005). The detection threshold of *T. putrescentiae* faeces in spent growth medium (SGM) was 3 µg of SGM/ml. It indicates that *anti-TyrPut* K61 is able to detect the faeces of *T. putrescentiae*.

The prepared Pab *anti-TyrPut* K61 allowed detecting *T. putrescentiae* remnants in the gut of the predatory mite *Cheyletus malaccensis* (Fig. 1). The amount of prey proteins in 8 predators was assessed as 0.1 µg. *Cheyletus* spp. mites are predators of acaridid mites, psocids and insects (Žďárková, 1998), but the spectrum of its prey under natural conditions is unknown. Application of Pabs with sensitivity for various kinds of prey will enable describing the food selection of the predator.

#### Acknowledgement

This work was supported by a grant of the Czech Ministry of Agriculture - No. 1B 53040. We thank Martina Janoušková for critical comments.

#### References

Dunn, J.A., Thind, B.B., Banks, J., Chambers, J., 2002. The development of ELISAs for the detection of storage mites in grain. *Food and Agricultural Immunology*, 14: 323-327  
 Dunn, J.A., Danks, C., Thind, B.B., Banks, J.N., Chambers, J., 2003. Development of a rapid immunoassay for the detection of storage mite pests in cereals. *Advances in stored product protection*. In: Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection, York, UK, 22-26 July 2002, p. 179-182

Gafvelin, G., Johansson, E., Lundin, A., Smith, A.M., Chapman, M.D., Benjamin, D.C., Derewenda, U., van-Hage-Hamsten, M., 2001. Cross-reactivity studies of a new group 2 allergen from the dust mite *Glycyphagus domesticus*, Gly d 2, and group 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor*, and *Tyrophagus putrescentiae* with recombinant allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107, 3: 511-518  
 Konishi, E., Uehara, K., 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antigens of *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) in house dust samples. *Journal of Medical Entomology*, 27: 993-998  
 Kudlikova, I., Hubert, J., Stejskal, V., Hyblova, J., Chalupnikova, J., 2004. Immunochemical detection of *Acarus siro* - characterization of polyclonal antibodies. In: The Book of Abstracts of the "Fifth Symposium of the European Association of Acarologists (EURAAC)", 26-30 July 2004, Berlin, p. 45  
 Kudlíková, I., Stejskal, V., Hýblová, J., Chalupníková, J., Hubert, J., 2005. Polyclonal antibodies for detection of flour mite *Acarus siro* (Acari: Acaridida). *Phytophaga*, 14: 711-720  
 Stejskal, V., Hubert, J., Kubatova, A., 2002. Associated-food-hazards: storage fungi and mites in poppy, mustard, lettuce and wheat. *Plant Protection Science*, 38 (Special 2): 673-680  
 Stejskal, V., Hubert, J., Kučerová, Z., Munzbergová, Z., Lukáš, J., Žďárková, E., 2003. The influence of the type of storage on pest infestation of stored grain in the Czech Republic. *Plant Soil and Environment*, 49: 49-54  
 Smrž, J., Jungova, E., 1989. The ecology of a field population of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridida). *Pedobiologia*, 33: 183-192  
 Szilman, E., Szilman, P., Solarz, K., Brewczynski, P., Sieron, A.L., 2004. Sensitization to the storage mite *Tyrophagus putrescentiae* in urban population of Upper Silesia (Poland). *Wiadomosci Parazytologiczne*, 50: 471-476  
 Thind, B.B., Clarke, P.G., 2001. The occurrence of mites in cereal-based foods destined for human consumption and possible consequences of infestation. *Experimental and Applied Acarology*, 25: 203-215  
 Thind, B.B., 2005. A new versatile and robust mite trap for detection and monitoring of storage mites in the cereal and allied industries. *Experimental and Applied Acarology*, 35: 1-15  
 Tsay, A., Williams, L., Mitchell, E.B., Chapman, M.D., 2002. A rapid test for detection of mite allergens in homes. *Clinical and Experimental Allergy*, 32: 1596-1601  
 Žďárková, E., 1998. Biological control of storage mites by *Cheyletus eruditus*. *Integrated Pest Management Review*, 3: 111-116