

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Parazitologie



Bc. Jan Procházka

Molekulární detekce původců cercáriové dermatitidy
Molecular detection of cercarial dermatitis causative agents

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Roman Leontovyč, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

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

V Praze, 11. 12. 2023

Bc. Jan Procházka

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat svému školiteli Romanu Lenotovyčovi za trpělivý přístup při dlouhých diskuzích a za spoustu užitečných rad v průběhu práce. Můj velký dík patří i všem členům Helmintologické laboratoře za příjemnou atmosféru a umožnění zpracování mého tématu. Velký díky patří i laborantce Verče za její ochotu a vstřícnost. Dále bych chtěl poděkovat všem svým přátelům, rodině a Adéle za stálou podporu a trpělivost i v nesnadných chvílích.

Abstrakt

Lidská cercáriová dermatitida je svědivé kožní onemocnění způsobované larválními stádii ptačích motolic, v ČR nejčastěji způsobované rodem *Trichobilharzia*. Monitoring jejich výskytu je od roku 2021 součástí povinného sledování kvality koupacích vod. Oficiálně používanou metodou detekce je sběr a vyšetřování vodních plžů. Tato metoda má však mnoho nevýhod v podobě vysoké časové náročnosti, nízké citlivosti a obtížné determinace parazitů. Alternativu by mohly poskytnout molekulární metody založené na filtraci environmentální DNA (eDNA) společně s metodami izotermální amplifikace, a to díky jejich nižším časovým nárokům, vysoké citlivosti a přesné determinaci.

Cílem této práce bylo vytvořit metodu detekce původců cercáriové dermatitidy založenou na izotermální amplifikaci cLAMP a filtraci eDNA z vody. Za tímto účelem byla pomocí molekulární analýzy vybrána konzervovaná sekvence pro rod *Trichobilharzia*, na jejímž základě byla navržena sada primerů pro cLAMP. Bylo potvrzeno, že navržená esej specificky amplifikuje DNA minimálně čtyř druhů rodu *Trichobilharzia*. Na základě laboratorních pokusů byla potvrzena dostatečná senzitivita eseje pro použití při detekci eDNA, a to jak na ředících řadách DNA, tak v kombinaci s filtrací eDNA živých cercárií z vody. Po pokusech v laboratorních podmínkách byla esej testována i na vzorcích z terénních sběrů, přičemž byla potvrzena její funkčnost, ačkoliv se její výsledky plně neshodovaly s daty ze sběrů a vyšetřování vodních plžů. Po vypočtení finančních nákladů obou metod byla potvrzena aplikovatelnost molekulární detekce cLAMP eDNA pro rutinní monitoring.

Závěrem lze konstatovat, že molekulární detekce cLAMP eDNA díky své vysoké senzitivitě, nízké ceně, snadnému provedení a přesné determinaci může být vhodnou alternativou ke sběru a vyšetřování vodních plžů při rutinním monitoringu původců cercáriové dermatitidy nejen v ČR.

Klíčová slova

Trichobilharzia, cercáriová dermatitida, ptačí schistosomy, detekční metody, eDNA, LAMP

Abstract

Human cercarial dermatitis (CD), also called Swimmer's itch appears as a skin rash caused by skin penetration by larval stages of avian schistosomes. In the Czech Republic, the most common causative agents is genus *Trichobilharzia*. Since 2021, monitoring of CD is a part of a mandatory testing of bathing water quality. The official method used for CD detection is collecting and examination of aquatic snails under a light source. However, this method has many disadvantages, such as time demands, low sensitivity and difficult parasite determination. These disadvantages can be overcome by usage of alternative approaches, such as molecular methods based on environmental DNA (eDNA) filtration and isothermal amplification.

Hence, the main goal of this thesis was development of molecular method based on eDNA filtration and cLAMP isothermal amplification for detection of CD causative agent in water. Based on molecular analysis a conserved region of target DNA was selected to create a cLAMP assay specific for genus *Trichobilharzia*. The cLAMP assay was confirmed to specifically amplify the DNA of at least four species of the genus *Trichobilharzia*. The laboratory experiments showed a sufficient sensitivity of cLAMP assay for eDNA detection, based on DNA dilution series and cercariae filtration from water. The functionality was also confirmed on samples from field collections, although the results did not fully match the data from aquatic snail collections and examination. After calculating the financial costs of both methods, the applicability of molecular detection of cLAMP eDNA for routine monitoring of CD was confirmed.

In conclusion, cLAMP eDNA molecular detection, thanks to its high sensitivity, low cost, ease of performance and accurate determination, may be a suitable alternative to the standard method by investigation of aquatic snails in routine monitoring of cercarial dermatitis agents not only in the Czech Republic.

Key words

Trichobilharzia, Cercarial dermatitis, avian schistosomes, detection methods, eDNA, LAMP

OBSAH

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD A CÍLE PRÁCE | 1 |
| 2 | LITERÁRNÍ PŘEHLED | 2 |
| 2.1 | Čeď Schistosomatidae | 2 |
| 2.1.1 | Ptačí schistosomy | 2 |
| 2.1.2 | Cerkáiová dermatitida | 3 |
| 2.2 | Detekční metody..... | 4 |
| 2.2.1 | Mikroskopické metody detekce..... | 4 |
| 2.2.2 | Molekulární metody detekce schistosom z prostředí..... | 5 |
| 2.2.3 | Metody zachycení eDNA z vody..... | 6 |
| 2.2.4 | Fixace a uchování eDNA..... | 9 |
| 2.2.5 | Metody extrakce eDNA..... | 9 |
| 2.2.6 | Metody amplifikace eDNA | 9 |
| 2.3 | Izotermální amplifikace LAMP | 12 |
| 2.3.1 | Metody detekce LAMP produktů..... | 12 |
| 2.4 | Vývoj a testování LAMP eseje..... | 17 |
| 2.4.1 | Volba molekulárních markerů a design primerů | 17 |
| 2.4.2 | Testování specificity..... | 17 |
| 2.4.3 | Testování senzitivity..... | 17 |
| 3 | MATERIÁL A METODIKA | 18 |
| 3.1 | Použité molekulární techniky | 18 |
| 3.1.1 | Příprava materiálu a izolace DNA..... | 18 |
| 3.1.2 | Sekvenační analýza | 19 |
| 3.1.3 | Druhová determinace pomocí barcodingu..... | 19 |
| 3.2 | Vývoj LAMP eseje | 20 |
| 3.2.1 | Molekulární analýza | 20 |
| 3.2.2 | Design primerů pro kolorimetrický LAMP (cLAMP) | 21 |
| 3.2.3 | Příprava reagentů pro cLAMP..... | 22 |
| 3.2.4 | cLAMP protokol..... | 22 |
| 3.3 | Testování specificity..... | 23 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.1 | Testování specificity cLAMP eseje..... | 23 |
| 3.4 | Testování senzitivity cLAMP reakce | 23 |
| 3.4.1 | Testování senzitivity pomocí PCR amplikonů | 23 |
| 3.4.2 | Testování senzitivity pomocí plasmidové DNA..... | 23 |
| 3.5 | Testování filtračního systému v laboratorních podmínkách..... | 24 |
| 3.5.1 | Testování senzitivity filtračního systému..... | 25 |
| 3.6 | Terénní sběry eDNA na lokalitách | 25 |
| 3.6.1 | Odběr eDNA pomocí filtrace | 25 |
| 3.6.2 | Sběr vodních plžů | 26 |
| 3.6.3 | Finanční náklady | 26 |
| 3.7 | Analýza produktů cLAMP pro falešnou pozitivitu | 26 |
| 3.8 | Amplifikace DNA bez izolace DNA..... | 27 |
| 4 | VÝSLEDKY..... | 28 |
| 4.1 | Vývoj LAMP eseje..... | 28 |
| 4.1.1 | Molekulární analýza | 28 |
| 4.1.2 | Design primerů pro kolorimetrický LAMP | 30 |
| 4.2 | Testování specifity cLAMP eseje..... | 31 |
| 4.3 | Testování senzitivity cLAMP reakce | 33 |
| 4.4 | Filtrace eDNA v laboratorních podmínkách | 37 |
| 4.4.1 | Testování senzitivity filtračního systému..... | 37 |
| 4.5 | Terénní sběry | 38 |
| 4.5.1 | Sběr a vyšetřování vodních plžů na přítomnost původců CD | 40 |
| 4.5.2 | Filtrace eDNA na lokalitách a cLAMP reakce..... | 41 |
| 4.6 | Analýza produktů cLAMP pro falešnou pozitivitu | 43 |
| 4.7 | Finanční náklady LAMP reakce..... | 44 |
| 4.8 | Amplifikace bez izolace DNA..... | 45 |
| 5 | DISKUZE..... | 46 |
| 5.1 | Molekulární analýza..... | 46 |
| 5.1.1 | Testování specificity navržené cLAMP eseje pro rod <i>Trichobilharzia</i> | 46 |
| 5.1.2 | Testování senzitivity navržené cLAMP eseje pro rod <i>Trichobilharzia</i> | 47 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.2 | Filtrace eDNA v laboratorních podmínkách | 49 |
| 5.3 | Terénní sběry eDNA a vodních plžů | 49 |
| 5.4 | Finanční náklady a využitelnost metody při rutinním monitoringu | 52 |
| 5.4.1 | Amplifikace bez izolace DNA | 52 |
| 5.5 | Závěr diskuze | 53 |
| 6 | ZÁVĚR | 54 |
| 7 | ZDROJE | 55 |
| 7.1 | Seznam použité literatury: | 55 |
| 7.2 | Internetové zdroje: | 61 |
| 8 | PŘÍLOHY: | 63 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| <i>Zkratka</i> | <i>Význam/český ekvivalent</i> |
|----------------|--|
| B3 | Backward Primer pro LAMP |
| BIP | Backward Inner Primer pro LAMP |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| CD | Cerkáriová dermatitida |
| cLAMP | Colorimetric LAMP/ kolorimetrický LAMP |
| CTAB | Cetrimoniumbromid |
| ČSN | Česká státní norma |
| DH | Definitivní hostitel |
| DMSO-EDTA | Dimethylsulfoxid – kyselina ethylendiamintetraoctová |
| dsDNA | Doublestranded DNA/ dvouvláknová DNA |
| eDNA | Environmental DNA/ Environmentální DNA |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| F3 | Forward primer pro LAMP |
| FIP | Forward Inner Primer pro LAMP |
| HNB | Hydroxynaphtalenová modř |
| IHA | Indirect Hemagglutination Assay |
| INC | Internal Negative control/vnitřní negativní kontrola |
| ITS | Internal Transcribed Spacer |
| LAMP | Loop-mediated Isothermal amplification |
| LB | Loop-primer backward |
| LF | Loop-primer forward |
| LFD-LAMP | Lateral-flow dipstick LAMP |
| LoD | Limit of Detection/ Detekční limit |
| MH | Mezihostitel |
| NINA-LAMP | Non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification |
| PCR | Polymerase chain reaction/ Polymerázová řetězová reakce |
| qPCR | Kvantitativní PCR |
| QUASR LAMP | Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters LAMP |
| RPA | Recombinase polymerase amplification |
| STEM-LAMP | LAMP se stem primery |
| SZÚ | Státní Zdravotní ústav |
| UDG | Uracil-DNA glykosyláza |

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Cerkáriová dermatitida (CD) je svědivá kožní vyrážka způsobovaná vývojovými stádii, tzv. cercáriemi, ptačích schistosom, v ČR nejčastěji motolicemi rodu *Trichobilharzia*. Jejich sledování se od roku 2021 stalo součástí povinného monitoring kvality koupacích vod, přičemž jsou detekovány na základě sběru a vyšetřování mezihostitelských vodních plžů. Z praktického hlediska má však tato metoda pro rutinní monitoring několik nevýhod: sběr a vyšetřování vodních plžů je časově a prostorově náročné a pro determinaci na základě morfologie je zapotřebí erudovaný pozorovatel.

Pro monitoring vodních organismů jsou vyvíjeny metody založené na filtraci tzv. environmentální DNA (eDNA) a amplifikačních metodách. Nejčastěji používanou metodou je qPCR, která však vyžaduje drahé přístrojové vybavení. Alternativu mohou poskytnout metody založené na izotermální amplifikaci, které nevyžadují drahé přístroje, a detekce navíc probíhá v kratším čase. Touto metodou může být např. kolorimetrický LAMP, při kterém dochází k detekci produktů amplifikace na základě barevné změny reakce.

Cílem této práce bylo vytvoření specifické eseje cLAMP pro rod *Trichobilharzia*, její testování jak v laboratorních podmínkách, tak na terénních vzorcích a její porovnání s metodou sběru a vyšetřování vodních plžů. Dílčími cíli této práce byly:

1. Vybrat cílovou sekvenci konzervovanou pro motolice rodu *Trichobilharzia*, navrhnout sadu cLAMP primerů specifickou pro rod *Trichobilharzia* a otestovat její specificitu a senzitivitu
2. Otestovat funkčnost a senzitivitu cLAMP eseje ve spojení s filtrací eDNA
3. Otestovat tuto esej na vzorcích odebraných na lokalitách a porovnat její výsledky se sběrem a vyšetřování vodních plžů
4. Vypočítat a porovnat finanční náklady metod sběru a vyšetřování vodních plžů s molekulární detekcí pomocí cLAMP eDNA

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Čeleď Schistosomatidae

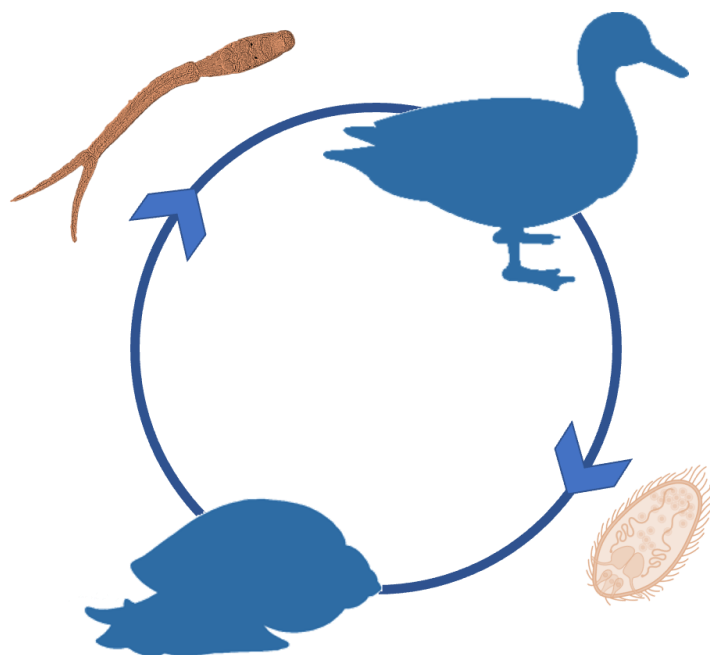
Čeleď Schistosomatidae (Trematoda: Digenea) obsahuje medicínsky i veterinárně významné motolice napadající savce nebo ptáky jako definitivní hostitele (DH) a vodní plže jako mezihostitele (MH). Momentálně je popisováno 17 rodů a více než 130 druhů napadající plže 16 čeledí jako své MH. Jedná se o kosmopolitně rozšířené parazity se zástupci ve slané, brakické, ale zejména sladké vodě (Loker *et al.*, 2022; Ebbs *et al.*, 2022). Medicínsky nejvýznamnější jsou zástupci způsobující tzv. lidskou schistosomózu (např. *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium*), a to zejména v tropických oblastech (WHO, 2023). V Evropě se však setkáváme pouze s ptačími schistosomami, které mohou u lidí způsobovat svědivé kožní onemocnění zvané cercáriová dermatitida (CD; angl. swimmer's itch), s nejvýznamnějším rodem *Trichobilharzia* (Horák *et al.*, 2015; Lashaki *et al.*, 2020).

2.1.1 Ptačí schistosomy

Ačkoliv ptačí schistosomy tvoří většinu druhové diverzity celé čeledi (celkem 85 popsáných druhů ze 13 rodů), není jim věnována tak velká pozornost jako lidským druhům. V poslední době však dochází k objevování nových druhů nebo již známých druhů na nových lokalitách (Loker *et al.*, 2022).

Životní cyklus ptačích schistosom

Dospělci ptačích motolic jsou gonochoristé, přičemž samice kladou vajíčka, ze kterých se líhne první larvální stadium, tzv. miracidium. To v prostředí vyhledává a následně penetruje do vodního plže, svého MH (nejčastěji čeleď Lymnaeidae nebo Planorbidae). V MH dochází k dalšímu vývoji a asexuálnímu množení. Mateřská sporocysta dává vzniknout dceřiným sporocystám, které migrují do oblasti hepatopankreatu. Tato prepatentní perioda, tj. období před začátkem uvolňování infekčních stádií (tzv. cercárií) do vnějšího prostředí, může trvat až několik týdnů. Uvolněné cercárie ve vodě hledají svého DH – vodního ptáka (Horák *et al.*, 2002). Cercárie sice nepřijímají potravu a jsou krátkověké (*Trichobilharzia szidati* se při teplotě 30 °C dožívá 48 h), avšak jsou vylučovány až v desítkách tisíc za den, přičemž množství vyloučených cercárií je pozitivně ovlivněno intenzitou světla (Al-Jubury *et al.*, 2020). Po nalezení DH dochází k penetraci a transformaci na tzv. schistosomula. V závislosti na druhu může docházet k migraci skrze cévy, nebo nervovou soustavu. Migrace skrze cévy je typická pro viscerální druhy (např. *T. franki*), nazální druh *T. regenti* migruje přes nervovou soustavu. Pokud vyloučené cercárie penetrují do náhodného hostitele, v tomto případě člověka, mohou u něj způsobit CD (Horák *et al.*, 2002). Zjednodušené schéma životního cyklu viz Obrázek 1.



Obrázek 1: zjednodušené scéma životního cyklu ptačích motolic; z vajíčka se líhne miracidium, které ve vodním prostředí vyhledává a penetruje do vodního plže (MH). Ve vodním plži dochází ke vzniku mateřské a dceřiné sporocysty, následně i k asexuálnímu množení. Zralé cercárie opouští vodního plže a ve vodním prostředí vyhledávají vodního ptáka (DH), do kterého penetrují.

2.1.2 Cercáriová dermatitida

Kožní alergické onemocnění zvané cercáriová dermatitida je způsobené průnikem cercárií některých ptačích, ale i savčích druhů do kůže obratlovčího hostitele. Lidská CD (angl. human cercarial dermatitis, swimmer's itch) je nejvíce spojována s ptačími schistosomami. Toto onemocnění se projevuje jako svědivá vyrážka, která může být provázena i dalšími příznaky jako horečka, kašel, průjem a zduření mízních uzlin (Horák *et al.*, 2015; Macháček *et al.*, 2018). Cercáriová dermatitida byla poprvé popsána v michiganských jezerech v roce 1928 (Cort, 1928), od této doby byly však případy hlášeny v globálním měřítku. Kromě zdravotního rizika může mít toto onemocnění i ekonomický dopad, např. na provozovatele rekreačních zařízení nebo na pěstitele rýže (Horák *et al.*, 2015). Vyrážka po koupání však může být způsobovaná i jinými organismy včetně bakterií, sinic, hub, řas nebo žahavců, a proto je nutná přesná diagnostika.

Cercáriová dermatitida v České republice

Nejčastěji nacházenými původci CD v České republice jsou druhy rodu *Trichobilharzia* – *T. szidati* Neuhaus, 1952, *T. franki* Müller a Kimming, 1994 a *T. regenti* Horák, 1998. Vyskytují se zde však i další rody jako *Bilharziella polonica*, *Gigantobilharzia* spp. (Kolářová *et al.*, 1997; Rudolfová *et al.*, 2007). CD nepatří mezi život ohrožující onemocnění, z toho důvodu zatím není systematicky sledována a do roku 1997 jí byla věnována pouze malá pozornost (Kolářová *et al.*, 1997). V poslední době dochází v souvislosti s výskytem CD i s uzavíráním koupacích ploch, jako např. koupací jezírko v areálu

Škodaland v Plzni nebo biotop Lhotka v Praze. Na koupališti v Praze došlo k zákazu koupání na téměř 2 měsíce, s tím byla samozřejmě spojena i značná finanční ztráta provozovatelů (osobní sdělení provozovatelů), tyto případy s sebou přináší i značnou mediální pozornost (Odkaz 1, Odkaz 2).

CD se na našem území věnuje kromě výzkumných pracovišti i Státní zdravotní ústavem (SZÚ), a to pomocí online dotazníku o zdravotních problémech spojených s koupáním (Odkaz 3). V roce 2021 vyšla v platnost změna vyhlášky č. 238/2011 a norma ČSN 75 7737, čímž se sledování původců CD stalo součástí povinného monitoringu kvality koupacích vod. Díky tomu budou hygienické stanice monitorovat výskyt CD povinně, což s sebou pravděpodobně přinese i růst počtu případů výskytu. Momentálně je výskyt CD monitorován pomocí metody sběru a vyšetřování vodních plžů. Tato metoda však není zcela vhodná pro rutinní monitoring, proto bude v budoucnu kladen důraz na vývoj nové metodiky např. založené na molekulárních metodách.

2.2 Detekční metody

Obecně lze schistosomy detekovat na několika úrovních – na úrovni DH (savec, člověk, vodní pták atd.), MH (vodní plži), anebo mimo své hostitele ve vnějším prostředí (ve vodě, v nalezeném trusu atd.). K těmto účelům je využíváno široké spektrum přístupů. Nejzákladnější, avšak široce využívané, jsou metody založené na detekci a determinaci pomocí mikroskopie využívané na všech úrovních (Bärenbold *et al.*, 2017; Aldhoun *et al.*, 2009; Théron, 1979). Na úrovni DH jsou využívány i imunodiagnostické metody (ELISA, využití cirkulujících antigenů, IHA atd.) (Sorgho *et al.*, 2005; Van Lieshout *et al.*, 1997; Hoekstra *et al.*, 2022). Rychle se rozvíjející skupinou jsou metody založené na molekulárně-biologických postupech. Ty detekují a determinují parazita na základě sekvence jeho DNA (např. qPCR, LAMP, RPA) (Rudko *et al.*, 2018; Hamburger *et al.*, 2013; Rosser *et al.*, 2015).

2.2.1 Mikroskopické metody detekce

Sběr a vyšetřování vodních plžů

Sběr a vyšetřování vodních plžů je metoda využívaná při detekci jak lidských, tak ptačích schistosom (Aldhoun *et al.*, 2009, ČSN 75 7737, Kamel *et al.*, 2021). Jejím principem je mechanický sběr vodních mezihostitelských plžů a jejich následné vyšetření na přítomnost cercárií.

Dle platné normy ČSN 757737 sběr těchto plžů probíhá ručně nebo pomocí cedníku s prodlouženou rukojetí apod. Vždy je však kladen důraz na použití ochranných pomůcek, např. rukavice a vysoké brodicí kalhoty, aby bylo zamezeno kontaktu s vodou a tím minimalizováno riziko nákazy. Plži jsou sbíráni v oblasti litorálu, vyskytují se na vodních rostlinách, větvích, plovoucím odpadu, kamenech apod.; někteří plži se mohou pohybovat zespodu vodní hladiny. Čas sběru se dle lokality pohybuje od 20 do 60 min. Pokud není za tento čas možnost získat vzorky z celé lokality, je nutné nejprve vytipovat místa sběru. Většinou se jedná o místa s dobrým přístupem pro koupání, místa s vhodnou vegetací, návětrné strany atd. Nasbírání plžů jsou v širokohrdlých nádobách s trochou vody převezeni do laboratoře, v níž jsou vyšetřeni na přítomnosti cercárií

Aby bylo zamezeno úhynu, je nutno vyšetřit plže do 24 hodin po sběru, navíc je mortalita u infikovaných plžů vyšší. Plži jsou opláchnuti a jednotlivě (nebo po více rozdělení podle druhů) vloženi do skleniček s odstátou vodou pod zdroj světla stimulujícího vylučování cercárií. Ty jsou následně determinovány na základě morfologie, popřípadě pozitivní fototaxe či hostitelské specifity (ČSN 757737).

Podobně lze vyšetřit plže i pomocí pitev, přičemž jsou po odstranění ulity hledány sporocysty a další vývojová stádia ve vnitřních orgánech (Sturrock *et al.*, 1979 citováno dle Kamel *et al.*, 2021).

Cerkáriové pasti

Mikroskopické metody lze využít k detekci nejen z hostitelů, ale i přímo z prostředí. K tomu jsou využívány tzv. cercáriové pasti, jež jsou založeny na chemoatrakci cercárií. Na podložní sklička je připravena stimulační matrix, která obsahuje nenasyčené mastné kyseliny (např. kys. linolenovou). Jednotlivá sklička jsou umístěna do stojanu a ponořena pod hladinu na několik hodin. Po vyjmutí a nabarvení jsou hledány cercárie (Shiff *et al.*, 1993, Ahmed *et al.*, 2002).

Cerkáriometrie

Dalším způsobem zachycení cercárií v prostředí je jejich filtrování, tzv. cercáriometrie. Jelikož jsou cercárie filtrovány přímo z vody, je tato metoda nezávislá na mezihostitelských plžích. Na lokalitě je odebrán předem definovaný objem vody (např. 10 l), který je pomocí gravitace filtrován skrze systém filtrů tak, aby byly větší částice zachyceny na filtrech s velkým průměrem ok a nedocházelo k ucpání posledního nejhustějšího filtru, na kterém jsou zachytávány samotné cercárie. Zachycené cercárie jsou následně barveny a počítány pod mikroskopem. Tato metoda neposkytuje pouze kvalitativní data, ale i kvantitativní v podobě koncentrace cercárií na litr (Théron, 1979; Ouma *et al.*, 1989).

Další metody

V minulosti byly vyvinuty i další metody detekující zejména cercárie lidských schistosom v prostředí. Jedním z příkladů může být využití sentinelových hostitelů (např. myši). Ti jsou vystaveni kontaktu s vodou na lokalitě po danou dobu a následně převezeni do laboratoře. Samotná detekce probíhá až po stanovené době v laboratoři, zde pak jsou schistosomy hledány v orgánech (Prentice a Ouma, 1984).

2.2.2 Molekulární metody detekce schistosom z prostředí

Světová snaha o odstranění mnoho z tzv. „neglected tropical parasitic diseases“ postupně vede ke změně paradigmatu v parazitologii směrem od kontroly výskytu onemocnění k úplné eradikaci. Z toho důvodu vznikla potřeba mnohem citlivějších detekčních metod, které jsou schopné zachytit i patogeny nebo parazity v nízkých počtech (Sengupta *et al.*, 2022). Řešení by mohly nabídnout molekulárně-biologické metody, které jsou založeny na potvrzení přítomnosti parazitární DNA ve vzorku (Kamel *et al.*, 2021). Příkladem může být detekce cercárií ptačích schistosom zachycených z vody filtrací (Rudko *et al.*, 2018) či při detekci lidských schistosom ve vodních plžích (Kane *et al.*, 2013). Vodní plže lze

využit i jako sentinelové hostitele (Allan *et al.*, 2013). Nejnovější přístupy jsou však založeny na detekci tzv. environmentální DNA (eDNA) (Takahashi *et al.*, 2023).

Detekce pomocí environmentální DNA (eDNA)

Termín environmentální DNA (eDNA) tak, jak je definován v ekologii, znamená veškerou nukleovou kyselinu izolovanou ze vzorků z prostředí (voda, vzduch, zemina, sedimenty), aniž by bylo nutné nejprve izolovat cílové organismy (Taberlet *et al.*, 2012; Pawlowski *et al.*, 2020). eDNA lze rozdělit do dvou skupin, (1) DNA pocházející z celých organismů (např. jedinců) a mimoorganismální DNA (z odvržených buněk, tkání, nebo samotná volná DNA) (shrnuto v přehledovém článku Takahashi *et al.*, 2023). Na rozdíl od genomové DNA (izolované z konkrétního jedince) se eDNA skládá ze směsi DNA různých organismů (Taberlet *et al.*, 2012).

Detekce eDNA byla poprvé použita v ekologických studiích monitorující mikrobiální společenství v mořských sedimentech (Ogram *et al.*, 1987). Později začala být využívána i při studiu eukaryotických organismů (Pace, 1997). Počty studií věnujících se monitoringu organismů pomocí eDNA začaly stoupat po roce 2008, kdy byla DNA využita při detekci invazních druhů (Ficetola *et al.*, 2008). Obecně však lze říct, že eDNA je využívána k detekci patogenů od virů přes bakterie, jednobuněčná i mnohobuněčná eukaryota včetně parazitických červů (shrnuto v přehledovém článku Bass *et al.*, 2023).

Přístupy při detekci eDNA

Detekci pomocí eDNA lze rozdělit na dva přístupy: (1) eDNA je využívána k tzv. meta-barcodingu, tzn. jsou zvoleny obecné molekulární markery a na základě zjištěných sekvencí je detekována škála druhů ve zkoumaném vzorku. Tento přístup je obecně častěji využíván spíše v ekologických studiích. Nebo (2) jsou zvoleny sekvence specifické pro konkrétní organismus, přičemž výstupem tohoto přístupu je zjištění přítomnosti, nebo naopak nepřítomnosti hledaného organismu.

Aktuální využití eDNA v humánní a veterinární parazitologii

Metody spojené s eDNA využívané v humánní nebo veterinární parazitologii jsou v dnešní době nejvíce zaměřené na detekci motolic, a to konkrétně rodů *Schistosoma*, *Trichobilharzia*, *Opisthorchis* a *Fasciola* (Alzaylee *et al.*, 2020; Jones *et al.*, 2018; Rudko *et al.*, 2019; Sato *et al.*, 2018; Sengupta *et al.*, 2019). Všechny tyto motolice využívají jako své MH vodní plže, kteří produkují do vodního prostředí volná stádia parazita, jež mohou být pomocí těchto metod detekována. Využití eDNA v parazitologii je shrnuto v přehledových člácích (Sengupta *et al.*, 2022; Bass *et al.*, 2023).

2.2.3 Metody zachycení eDNA z vody

Odběr vzorků velice záleží na typu lokality a typu monitorovaného organismu, neexistuje žádná standardizovaná metodika pro odběr eDNA z vody. Rozdíly jsou i mezi objemem odebrané vody, a to od 15 ml (Ficetola *et al.*, 2008) až po několik tisíc litrů (Schabacker *et al.*, 2020). Metody zachycení lze rozdělit na dva přístupy: (1) precipitace DNA z malého vzorku vody (Ficetola *et al.*, 2008; Doi *et al.*, 2017) nebo (2) filtrace, která může probíhat v laboratoři, nebo přímo na lokalitě (Spens *et al.*, 2017; Strand *et al.*, 2019).

Precipitace eDNA

Ethanolová precipitace je metoda založená na odběru malého vzorku vody, obvykle 15 ml (Ficetola *et al.*, 2008), ale existují postupy i pro 100 ml (Minamoto *et al.*, 2016). Do odebraného vzorku (15ml) je přidáno octan sodný a čistý etanol (většinou dvojnásobek odebraného objemu), díky tomu dojde k vysrážení molekul DNA (Ficetola *et al.*, 2008). Izolace DNA pak probíhá pomocí centrifugace při nízké teplotě po dlouhou dobu (Minamoto *et al.*, 2016). Ačkoliv má tato metoda vysoké výtěžky, je negativně ovlivněna malým objemem odebraného vzorku, což je způsobeno nutností přidání dvojnásobného objemu etanolu. Tento problém částečně řeší **isopropanolová precipitace**, při níž stačí přidat pouze 0,7–1 násobek objemu odebrané vody (Doi *et al.*, 2017).

Filtrace eDNA

Filtrace eDNA z vody je koncentrační metoda, tudíž umožňuje oproti precipitaci zpracovat větší objem vody, čímž se zvyšuje potenciál zachytit větší množství DNA. Výzkumy na toto téma nebyly nicméně prováděny na rybníční vodě, což je pro aplikaci v ČR zásadní. Rybníční voda je pro svou vysokou turbiditu způsobenou velkým množstvím řas, organických zbytků atd. náročná na filtraci. Jelikož dochází k rychlému ucpaní filtru, jsou aplikovány předfiltrační systémy nebo centrifugace atd. Nicméně je nutné poznamenat, že univerzální metodika pro odběr eDNA nebyla vytvořena (Minamoto *et al.*, 2016; Harper *et al.*, 2019). Filtrační systémy lze rozdělit na tzv. otevřené a uzavřené.

Otevřená filtrace probíhá na vakuové filtrační aparatuře. Je při tom využíváno spektrum filtrů z různých materiálů a velikostí pórů. Využívají se polykarbonátové filtry, nitrocelulózoové, nebo z acetátových vláken, polyvinylidenfluoridové, polyethersulfonové a filtry ze skleněných vláken. Velikosti pórů filtrů se přitom pohybují od 0,1 μm až 0,6 μm (Liang a Keeley, 2013; Spens *et al.*, 2017). Zvláštní přístup byl využit při detekci původce račího moru, oomycety *Aphanomyces astaci*, při kterém byly využity filtry ze skleněných vláken (2 μm póry) pro filtraci přímo na lokalitě. K tomu byl použit podomácku vyrobený systém ze zahradní hadice, přenosné vrtačky pohánějící peristaltickou pumpu a nástavce pro umístění filtru (viz Obrázek 2) (Strand *et al.*, 2019; Rusch *et al.*, 2020).



Obrázek 2: modifikovaný otevřený systém filtrace, převzato z Rusch *et al.*, 2020

Uzavřená filtrace: oproti otevřené filtraci, při níž je potřeba přímé manipulace se samotným filtrem, se filtr nachází uvnitř kapsle. Díky tomu se velmi snižuje riziko kontaminace, navíc může být v této kapsli filtr i skladován. Často jsou využívány filtry Sterivex (Sterivex-GP Pressure Filter Unit) s polyethersulfonovou membránou původně sloužící ke sterilizaci roztoků. Byly využity např. i pro detekci eDNA původců lidské schistosomózy *Schistosoma mansoni* (Sengupta *et al.*, 2019). Tento koncept byl zdokonalen a je komerčně nabízen firmou Sylphium přímo za účelem eDNA filtrace. Jimi nabízená filtrační kapsle dokáže vyfiltrovat až 20krát větší objem vody než Sterivex filtry. Jedná se o filtrační kapsle eDNA Dual Filter Capsules (viz Obrázek 3).



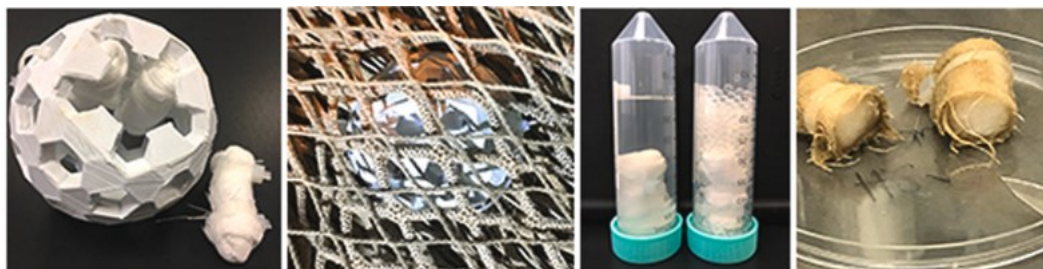
Obrázek 3: filtrační kapsle Sylphium eDNA dual filters

Uzavřená velkoobjemová filtrace: komerčně dostupné jsou i velkoobjemové filtrační kapsle. Zvýšením filtrační plochy v jedné kapsli (až 1300 cm²) lze přefiltrovat až 100 litrů vody za relativně krátký čas, je ale zapotřebí pumpa připojená např. k autobaterii (Valentini *et al.*, 2016). Jedná se např. o Envirochek™, který byl navržen pro detekci oocyst rodu *Cryptosporidium* a cyst rodu *Giardia*, nebo o Wattera eDNA Filtres (Peixoto *et al.*, 2021; Peixoto *et al.*, 2023).

Alternativní metody

Využitím speciální sítě s uchyceným filtrem lze pomocí jejího vláčení přefiltrovat až 3000 litrů vody. Velký objem přefiltrované vody zvyšuje šanci zachycení eDNA na filtru, ačkoliv je velikost ok 64 μm (Schabacker *et al.*, 2019).

Dalším alternativním přístupem je využití smotků vaty a gázy, které jsou vloženy v plastové kouli do rybářské sítě a vláčeny za lodí (viz Obrázek 4); oproti filtrům tak nehrozí problém s ucpáváním. Tento přístup byl využit při monitorování mořské biodiverzity pomocí eDNA metabarcodingu (Maiello *et al.*, 2022).



Obrázek 4: Systém pro zachycení eDNA pomocí vaty a gázy dle Maiello *et al.*, 2022

Přítomnost DNA parazita na lokalitě lze detekovat i pomocí „biofiltru“ v podobě ryb, konkrétně v jejich výkalech (Fish Faecal Xenomonitoring), díky přirozenému požívání planktonu z vody včetně cercárií *S. mansoni* (Bartoniček, 2023).

2.2.4 Fixace a uchování eDNA

Materiál odebraný na lokalitě je většinou zpracováván v laboratoři, ale ne vždy k tomu dochází okamžitě. Aby nedocházelo k rozpadu eDNA, je vzorek fixován. Při etanolové precipitaci etanol zároveň slouží jako fixativum, vzorek je navíc skladován při 4, –20, nebo –80 °C (dle možností). Etanol lze využít i při skladování filtrů. Pro delší skladování (až 2 týdny) při pokojové teplotě jsou využívány lyzační pufrů (Longmireův pufr nebo CTAB). Ty slouží nejenom k fixaci, ale zároveň díky nim dochází k lyzi buněčných membrán a uvolnění DNA z buněk (Renshaw *et al.*, 2015; shrnuto v Spens *et al.*, 2017). Do filtračních kapslí lze fixační roztok injektovat přímo a po uzavření takto skladovat, využíván je však i při otevřené filtraci (Strand *et al.*, 2019). Dále lze využít prezervační pufrů jako např. DMSO-EDTA, RNeasyLater® či DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) (Lear *et al.*, 2018).

2.2.5 Metody extrakce eDNA

Pro extrakci eDNA je při precipitaci využívána centrifugace, z peletu může být DNA izolována pomocí komerčně dostupných kitů (Ficetola *et al.*, 2008). DNA z filtrů uchovávaných v lyzačních nebo prezervačních pufrůch lze izolovat pomocí metody fenol-chloroformové precipitace s isoamylalkoholem (Sambrook *et al.*, 1989, cit dle Renshaw *et al.*, 2015), nebo lze opět využít komerčně dostupné kity jako např. DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) (Spear *et al.*, 2015; Spens *et al.*, 2017).

2.2.6 Metody amplifikace eDNA

Pro amplifikaci eDNA je nejběžněji využíváno **qPCR** (Rudko *et al.*, 2019; Strand *et al.*, 2019; Peixoto *et al.*, 2021) nebo další modifikace klasické PCR (Nested PCR atd) (Jackson *et al.*, 2017). Pro amplifikaci eDNA jsou však využívány i izotermální metody amplifikace jako **LAMP** (Williams *et al.*, 2017), a to i na poli parazitologie při detekci plže *Galba truncatula* mezipřenositele lidské motolice *S. mansoni* (Davis *et al.*, 2020). Vzhledem k zaměření této práce se následující odstavce zaměřují právě na metodu izotermální amplifikace LAMP.

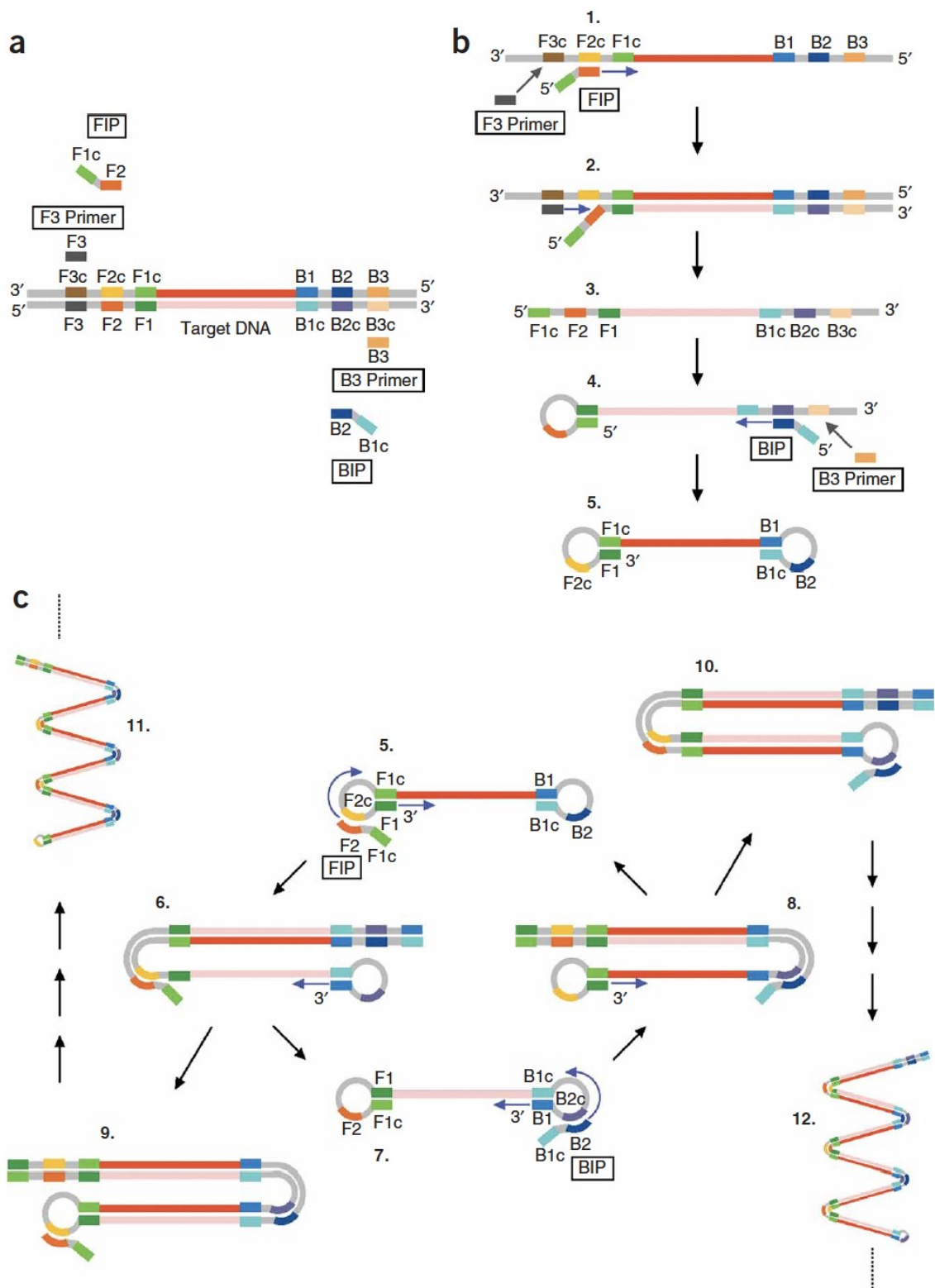
Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP)

Metoda LAMP z angl. „Loop-mediated isothermal amplification of DNA“ (v překladu izotermální amplifikace DNA zprostředkovaná smyčkou) byla poprvé popsána v roce 2000 (Notomi *et al.*, 2000). Tato přístup patří mezi amplifikační metody DNA probíhající za stálé teploty (65 °C). Oproti PCR, při kterém je cyklická denaturace dvojitěvláknové DNA zajištěna změnou teploty, dochází zde k cyklickému vyvazování (z angl. „strand displacement“) vláknů pomocí speciální polymerázy a 2 sad primerů: tzv. vnitřních – **F3**, **B3** (z angl. „forward“ a „backward“) a vnějších – **FIP**, **BIP** (z angl. „forward inner primer“ a „backward inner primer“). Na začátku reakce se na vyvazování vláknů DNA podílí obě sady primerů, v průběhu reakce jsou však zapojeny pouze vnitřní primery, vzniknuvší amplikony totiž neobsahují F3 a B3 úseky. Každý vnitřní primer obsahuje sekvence komplementární ke dvou místům

cílové sekvence. První část k nasednutí a zahájení syntézy a druhý nasedající na úsek F2 (B2). Tato struktura zajišťuje vznik jednovláknových smyček a obsahující onu F2 sekvenci, na kterou opět nasedají další primery. Tím je zajištěna samozahajující se syntéza dalších vláken s rychlostí až 10^9 kopií za hodinu.

Mechanismus a reakční kroky jsou schématicky zobrazeny na Obrázek 5. Vnitřní primer FIP hybridizuje s F2c úsekem cílové sekvence, přičemž iniciuje syntézu komplementárního vlákna. O několik bází kratší vnější primer F3 hybridizuje s F3c (komplementárním) úsekem cílové sekvence, přičemž zahajuje vyvazování vláken, a tím umožňuje vzniku smyčky odhalením komplementárního úseku k jejímu konci. Tato jednovláknová DNA s jednou smyčkou slouží jako templát k v podstatě identické reakci v opačném směru na opačném konci tohoto produktu s B3 a BIP primery. Vzniklá struktura tvarem podobná čince vstupuje do druhé fáze reakce, tedy cyklické amplifikace.

Cyklická fáze reakce začíná nasednutím FIP na smyčku, kterou částečně otevírá, čímž umožňuje syntézu další kopie cílové sekvence, která je však spojena s tou původní. Vzniká tak dvakrát delší produkt, který opět slouží k další syntéze, tím se produkt v průběhu reakce prodlužuje. Jelikož tento produkt může „růst“ na obou smyčkách najednou dochází k amplifikaci se třetí mocninou každého půlcyklu (celý mechanismus popsán v Notomi *et al.*, 2000).



Obrázek 5: Schéma průběhu LAMP reakce; (1) nasedání FIP a F3 primerů na cílovou sekvenci; (2) syntéza komplementárního vlákna; (3) oddělení vláken (4) syntéza vlákna v opačné směru (5) vznik čince podobné struktury se smyčkou na obou koncích, která vstupuje do cyklické fáze amplifikace (9-12) fáze prodlužování vzniklých amplikonů (Tomita et al., 2008).

Původní práce byla následně modifikována o další sadu primerů, tzv. „loop primerů“, LoopF a LoopB, které nasedají na úseky obsažené ve smyčkách, a tím zvyšují rychlost a senzitivitu reakce (Nagamine *et al.*, 2002). Existují však další práce využívající tzv. stem-primery (STEM-LAMP), které nenesedají v místě smyček, ale v úseku mezi nimi. Díky tomu, že nemusí být umístěny striktně mezi F2 a F1 úseky, dovolují při designu větší variabilitu (Gandelman *et al.*, 201).

V parazitologii byla LAMP metoda vyvinuta pro detekci mnoha cizopasníků. Z helmintologie je to např. *Fasciola hepatica* a *Fasciola gigantica* (Ai *et al.*, 2010), *Clonorchis sinensis* (Cai *et al.*, 2010), *Schistosoma japonicum* (Xu *et al.*, 2010), *Schistosoma mansoni* (Gandasegui *et al.*, 2016), *Taenia* spp. (Nkouawa *et al.*, 2009), *Paragonimus westermani* (Chen *et al.*, 2011), *Opithorchis viverrini* (Arimatsu *et al.*, 2012), *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura* (Rashwan *et al.*, 2017), *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi* a *Wuchereria bancrofti* (Poole *et al.*, 2017), a *Angiostrongylus cantonensis* (Baláž *et al.*, 2023).

2.3 Izotermální amplifikace LAMP

2.3.1 Metody detekce LAMP produktů

Při LAMP reakci vzniká velké množství amplifikované DNA, z několika kopií vznikne až 10^9 za hodinu (Notomi *et al.*, 2000). Metod, jak tyto produkty detekovat, respektive vizualizovat, existuje široká škála a mohou být rozděleny na dvě skupiny: (1) na sekvenčně nezávislé, tj. dochází k detekci vzniklého produktu nezávisle na jeho sekvenci, a (2) sekvenčně závislé, tj. pokud produkt neobsahuje konkrétní cílovou sekvenci, nedojde k jeho vizualizaci, čímž se ještě zvyšuje specifita eseje. Sekvenčně závislé metody se pak dále dělí na ty, které detekují pouze jeden úsek, nebo na tzv. multiplex, tj. umožňují detekovat několik různých úseků najednou.

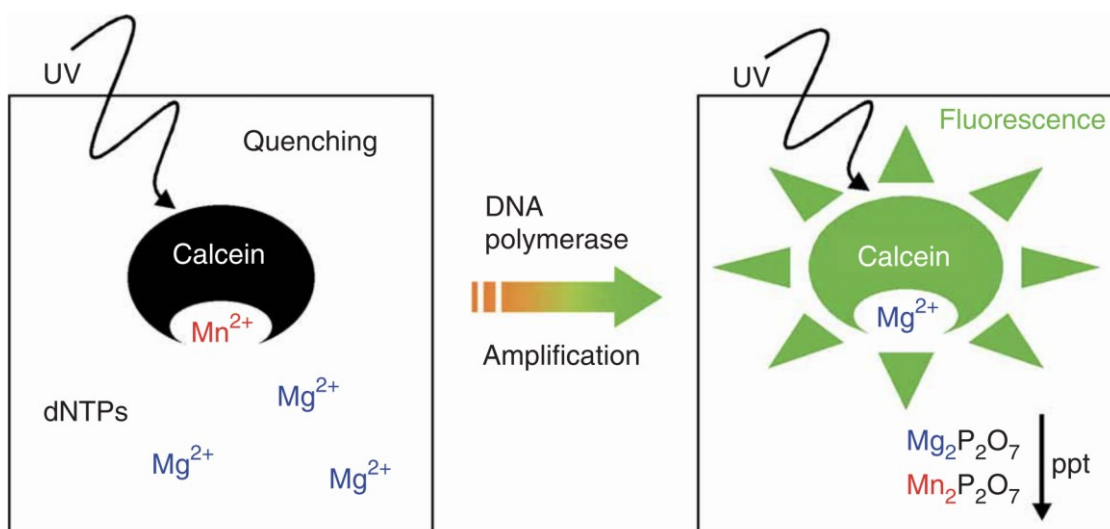
Podle mechanismu detekce produktů mohou být sekvenčně specifické i nespecifické metody děleny na optické, tj. detekce je závislá na optickém signálu (změně barvy, turbidity atd.), nebo metody založené např. na změnách elektrochemických vlastností v průběhu reakce. (shrnuto v přehledovém článku Becherer *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2014).

Sekvenčně nezávislé metody

- **Pozorování precipitátu:** Z deoxyribonukleotid trifosfátu vzniká při syntéze DNA vedlejší produkt v podobě pyrofosfátových iontů. Díky tomu, že jsou tyto ionty v reakci produkovány ve velkém množství, reagují s hořčnatými ionty v reakční směsi za vzniku bílého precipitátu (Mori *et al.*, 2001). Ten může být vizualizován buď pomocí centrifugace, nebo i bez ní pouhým okem (Zhang *et al.*, 2014). Tato metoda není náročná na přístrojové vybavení, odečet výsledku je však velice závislý na pozorovateli, proto je těžké určit senzitivitu této metody, jelikož interpretace výsledku se může značně lišit (Le *et al.*, 2012).
- **Kolorimetrické indikátory (colorimetric LAMP; cLAMP):** K detekci proběhlé LAMP reakce v tomto případě dochází na základě barevné změny. Barviva mohou být do reakční směsi přidána již při její přípravě, čímž se minimalizuje riziko zkřížené kontaminace (Tomita 2008). První

skupinou barviv jsou taková, která indikují výsledek reakce nepřímo, tj. přímo neinterferují s DNA. Druhou skupinou jsou metody vizualizace pomocí barviv přímo interagujících s DNA.

- **Kalcein** (angl. Calcein) je fluorescenční indikátor kovů. Před přidáním do reakce je kalcein smíchán s ionty manganu, díky jejich vazbě je fluorescenční signál zhasen (oranžová barva). V průběhu reakce dochází k produkci pyrofosfátových iontů, díky kterým jsou manganové ionty z kalceinu vyvázány, což vede k tvorbě fluorescenčního signálu (zelená barva). Následně kalcein naváže přítomné hořečnaté kationty, což ještě zvýší fluorescenční signál (viz Obrázek 6) (Tomita *et al.*, 2008). Bylo však zjištěno, že kalcein má relativně vysoký detekční limit cca 100 kopií cílového úseku DNA, tím snižuje celkovou senzitivitu reakce (Zhang *et al.*, 2014).

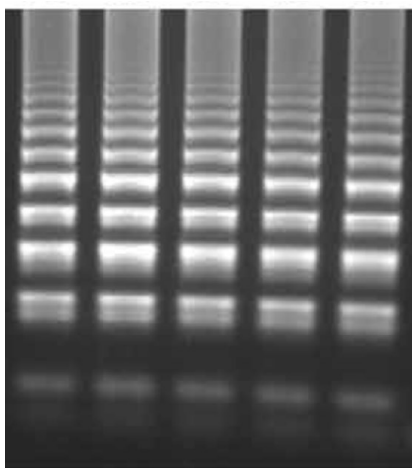


Obrázek 6: Schéma vizualizace LAMP reakce pomocí kalceinu, převzato z Tomita *et al.*, 2008

- **Hydroxynaftolová modř** (HNB, z angl. hydroxynaphtholon blue) je indikátor vápníku a kovů alkalických zemin, a je využíván např. při titraci. Barevná změna HNB je závislá na koncentraci hořečnatých iontů. Ty se v průběhu reakce vážou na vznikající pyrofosfát, čím se snižuje jejich koncentrace, což vede k barevné změně z tmavě fialové na modrou barvu (Goto *et al.*, 2009). Bylo však pozorováno, že působením tohoto barviva dochází ke snížení citlivosti reakce z důvodu její částečné inhibice (Wastling *et al.*, 2010).
- **Indikátory změny pH:** společně se vznikem pyrofosfátových iontů v průběhu amplifikace DNA dochází i k uvolňování vodíkových iontů. To vede ke snížení pH reakční směsi, proto lze využít k detekci proběhlé reakce barviva, která na tuto změnu reagují (Tanner *et al.*, 2015). Jedná se např. o:
 - **Fenolová červeň** (z angl. Phenol Red) (Daskou *et al.*, 2019)
 - **Xylenolová oranž** (z angl. Xylenol Orange) (Jaroenram *et al.*, 2019)
 - **Kresolová červeň** (z angl. Cresol red) (Buddhachat *et al.*, 2021)
 - **Neutrální červeň** (z angl. Neutral Red) (Nolasco *et al.*, 2021)

NINA-LAMP (non-instrumented nucleic acid amplification): Na základě kolorimetrické LAMP eseje využívající pH indikátory byl vytvořen systém pro detekci bez využití přístrojového vybavení vyžadujícího elektrinu. Pro tyto účely bylo vyvinuto přenosné zařízení, udržující konstantní teplotu díky exotermické reakci, které umožňuje „point-of-care“ diagnostiku i v místech, kde není dostupná elektrina (Singleton *et al.*, 2014). Tento systém byl využit např. pro diagnostiku filarióz v endemických oblastech (Poole *et al.*, 2017).

- **Interkalační barviva:** Interkalační barviva vizualizují přímo molekuly DNA, protože s ní interagují. Výše zmíněné metody detekovaly výsledek pouze nepřímo, tj. sledovaly změny chemických vlastností roztoku spojené s průběhem reakce. Nevýhodou interkalačních barviv může být, že se přidávají až po proběhnutí reakce, aby nedocházelo k inhibici, což zvyšuje riziko kontaminace (Goto *et al.*, 2009). Existují i modifikace, při kterých je barvivo přidáno před proběhnutím reakce, je však ve zkumavce prostorově odděleno od zbytku reakční směsi např. pomocí voskové zátky (Liang a Keeley *et al.*, 2013), je přidáno jako kapka na stěnu zkumavky (Lai *et al.*, 2021), nebo je v gelové kapsli (Karthik *et al.*, 2014) a k promíchání dochází až po ukončení reakce. Tato barviva jsou viditelná i pouhým okem, avšak silný fluorescenční signál produkují v UV spektru. Jedná se o následující barviva:
 - **SYBR Green I** (Lai *et al.*, 2021).
 - **GelRed** (Galvez 2020).
 - **Pico Green:** (Wastling *et al.*, 2010)
 - **GeneFinder** (Almasi *et al.*, 2013).
 - **Ethidiumbromid** (Wastling *et al.*, 2010).
 - **Malachitová zeleň** (Nzeli *et al.*, 2016)
- **Gelová elektroforéza:** Jejím principem je rozdělení DNA fragmentů dle jejich velikosti, k tomu je využíván agarózový gel s přidaným barvivem. Jedná se o ethidiumbromid, který je však toxický, proto je využíván i SYBER Green. LAMP produkty na gelu vytváří typický žebříkovitý motiv (viz Obrázek 7), jelikož při reakci vznikají různě velké produkty (viz Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP, str. 9) (Iwamoto *et al.*, 2003; Le *et al.*, 2012).



Obrázek 7: LAMP produkty vizualizovány pomocí gelové elektroforézy, upraveno dle Dao Thi et al., 2020.

- **Real-time metody:** Výše popsaná barviva jsou využívána pro tzv. „endpoint“ determinaci, při které je výsledek reakce pozorován až po jejím ukončení. Existují však metody, jež umožňují sledovat vznik produktu v reálném čase. První přístupem je modifikace výše popsaného pozorování precipitátu, tzv. **Real-time turbidimetrie** pomocí přístroje, který dokáže udržet konstantní teplotu a zároveň měřit turbiditu (Mori *et al.*, 2004) Výsledkem měření je pak křivka závislosti turbidity na čase. Tato metoda sice umožňuje kvantifikaci produktu, avšak může vykazovat nízkou senzitivitu způsobenou různou velikostí částic precipitátu a opětovného rozpuštění (Chuang *et al.*, 2012). Některá **fluorescenční barviva** jsou taktéž využitelná při real-time monitoringu reakce, u některých však dochází k inhibici amplifikace. Nejčastěji využívaným barvivem je v tomto případě SYBR Green díky své snadné dostupnosti a rychlosti interkalace (Zhang *et al.*, 2014).
- **Elektrochemické čipy a senzory:** Tyto metody nejsou založeny na měření optického signálu, nýbrž na měření elektrochemických vlastností, konkrétně proudu. Ten se mění v závislosti na vazbě elektrochemicky aktivních látek na dsDNA, kterými mohou být i některá barviva např. Hoechst 33258, HNB nebo methylenová modř, při jejichž vazbě na DNA dochází k detekovatelnému poklesu proudu. Změna proudu je pak měřena pomocí čipu či senzoru. Aby bylo sníženo nebezpečí vzniku kontaminace, bylo vytvořeno zařízení umožňující zároveň amplifikaci i detekci (Ferguson *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Safavieh *et al.*, 2012). Vznik produktu dokonce lze sledovat i v reálném čase, což umožňuje jeho kvantifikaci (Hsieh *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2014; shrnuto v přehledovém článku Zhang *et al.*, 2014).

Sekvenčně závislé metody

LAMP metoda je díky využití 6 primerů vysoce specifickou metodou, takto vysoký počet dlouhých primerů (≥ 40 bp) však s sebou přináší riziko v podobě vzniku falešně pozitivních výsledků, jejichž příčinou je amplifikace nespecifických produktů i bez přítomnosti cílové DNA (Lee *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). Sekvenčně závislé metody umožňují specifickou detekci amplikonů, čímž snižují riziko

vzniku falešné pozitivivity (Hardinge *et al.*, 2019). Jejich mechanismus může být založen na modifikovaných primerech nebo próbách (např. QUASR LAMP, HyBeacon próby, FLOS-LAMP atd.), na vazbě protilátek (např. LAMP-ELISA, LFD-LAMP atd.) nebo na vazbě magnetický kuliček a separace v magnetickém poli (např. AC susceptibility LAMP), na měření elektrochemických vlastností (Nanopore sequencing, amperometrie) atd. Všechny metody byly shrnuty v přehledovém článku Becherer *et al.*, 2020. Níže jsou blíže popsány metody s největším potenciálem pro využití při rutinním monitoringu.

- **Lateral-flow dipstick (LFD):** jedná se o imunochromatografickou techniku založenou na zachycení antigenu pomocí protilátek a následovaném barvením pomocí sekundární protilátky. **LFD-LAMP** využívá modifikované primery s navázaným biotinem, který slouží k zachycení vzniklých amplikonů pomocí protilátek umístěných na testovacím proužku. Dále je využita sekvenčně specifická próba s navázanou značkou, na kterou se po vazbě na amplikony váže sekundární protilátka spojená se zlatem. Pozitivní výsledek se pak jeví jako barevný proužek (Nimitphak *et al.*, 2008). Tato metoda byla v parazitologii využita např. při detekci prvoka *Toxoplasma gondii* (Xue *et al.*, 2021), nebo motolice *Paragonimus westermani* (Xunhui *et al.*, 2019).
- **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA):** Do vznikajících amplikonů jsou při LAMP-ELISA reakci inkorporovány nukleotidy značené digoxigeninem. Podobně jako u LFD-LAMP dochází k imobilizaci LAMP produktu, v tomto případě však díky specifické próbě, která je vazbou biotin-streptavidin přichycena na stěnu jamky. Po odmytí nenavázaných amplikonů dochází k vizualizaci pomocí např. křenové peroxidázy, nebo jinými běžně využívanými postupy. Výhodou této metody je její flexibilita a snadné zpracování až několika stovek vzorků najednou (Lee *et al.*, 2009; Ravan a Yazdanparast, 2012). Nevýhodou je však nutnost trénovaného personálu, drahých ELISA kitů a zvýšené riziko kontaminace (Zhang *et al.*, 2014). Tato metoda nebyla v parazitologii zatím využita.
- **Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters (QUASR):** patří do skupiny metod založených na detekci pomocí fluorescenčních značek na specifických próbách nebo primerech; pozitivním výsledkem je fluorescenční signál (shrnuto v přehledovém článku Becherer *et al.*, 2020). Mechanismus metody QUASR je založen na primerech s navázanou fluorescenční značkou, jejíž signál je zhasen pomocí tzv. zhasací próby. Po inkorporaci primerů do vznikajících amplikonů jsou zhasací próby odvázané za vzniku fluorescenčního signálu. Při použití různých barevných značek lze detekovat několik sekvenčně rozdílných amplikonů v rámci jedné reakce, např. virus Chikungunya a virus Západonilské horečky (Ball *et al.*, 2016).
- **Elektrochemické biosenzory:** Stejně jako v případě elektrochemických čipů nebo senzorů (viz výše) je detekce pomocí elektrochemických biosenzorů založená na změně elektrochemických vlastností, rozdíl je však ve využití specifických prób imobilizovaných na měřicích elektrodách. Lze tak detekovat až 6 různých amplikonů v rámci jedné reakce (Nakamura *et al.*, 2007).

2.4 Vývoj a testování LAMP eseje

Tato podkapitola pojednává o různých přístupech při vývoji detekční metody, popisuje různé přístupy při výběru molekulárních markerů, testování specifity, senzitivity.

2.4.1 Volba molekulárních markerů a design primerů

Volba molekulárních markerů, tedy sekvencí, na které bude detekční molekulární metoda cílit, musí splňovat několik základních vlastností. První z nich je specifita: V esejích, které jsou založeny na „single-gene“ detekci (nikoliv metabarcodingu), volba sekvence zásadně ovlivňuje specifitu, tj. při detekci konkrétního druhu musí být zvolená sekvence specifická pro konkrétní druh, např. SjR2 repetitivní retrotranspozony pro druh *Schistosoma japonicum* (Xu *et al.*, 2010), nebo např. ITS-1 při detekci celého rodu *Schistosoma* (Fernández-Soto *et al.*, 2020). Při vývoji metody založené na eDNA je vhodné volit takové sekvence, které jsou v buňce zastoupeny v hojném počtu kopií a zároveň jsou krátké, jelikož v prostředí dochází k degradaci molekul DNA. Při využití LAMP eseje musí sekvence umožňovat design primerů tak, aby nevznikaly „primer-dimers“ a nedocházelo tak k falešné pozitivě v případě použití sekvencně nezávislých vizualizačních metod. V dnešní době lze pro návrh primerů pro LAMP použít online dostupné programy, např. Primer Explorer V5 (<https://primerexplorer.jp/e/>) a NEB LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com/#/>).

2.4.2 Testování specifity

Testování specifity slouží k potvrzení amplifikace targetových sekvencí a zároveň amplifikace nespecifické. Specifitu eseje v prvních krocích lze předběžně určit *in silico* pomocí např. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Dále byly pro testování eseje *in silico* vyvinuty nástroje, které modelují průběh reakce, tzv. „electric LAMP“ (Salinas *et al.*, 2012). Byly vytvořeny matematické modely pro predikci falešné positivity na základě predikce vzoru produktů na gelové elektroforéze (Schneider *et al.*, 2019). V laboratoři je pak specifita testována na vzorcích izolované DNA z detekovaného organismu a pro vyvrácení zkřížené reaktivity jsou využívány příbuzné druhy.

2.4.3 Testování senzitivity

Senzitivita molekulární detekční metoda je rovna minimálnímu množství cílové DNA v reakci, při které ještě dojde reakci. Testování senzitivity nebo také limit detekce (angl. Limit of Detection, LoD) se v různých pracích liší, autoři navíc využívají odlišné jednotky, někteří měří senzitivitu v množství DNA vyjádřenou v její hmotnosti např. fg (Xu *et al.*, 2015), dalším přístupem je využití rekombinantních plasmidů, přičemž je citlivost vyjádřena v počtu kopií cílové sekvence na reakci (Daskou *et al.*, 2019; Lai *et al.*, 2021).

3 MATERIÁL A METODIKA

Cílem práce bylo vytvořit molekulární metodu detekce původců cercáriové dermatitidy na principu filtrace eDNA a následné izotermální amplifikace pomocí cLAMP. Práce byla rozdělena na tři části. V první části bylo cílem nalézt specifické sekvence DNA pro rod *Trichobilharzia*, nejčastější původce CD, a navrhnout sadu primerů pro cLAMP. V druhé části bylo cílem otestovat specificitu a senzitivitu (detekční limit) navržené sady primerů pro kolorimetrickou LAMP eseje (cLAMP). Ve třetí části byla testována funkčnost navržené molekulární metody LAMP s metodou filtrování eDNA z vytipovaných lokalit.

3.1 Použité molekulární techniky

V průběhu práce byly využity různé molekulární techniky jako PCR, gelová elektroforéza a sekvenace. Jejich popis byl vyčleněn na začátek kapitoly pro snadné odkazování v textu.

3.1.1 Příprava materiálu a izolace DNA

Pro molekulární analýzu byly využity fixované vzorky (96% etanol) cercárií nebo hepatopankreatu infikovaných plžů se sporocystami. Fixáž byla před izolací DNA odstraněna pomocí centrifugace (5 min, 16 000 g) a odsátí supernatantu. Pro izolaci DNA byl využit komerční kit (GeneAll® Exgene™ Tissue SV plus). Koncentrace získané DNA byla měřena pomocí spektrometru ND-1000, nebo NanoDrop™ One (ThermoFisher Scientific). Po izolaci byla DNA skladována v PCR H₂O (Top-Bio) při teplotě – 20°C. (Dvořák *et al.*, 2002).

PCR protokol

Celkový objem reakční směsi byl 25 µl a skládal se z 12,5 µl EmeraldAmp Max PCR Master Mix (TakaraBio), 0,5 µl 10 µM primeru forward, 0,5 µl 10 µM primeru reverse (Merck), 50 ng DNA (odpovídající objem dle koncentrace) a směs byla doplněna vodou do finálního objemu.

Samotná PCR reakce probíhala v přístroji My Cycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Výsledek PCR reakce byl vyhodnocován pomocí gelové elektroforézy.

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza probíhala ve vaničce Owl EASYCAST™ B1A (Thermo Scientific Owl) se zdrojem (CONSORT E132). Do 2% agarózového gelu (40 ml) bylo vmícháno 40 µl fluorescenčního barviva SYBR Green I. Po zatuhnutí byl do jednotlivých jamek napipetován celý reakční objem. Jako marker byl použit ΦX174 DNA-HaeIII Digest (BioLabs) nebo Quick_Load Purple 100 bp DNA Ladder (BioLabs). Celá reakce probíhala při 110 V po dobu 30 až 45 min. V Při pozitivním výsledku byly proužky o požadované velikosti z gelu vyřezány a byla z nich izolována DNA pomocí Monarch DNA gel Extraction #T1020G (BioLabs). Tato DNA byla využita v sekvenační analýze.

3.1.2 Sekvenační analýza

Příprava vzorků na sekvenační reakci

Celkový objem sekvenační reakce byl 8 μ l: 0,5 μ l 10 μ M roztoku primerů, DNA v množství 5ng/100bp a voda pro doplnění do celkového objemu. Po namíchání byl vzorek sekvenován v Sekvenační laboratoři PřF UK v Praze.

Vyhodnocení výsledků sekvenační reakce

Výsledky sekvenační analýzy byly vyhodnocovány pomocí programu Geneious Prime[®] 2022.1.1.

3.1.3 Druhá determinace pomocí barcodingu

Nalezení mezihostitelští plži (viz Tabulka 3 a Tabulka 4), cercárie nebo jiná parazitární stádia z tkání MH i DH (viz (viz Tabulka 1 a Tabulka 2) byli determinováni na základě PCR a následné sekvenace. Sekvence anotovány pomocí databáze NCBI za použití aplikace BLAST[®] (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pro potvrzení druhové příslušnosti.

Tabulka 1: sada ITS primerů pro PCR pro druhovou determinaci motolic (Dvořák et al., 2002)

| Název primeru | Sekvence 5' - 3' | Oblast |
|---------------|------------------------|--------|
| ITS4TREM | TCCTCCGCTTATTGATATGC | ITS |
| ITS5TREM | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG | ITS |

Tabulka 2: PCR protokol pro ITS primery pro druhovou determinaci motolic (Dvořák et al., 2002)

| Parazitární ITS | | |
|-----------------|----------|-------------|
| Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
| 95 | 5 min | 1 |
| 95 | 60 s | |
| 50 | 45 s | 35 |
| 72 | 120 s | |
| 72 | 10 min | 1 |
| 4 | ∞ | 1 |

Tabulka 3: sada primerů pro ITS-2 použité pro druhovou determinaci MH (Almeyda et al., 2000)

| Název primeru | Sekvence 5' - 3' | Oblast |
|---------------|-----------------------|--------|
| ITS-2 RIXO | TTCTATGCTTAAATTCAGGGG | ITS-2 |
| ITS-2 NEWS | TGTGTCGATGAAGAACGCAG | ITS-2 |

Tabulka 4: PCR protokol por ITS-2 primery

| ITS-2 MH | | |
|--------------|--------|-------------|
| Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
| 94 | 10 min | 1 |
| 94 | 30 s | |
| 50 | 30 s | 30 |
| 72 | 60 s | |
| 72 | 7 min | 1 |
| 4 | ∞ | 1 |

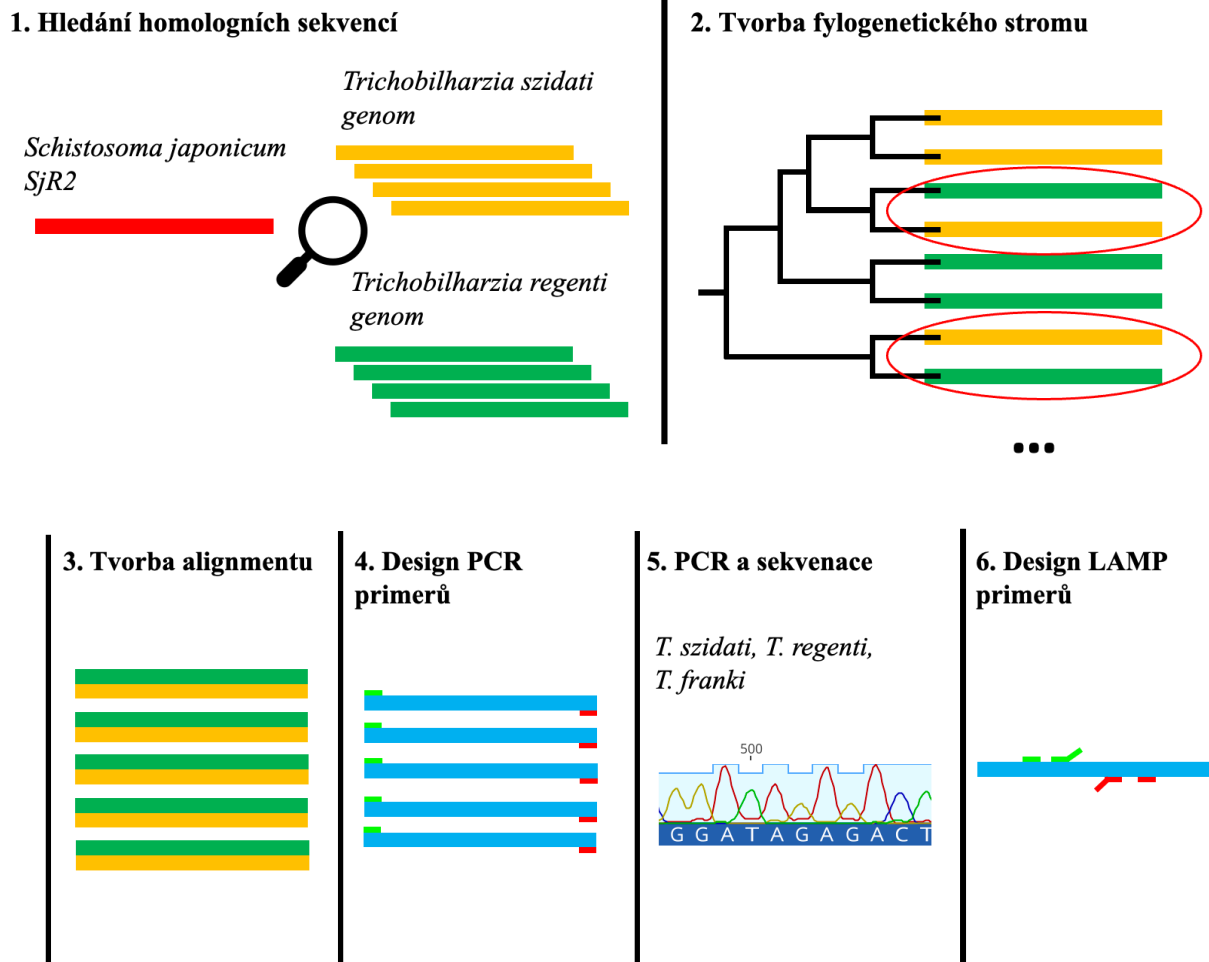
3.2 Vývoj LAMP eseje

3.2.1 Molekulární analýza

Sekvence vhodné pro amplifikaci byly hledány v genomu *Trichobilharzia szidati* ([GCA_944472155.2](#)) a genomu *T. regenti* ([GCA_900618515](#)) (vypracoval Roman Leontovyč). Cílem bylo nalezení homologních sekvencí k sekvencím, jež byly použity při LAMP detekci lidských schistosom, konkrétně repetitivní retrotranspozony u *Schistosoma japonicum* SjR2 (Xu *et al.*, 2010; AF412221). Veškerá následující bioinformatická analýza byla prováděna pomocí programu Geneious. Byly nalezeny fylogeneticky blízké sekvence pro oba druhy (*T. szidati* a *T. regenti*), a to na základě fylogenetického stromu vytvořeného metodou maximum likelihood za použití modelu Tamura-Nei. Po určení sekvenční shody mezi sekvencemi jednotlivých druhů byl vytvořen alignment pomocí Geneious Alignment (Global alignment with frees and gaps).

Sekvenčně shodné úseky byly použity pro navrhování primerů pro PCR. Bylo navrženo celkem 5 sad primerů (viz Tabulka 7, str. 28). Byla provedena PCR reakce se vzorky tří druhů (*T. szidati*, *T. regenti* a *T. franki*) (viz

Tabulka 8 a Tabulka 9, str. 29) se všemi pěti sadami primerů pro PCR. Negativní kontrola obsahovala všechny komponenty reakce kromě templátové DNA. Vzniklé amplikony byly sekvenovány a pomocí alignmentu byla zjišťována jejich sekvenční shoda. Na základě konsenzuální sekvenční shody třech druhů rodu *Trichobilharzia* byla navržena sada primerů pro LAMP (schéma pracovního postupu viz Obrázek 8).



Obrázek 8: Schéma pracovního postupu při molekulární analýze a designu LAMP primerů pro rod *Trichobilharzia*. V prvním kroku byly hledány homologní sekvence k *SjR2* v genomech dvou druhů motolic – *Trichobilharzia szidati* a *Trichobilharzia regenti* (1. Hledání homologních sekvencí). Z nalezených sekvencí byly pomocí fylogenetického stromu hledány dvojice podobných sekvencí (2. Tvorba fylogenetického stromu). Na základě jejich alignmentu byly vybrány ty s největší homologií (3. Tvorba alignmentu). Na vybrané sekvence byly navrženy primery pro PCR (4. Design PCR primerů). Bylo provedeno PCR a amplikony byly sekvenovány (5. PCR a sekvenace). Nakonec byla vybrána jedna sekvence pro design primerů pro LAMP (6. Design LAMP primerů).

3.2.2 Design primerů pro kolorimetrický LAMP (cLAMP)

Sekvence získaná v předešlých krocích byla využita pro návrh sady primerů pro cLAMP reakci pomocí online softwaru Primer Design Tool NEB LAMP ver. 1.0.2. (<https://lamp.neb.com/#/>) a Primer Explorer V5 (<https://primerexplorer.jp/e/>) (viz Obrázek 11, str. 30 ve výsledcích).

3.2.3 Příprava reagensů pro cLAMP

K lyofilizovaným primerům (kapitola 3.2.2) byl dle pokynů výrobce (Merck Life Science spol. s.r.o.) přidán přesný objem PCR H₂O (Top-Bio) tak, aby koncentrace zásobního roztoku odpovídala 100 μM. Ze zásobního roztoku byly vytvořeny 50 μl alikvóty. Složení primermixu pro kolorimetrický LAMP je podrobně popsáno v Tabulka 5.

Tabulka 5: Složení primermixu pro kolorimetrický LAMP

| Primer | Objem [μl] |
|------------------|------------|
| FIP | 8 |
| BIP | 8 |
| F3 | 1 |
| B3 | 1 |
| LF | 2 |
| LB | 2 |
| H ₂ O | 28 |
| Celkový objem | 50 |

3.2.4 cLAMP protokol

Prvotní experimenty s kolorimetrickou esejí byly prováděny v celkovém reakčním objemu 25 μl (viz Tabulka 6), přičemž byl použit WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix. V průběhu práce byl kladen důraz na snížení ceny a praktičnost, proto byl reakční objem snížen na 15 μl (viz Tabulka 6). V následujících pokusech použit WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix s Uracil-DNA glykosylázou pro eliminaci falešně pozitivních výsledků v důsledku kontaminace produkty z předešlých reakcí (Patton *et al.*, 2021). Reakce probíhala v termobloku (Eppendorf, ThermoMixer C) při 65 °C po dobu 30 min.

Tabulka 6: složení reakční směsi pro kolorimetrický LAMP

| | Objem (25 μl) | Objem 2 (15 μl) |
|------------------|---------------|-----------------|
| Mastermix | 12,5 μl | 7,5 μl |
| Primermix | 2,5 μl | 1,5 μl |
| DNA | 1,0-5,0 μl | 1,0-6,0 μl |
| H ₂ O | Do 25 μl | Do 15 μl |
| Celkový objem | 25 μl | 15 μl |

Po proběhnutí reakce byly zkumavky schlazeny na ledu a vyfotografovány pomocí mobilního telefonu (iPhone SE 2020, Apple) a 3D vytištěného stojánku (Odkaz 4, design B.A. Jakub Mašek). Dle barevné změny byly kvalitativně odečteny výsledky – pozitivní reakce reprezentována žlutou barvou

reakční směsi, negativní výsledek reprezentován růžovou barvou. Pro potvrzení proběhlé amplifikace a přítomnosti výsledných produktů byla celá reakční směs využita pro gelovou elektroforézu (postup viz Gelová elektroforéza).

3.3 Testování specificity

3.3.1 Testování specificity cLAMP eseje

Cílem testování specificity navržené sady bylo vyvrátit možnost amplifikace DNA jiných druhů motolic a zároveň potvrdit schopnost amplifikovat více druhů ptačích motolic rodu *Trichobilharzia*. Za tímto účelem byly provedeny LAMP reakce s genomovou DNA různých druhů motolic: (1) byly využity zástupci rodu *Trichobilharzia* (*T. szidati*, *T. regenti*, *T. franki*, *T. filiformis*) z chovů a sbírek Helmintologické laboratoře PřF UK, (2) zástupci dalších rodů motolic mimo rod *Trichobilharzia* (*Echinostoma revolutum*; *Diplostomum pseudospataceum*; *Euparyphium* sp.; *Cotylurus* sp.; *Schistosoma mansoni*; *Apatemon* sp.; *Allobilharzia* sp.). Výběr druhového spektra byl ovlivněn dostupností materiálu ve sbírkách Helminotlogické laboratoře PřF UK.

3.4 Testování senzitivity cLAMP reakce

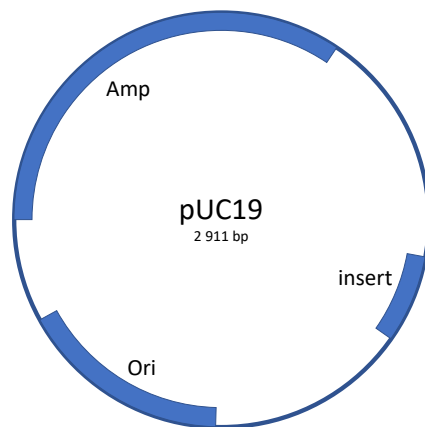
Experimenty navržené pro testování senzitivity cLAMP eseje si kladly za cíl ověřit schopnost amplifikace i malého počtu kopií, a tudíž možnost využití této metody pro amplifikaci eDNA.

3.4.1 Testování senzitivity pomocí PCR amplikonů

Senzitivita cLAMP byla testována na vzorcích DNA izolované z cercárií *T. szidati*. Vzorky izolované DNA byly využity pro PCR s krajními primery F3 a B3 (produkt 221 bp) (protokol PCR viz Tabulka 10). Produkty této reakce byly separovány pomocí gelové elektroforézy a izolovány. Pomocí QuantusTM fluorometru (Promega) byla změřena přesná koncentrace DNA ve vzorku (měření provedeno Sekvenační laboratoří PřF UK). Pomocí online softwaru Thermo-Fisher DNA copy number and dilution calculator (www.thermofischer.com) bylo připraveno 100 µl roztoku DNA o koncentraci 10⁹ kopií/µl. Po šestinásobném rozředění tohoto roztoku byla vytvořena desítková ředící řada až po roztok o koncentraci $\frac{1}{6}$ kopie/µl, tak aby po přidání 6 µl DNA do reakce bylo dosaženo cílového množství. Reakce probíhala při 65 °C po dobu 15, 20 nebo 30 min, pro optimalizaci času reakce.

3.4.2 Testování senzitivity pomocí plasmidové DNA

Senzitivita byla testována i na vzorcích plasmidové DNA. Prvním krokem pro vytvoření požadovaného plasmidu bylo navržení primerů pro PCR pomocí online softwaru (www.takarabio.com). Tyto primery sloužily pro vytvoření amplikonů s cílovou sekvencí pro cLAMP tak, aby byla ohraničena sekvencí pro spojení linearizovaného plasmidu. Po proběhnutí PCR byly amplikony separovány pomocí gelové elektroforézy (viz Gelová elektroforéza). Po jejich separaci byly amplikony vloženy do linearizovaného vektoru pUC19 s genem pro ampicilinovou rezistenci (schéma viz Obrázek 9). Pro potvrzení správného vložení byly plasmidy sekvenovány pomocí M13 primerů.



Obrázek 9: schéma plasmidového vektoru pUC19; Amp: gen pro ampicilinovou rezistenci, Ori: replikační počátek, Insert: cílová sekvence pro LAMP

Plasmidy byly vloženy do super kompetentních buněk *Escherichia coli* TOP10 (In-Fusion HD Cloning Kit dle protokolu výrobce) a inkubovány (50 μ l) přes noc při 37 °C na LB-agarózových plotnách s ampicilinem (100 μ l/ml). Narostlé kolonie byly přeneseny na nové plotny a zároveň namnoženy v LB mediu přes noc při 37 °C a 220 rpm. Následně byla z bakterií izolována plasmidová DNA pomocí Hybrid-Q Plasmid Rapidprep, GeneAll. Koncentrace DNA byla změřena v Sekvenační laboratoři PrF UK pomocí fluorometru Quantus. Přesný počet plasmidů v 1 μ l byl vypočten dle vzorce (Shi *et al.*, 2021; Obrázek 10):

$$C = \frac{X \times 10^9 \times N_A}{(A + Y) \times 660}$$

Obrázek 10: Rovnice pro výpočet koncentrace plasmidové DNA, C= koncentrace plasmidové DNA (počet plasmidů/ μ l), X= počet bází genu, A= počet bází plasmidu, N_A = Avogadrova konstanta, 660 = průměrná molekulová hmotnost dvojice nukleotidů; Shi *et al.*, 2021

Dle výsledné koncentrace plasmidové DNA byla připravena desítková ředící řada (od 10^{11} po 10^4 kopií na reakci). Do LAMP reakce (viz cLAMP protokol) bylo přidáno 1 μ l DNA o dané koncentraci. LAMP reakce byla provedena dle standardního protokolu (viz cLAMP protokol, str. 22). V dalším experimentu byla výsledek reakce fotografován v různých časových bodech (30 min, 40 min a 50 min) pro optimalizaci reakčního času. Po každém fotografování byla zkumavka vrácena do termobloku. Po 50 minutách byla reakce ukončena schlazením na ledu a byla provedena gelová elektroforéza.

3.5 Testování filtračního systému v laboratorních podmínkách

Pro filtrování eDNA byl zvolen komerční filtrační systém eDNA Dual Filter Capsules 0,8 μ m (Sylphium). Filtrování a izolace DNA z filtrů byly provedeny dle protokolu výrobce: Nejprve byly připraveny 15ml zkumavky s roztokem pro separaci fází. Současně byla připravena jedna zkumavka navíc pro tzv. vnitřní negativní kontrolu (z angl. „internal negative control“, INC). Dále byly připraveny 2ml mikrozkušavky s precipitačním roztokem, opět s jednou zkumavkou navíc pro INC. Z každé filtrační kapsle byla vysáta tekutina příslušnou stříkačkou, jež byla použita při odběru vzorku na lokalitě.

Tato tekutina byla přesunuta do 15ml zkumavek a do zkumavky pro INC byl přidán čistý S1 pufr. Zkumavky byly centrifugovány (4000 g, 5 min), po vytvoření dvou fází byla pipetována horní vodní fáze (1 ml) do připravených 2ml zkumavek. Pro precipitaci DNA byly zkumavky vloženy na 20 min do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a centrifugací (45 min, 16100 g) byla DNA formována do peletu na dně zkumavky. Po odsátí supernatantu a promytí promývacím pufrem byl DNA pelet resuspendován v PCR H_2O (Top-Bio). Koncentrace DNA byla měřena pomocí Nanodrop One spektrofotometru.

3.5.1 Testování senzitivity filtračního systému

Pro otestování citlivosti filtračního systému v kontrolovaných podmínkách laboratoře byly živé cercárie *T. szidati* vloženy v počtu 0, 1, 10, 100 a 1000 cercárií do 1 litru kohoutkové autoklávované vody, kde byly ponechány týden při pokojové teplotě. Voda byla přefiltrována pomocí eDNA Dual Filter Capsules $0,8\text{ }\mu\text{m}$ (Sylphium). DNA byla izolována pomocí protokolu výrobce viz kapitola 3.4. Následně byla provedena cLAMP reakce dle cLAMP protokolu, přičemž do reakční směsi byly přidány $2\text{ }\mu\text{l}$ DNA. V experimentu byly využity dvě negativní kontroly: (1) negativní kontrola (N) byla složena z mastermixu, primermixu (kontrola kontaminace při amplifikaci) a vody, (2) vnitřní negativní kontrola skládající se z mastermixu, primer mixu a INC získaný při izolaci DNA z filtru

3.6 Terénní sběry eDNA na lokalitách

Na vybraných lokalitách byly sbírány vzorky dvou typů: (1) vzorky vodních plžů, (2) odběr eDNA pomocí filtrace.

3.6.1 Odběr eDNA pomocí filtrace

Vytvořený systém cLAMP a filtrace eDNA pomocí filtračních kapslí byl testován na terénních lokalitách v ČR. Vodní plochy byly vybírány buď na základě hlášení o výskytu CD pomocí dotazníků SZÚ, dále na základě hlášených případů z předešlých let, nebo osobního sdělení. Odběr samotných vzorků byl na lokalitě prováděn v oblasti litorálu (dle přístupnosti) dle následujícího postupu:

1. Vytipování odběrového místa: dle návětrné strany, přítomnosti plžů, přístupnosti vody pro koupání
2. Měření pH, konduktivity, teploty, obsahu chlorofilu a průhlednosti
3. Sestavení aparatury
4. Filtrace vody s dílčími odběry (60 ml) vždy po cca 10 m.
5. Sběr vodních plžů

Pro správný odběr je nutno dodržet pořadí těchto kroků z důvodu zamezení rozvíření usazenin ze dna před filtrací a následného ucpávání filtrační aparatury. Konduktivita, teplota a pH byly měřeny pomocí Waterproof tester (Hanna instruments), množství chlorofylu bylo měřeno fluorometrem FluoroSense (Turner designs). Průhlednost vodního sloupce byla měřena pomocí Secchiho desky.

Izolace DNA z filtrů probíhala dle protokolu výrobce, přičemž byla DNA rozpuštěna v PCR H_2O (Top-Bio). Vzorky byly využity pro cLAMP. Do reakce bylo použito $6\text{ }\mu\text{l}$ nebo $2\text{ }\mu\text{l}$ DNA. Byly využity dvě negativní kontroly, negativní kontrola amplifikace (N) a vnitřní negativní kontrola (INC) (viz 3.5.1)

Jako negativní kontrola odběrů byla filtrována voda v jezírku ve skleníku Botanické zahrady PřF UK. Jelikož se jedná o uzavřený skleník, je zamezen přístup DH ptačích motolic, a tudíž je minimální šance výskytu původců cercáriové dermatitidy.

3.6.2 Sběr vodních plžů

Sběr vodních plžů probíhal dle metodiky popsané v normě ČSN 757727. Pro účely této práce je tato metoda popsána ve zkrácené formě: Před samotným sběrem vodních plžů byl na každé lokalitě zmapován terén, tj. určení míst vhodných pro vstup do vody a pro koupání (případně místa hlášení CD), určení návětrné strany, určení vlastnosti dna v příbřežních oblastech atd. Pro samotný sběr byly využity ochranné pomůcky „brodící kalhoty“ a ochranné rukavice. Sběr vodních plžů pak probíhal rukou či kovovým cedníkem s prodlouženou rukojetí. Plži byli již na lokalitě třizeni do nádob dle druhu a velikosti. Převoz vodních plžů probíhal v uzavíratelných nádobách se širokým hrdlem s minimem vody (pouze po dně). V laboratoři byly vodní plži opláchnuti pod tekoucí kohoutkovou vodou a individuálně vloženi do malého objemu vody pod silný zdroj světla. Po uplynutí 60 min byly jednotlivé nádoby vyšetřeny na přítomnost ocelátních furkocerkárií, které byly rodově determinovány na základě morfologie pod světelným mikroskopem. V případě pozitivního nálezu byly cercárie fixovány v 96% etanolu, přičemž tento materiál sloužil k následné molekulární determinaci pomocí sekvenace ITS2 úseku a porovnání s databází NCBI (viz Sekvenační analýza, str. 19).

3.6.3 Finanční náklady

Finanční náklady pro detekční test jedné lokality byly vypočteny na základě aktuálních cen, přičemž cena s 21 % DPH byla vydělena počtem reakcí obsahující jedno balení. Cena jedné reakce se skládá z mastermixu, primerů, filtrů a izolačního kitu. Do celkové ceny nebyla započtena cena laboratorního plastiku, vody a energií. Byla vypočtena cena triplikátu: cena jedné reakce + dvakrát cena mastermixu a dvakrát cena primerů. Celková nákladnost metod sběru a vyšetřování vodních plžů s metodou cLAMP, byla vypočtena jako náklady na materiál a časová náročnost metody krát hodinová mzda, jež byla orientačně určena jako 250 Kč/hod.

3.7 Analýza produktů cLAMP pro falešnou pozitivitu

3.7.1 Cílem tohoto experimentu bylo ověřit, zda pozitivní výsledek cLAMP reakce ze vzorků odebraných na lokalitách je důsledkem přítomnosti DNA detekovaného parazita, či amplifikace nespecifického produktu (Wang *et al.*, 2015). Za tímto účelem byla navržena sada primerů pro PCR (viz Obrázek 22, str. 43 a Tabulka 14), jež specificky amplifikuje úsek cílové DNA, na který nenesedá žádný z primerů pro cLAMP. Materiálem pro PCR reakci byly amplicony z pozitivních reakcí označených hvězdičkou v Filtraci eDNA na lokalitách a cLAMP reakce

Na vybraných lokalitách byly odebírány vzorky eDNA pomocí filtrace vody. Výsledky cLAMP reakce odpovídaly výsledkům sběrů a vyšetřování vodních plžů jen ve dvou případech (2.1. a 4). U ostatních pokusů (1.1, 1.2, 2.2, 3, 5) nebyly výsledky jednoznačné, výsledek alespoň jedné reakce

neodpovídal výsledku ze sběru plžů. V jednom z případů (1.3) byli všichni nalezení plži negativní, ačkoliv 5 ze 6 cLAMP reakcí ukázaly pozitivní výsledek. Naopak u vzorku 6 bylo i přes pozitivní sběr plžů 5/6 reakcí cLAMP negativní, nejspíše kvůli malému objemu přefiltrované vody. Výsledky u sběru 2.2 jasně ukazují vliv objemu DNA přidaného do reakce, tedy snížené citlivosti při přidání pouze 2 μ l DNA, avšak tento výsledek nebyl patrný u ostatních reakcí. Vzorky odebrané na lokalitě potvrzují problém s kontaminací, jelikož 2 z 5 reakcí byly pozitivní, ačkoli byly odebrány na lokalitě bez výskytu původců CD. Popsané výsledky shrnuje Tabulka 13.

Tabulka 13, str. 41. Po separaci gelovou elektroforézou byly izolovány dva nejintenzivněji fluoreskující proužky. PCR reakce probíhala dle protokolu v Tabulka 1. Vzniklé produkty této reakce byly sekvenovány, přičemž v datech byly hledány místa nasedání navržených primerů.

3.8 Amplifikace DNA bez izolace DNA

Použitá metoda cLAMP byla testována pro schopnost amplifikovat cílovou DNA z celých cercárií bez použití izolace DNA. Materiál využitý v tomto experimentu byly cercárie fixované v 96% etanolu, proto bylo nutné nejdříve cercárie převést do vody. Poté byly pomocí stereoskopického mikroskopu a pipety vybírány jednotlivé cercárie. Ty byly jednotlivě v 6 μ l přeneseny do 200 μ l zkumavek, kde byla následně připravena reakční směs pro cLAMP. Reakce probíhala standardně viz cLAMP protokol, str. 22. Výsledky byly kontrolovány pomocí gelové elektroforézy viz Gelová elektroforéza, str. 18.

4 VÝSLEDKY

4.1 Vývoj LAMP eseje

4.1.1 Molekulární analýza

Na základě literatury byla vybrána sekvence repetitivního reprotozozonu SjR2 (AF412221) použitá pro LAMP na *S. japonicum* (Xu *et al.*, 2010). V genomech *T. szidati* a *T. regenti* byly nalezeny homology k této sekvenci (vypracoval R. Leontovyč). Z vybraných homologních sekvencí *T. regenti* a *T. szidati* byl vytvořen fylogenetický strom na základě kterého bylo zvoleno 5 dvojic sekvencí s největší mezidruhovou homologií. Pro každou dvojici sekvencí *T. regenti* a *T. szidati* byly na úsecích se 100% homologií navrženy primery pro PCR (viz Tabulka 7) společně s PCR protokolem (viz Tabulka 8 a Tabulka 9). Produkty vzniklé z PCR se třemi druhy (*T. szidati*, *T. regenti* a *T. franki*), byly sekvenovány a na základě jejich alignmentu byla na základě nejvyšší homologii zvolena sekvence (1096 bp) amplifikovaná sadou primerů č. 3. (viz Příloha 1) pro design LAMP primerů.

Tabulka 7: 5 sad primerů pro PCR pro 5 homologních sekvencí nalezených v genomech *T. szidati* a *T. regenti*

| Číslo sady | Směr | Sekvence 5' - 3' | Délka produktu [bp] |
|------------|---------|------------------------|---------------------|
| 1 | forward | CCAGTGGTGTCCGTCAAGG | 947 |
| | reverse | ACGATTTTGAGCCATGTCACC | |
| 2 | forward | ACCAGTGGTGTCCGTCAAG | 947 |
| | reverse | AACGATTTTGAGCCATGTCACC | |
| 3 | forward | CAGCTTGTTCTGGTCGGAGT | 1096 |
| | reverse | AAGTGGAGACGGAGCCTACT | |
| 4 | forward | AGTAGGCTCCGTCTCCACTT | 713 |
| | reverse | TCAGCCGATGTGCCTTCTTT | |
| 5 | forward | TGGTCTGAACCCACATCTGC | 665 |
| | reverse | GGTAGCCGCAGAAATGAGGA | |

Tabulka 8: Protokol PCR pro sadu primerů č. 1-3 aplikující homologní sekvence nalezené v genomech *T. szidati* a *T. regenti*

| Sada 1-3 | | |
|-----------------|--------|-------------|
| Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
| 95 | 5 min | 1 |
| 95 | 60 s | |
| 61 | 45 s | 35 |
| 72 | 120 s | |
| 72 | 10 min | 1 |
| 4 | ∞ | 1 |









Tabulka 9: Protokol PCR pro sadu primerů č. 4-5, aplikující homologní sekvence nalezené v genomech *T. szidati* a *T. regenti*.

| Sada 4-5 | | |
|-----------------|--------|-------------|
| Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
| 95 | 5 min | 1 |
| 95 | 60 s | |
| 61 | 45 s | 35 |
| 72 | 60 s | |
| 72 | 10 min | 1 |
| 4 | ∞ | 1 |

4.1.2 Design primerů pro kolorimetrický LAMP

Na konsenzuální sekvenci tří druhů (*T. szidati*, *T. regenti* a *T. franki*) byla navržena sada primerů pro cLAMP esej specifickou pro rod *Trichobilharzia* (viz Obrázek 11). Bylo navrženo 6 primerů (FIP, BIP, F3, B3, LF, LB) na celkem 8 úsecích sekvence dlouhé 221 bp; FIP byl se skládal ze dvou úseků: F2 a F1c (komplementární), ostatní primery se skládaly pouze z jednoho úseku (odpovídající názvu sekvence). Navržená sada obsahovala i dvojici „loop primerů“. Primery jsou barevně rozlišené na Obrázek 11.

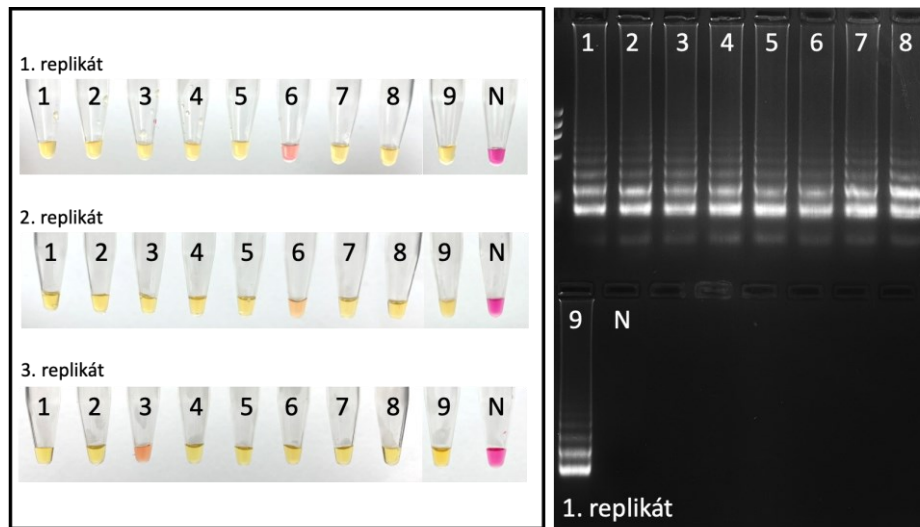
```
5'ACCAGGTAACCTTTCCTCCAAGTCAGTAGGCACCTTCCCTCCTTCCAGATCTTTT
GCAATAATGGAGTCAGCATATCTGCTGTCGTTTCTGGGTCCGCTTTCAGTGCTTCC
GGGGGTATTCCATCTGGTCCAGCTGCTTTTCAGCTTTCAGAAGCTTGATTGCATT
CATGACTTCAGTTTCGTTGGAGGATTGGTGTCAACTTGCAGTTGTGTACGTGC3'
```

| | Sekvence 5' - 3' | barva |
|------------|---|---|
| F3 | ACCAGGTAACCTTTCCTCCA |  |
| B3 | GCACGTACACAACCTGCAAGT |  |
| FIP | GGACCCAGAAACGACAGCAGAT TCAGTAGGCACCTTCCCTC | |
| F2 | TCAGTAGGCACCTTCCCTC |  |
| F1c | GGACCCAGAAACGACAGCAGAT |  |
| BIP | TTCCATCTGGTCCAGCTGCTTT GACACCAATCCTCCAACGAA | |
| B2 | GACACCAATCCTCCAACGAA |  |
| B1c | TTCCATCTGGTCCAGCTGCTTT |  |
| LF | GCTGACTCCATTATTGCAAAAGATC |  |
| LB | TCCAGCTTTCAGAAGCTTGA |  |

Obrázek 11: primery pro cLAMP reakci specifickou pro rod *Trichobilharzia*. Celkem bylo navrženo 6 primerů aplikujících 221 bp dlouhý produkt. Pozice primerů je barevně vyznačena. Primer FIP je přitom složen ze dvou různých sekvencí (F2 a F1c), obdobně tomu je i u BIP.

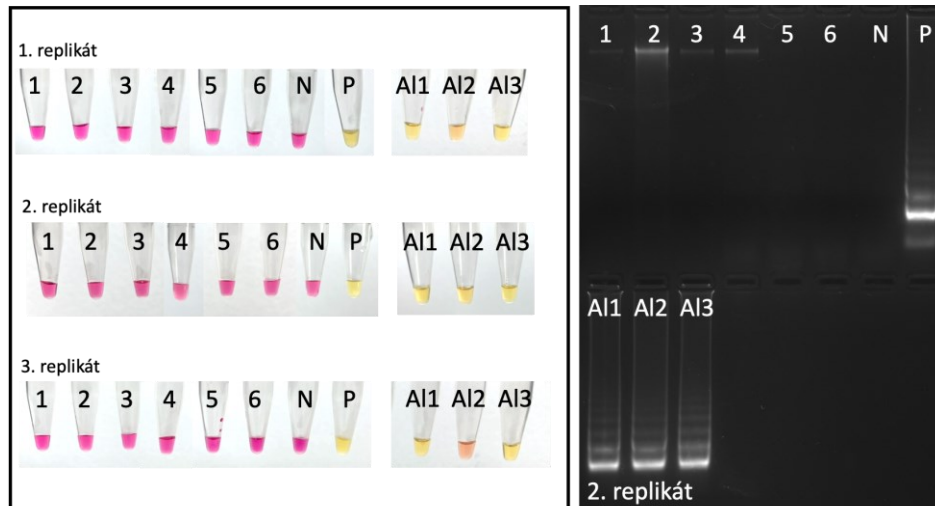
4.2 Testování specifity cLAMP eseje

Specifita byla testována na vzorcích 4 druhů rodu *Trichobilharzia* (*T. szidati*, *T. franki*, *T. regenti* a *T. filiformis*). Výsledky ukazují, že navržená sada LAMP primerů specificky amplifikuje DNA všech 4 testovaných druhů motolic rodu *Trichobilharzia*. U tří vzorků (6.1, 6.2 a 3.3) nebyl pozorován jasně pozitivní výsledek (žlutá barva), ten byl však potvrzen pomocí gelové elektroforézy (typický žebříkovitý vzor produktů značící úspěšnou amplifikaci) (viz Obrázek 12).



Obrázek 12: Testování specifity cLAMP eseje na čtyřech druzích rodu *Trichobilharzia*; 1-3 *Trichobilharzia szidati*; 4-6 *Trichobilharzia franki*; 7 *Trichobilharzia regenti*; 8-9 *Trichobilharzia filiformis*. Pozitivní kontrola (P) byla genomová DNA (*T. szidati*), negativní kontrola (N) neobsahovala žádnou přidanou DNA. Žlutá barva značí pozitivní výsledek, růžová negativní.

Druhým přístupem testování specifity byly experimenty se vzorky DNA druhů motolic mimo rod *Trichobilharzia*, konkrétně *Echinostoma revolutum*, *Diplostomum pseudospataceum*, *Euparyphium* sp., *Cotylurus* sp., *Schistosoma mansoni*; *Apatemon* sp., *Allobilharzia* sp. Díky pozorovaným negativním výsledkům byla potvrzena druhová specifita navržená eseje. Výjimka byla pozitivní reakce u vzorků blízce příbuzné ptačí motolice rodu *Allobilharzia* sp. (viz Obrázek 13).



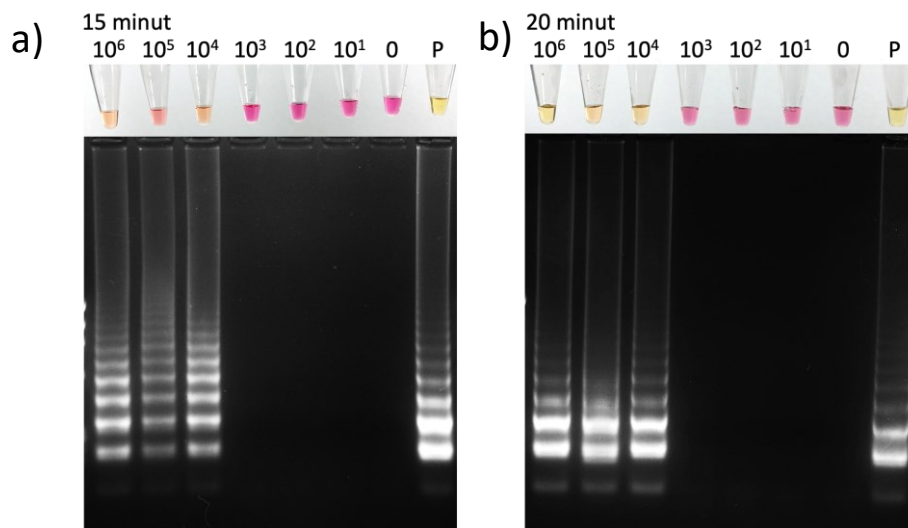
Obrázek 13: Testování specifity cLAMP eseje na druzích mimo rod *Trichobilharzia*: 1 *Echinostoma revolutum*; 2 *Diplostomum pseudospataceum*; 3 *Euparyphium* sp. 4 *Cotylurus* sp.; 5 *Schistosoma mansoni*; 6 *Apatemon* sp., Al 1-3 *Allobilharzia* sp. Pozitivní kontrola (P) byla genomová DNA (*T. szidati*), negativní kontrola (N) neobsahovala žádnou přidanou DNA. Žlutá barva značí pozitivní výsledek, růžová negetaivní.

4.3 Testování senzitivity cLAMP reakce

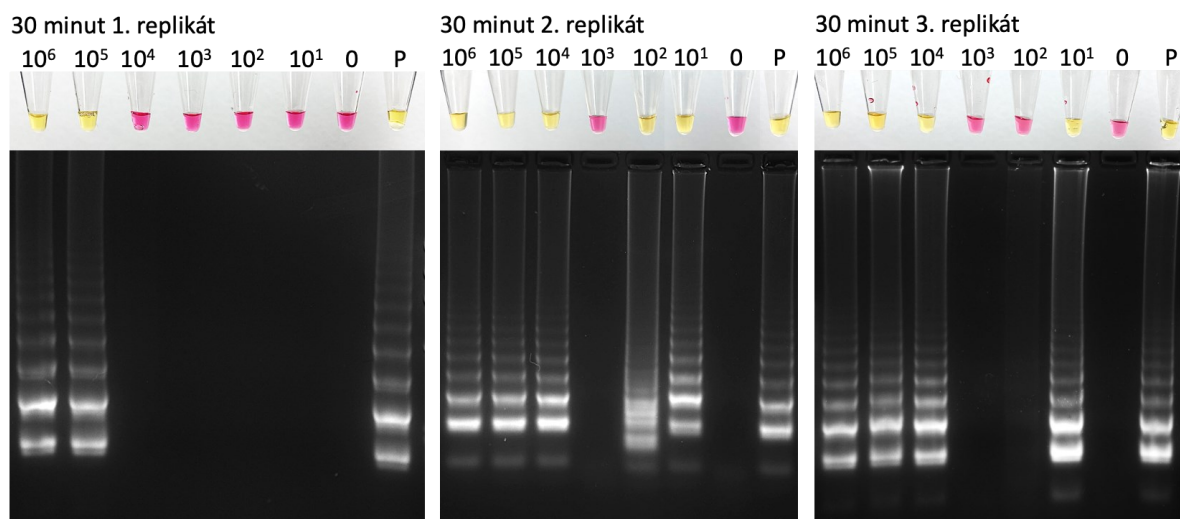
Senzitivita reakce byla testována dvěma způsoby: (1) pomocí PCR amplikonů s F3 a B3 primery, (2) pomocí plasmidové DNA obsahující targetovou sekvenci.

Testování senzitivity pomocí PCR amplikonů.

Pro zjištění detekčního limitu (senzitivity) navržené cLAMP eseje byly připraveny vzorky s přesně definovaným množstvím DNA. K tomuto účelu bylo připraveno 7 vzorků obsahující PCR amplikony o délce 221 bází (protokol viz Tabulka 10) s koncentracemi 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 a 0 kopií amplikonu/reakci. Jelikož je výsledek LAMP reakce závislý na době trvání, nejprve byla testována závislost doby reakce na množství vstupní DNA. Výsledky pokusů ukázaly, že 15minutové trvání reakce není dostatečné pro jasné odečtení pozitivních výsledků, které se objevily ve vzorcích s vyšší koncentrací (10^6 , 10^5 , 10^4 kopií amplikonu/reakci) (Obrázek 14 a). Po zvýšení reakční doby na 20 min byl detekční limit eseje stanoven na 10^4 kopií amplikonu s jednoznačně pozitivním výsledkem vzorků s vyšším množstvím kopií amplikonů (10^6 , 10^5 , 10^4 kopií) (Obrázek 14 b). Pro zjištění, zda je navržená eseje schopna amplifikovat i nižší koncentrace než 10^4 kopií amplikonu/reakci, byl prodloužen reakční čas na 30 min. V rámci tohoto pokusu již neproběhla amplifikace v nižším množství amplikonů (10^3 amplikonu/reakci), avšak prodloužení času mělo za následek nestandardní chování eseje. Docházelo k náhodné amplifikaci ve vzorcích s velmi nízkou koncentrací (10^2 , 10^1 kopií amplikonu/reakci), popřípadě amplifikace neproběhla, jelikož nebyl pozorován typický žebříkovitý vzor na gelové elektroforéze (10^2 amplikonu/reakci). Navíc tento jev nebyl konsistentní v rámci třech opakování stejného pokusu (viz Obrázek 15).



Obrázek 14: Testování senzitivity LAMP eseje pomocí F3 a B3 amplikonů v 15 a 20 minutách při 65 °C. Výsledky reakce byly potvrzovány pomocí gelové elektroforézy. Pozitivní kontrola (P) byla genomová DNA *T. szidati*. Žlutá barva signalizuje pozitivní výsledek reakce, růžová negativní, oranžová barva značí slabě pozitivní výsledek.



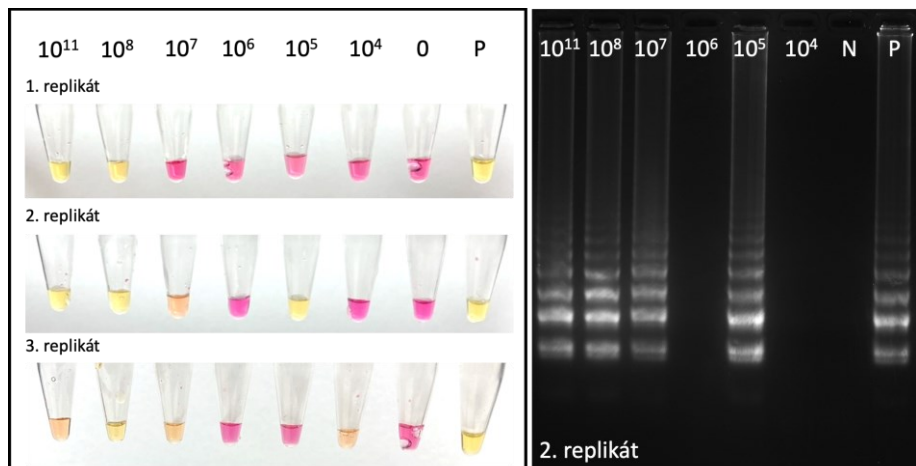
Obrázek 15: Testování senzitivity cLAMP pomocí PCR amplikonů 65 °C, 30 min. Výsledky byly potvrzovány pomocí gelové elektroforézy. Pozitivní kontrola (P) byla genomová DNA *T. szidati*. Žlutá barva signalizuje pozitivní výsledek reakce, růžová negativní. Žebříkovitý vzor produktů na gelové elektroforéze signalizuje pozitivní výsledek, nejasně oddělené bandy jsou pravděpodobně výsledkem nespecifické amplifikace primerů.

Tabulka 10: Protokol pro výrobu amplikonů k testování senzitivity.

| Primery F3 a B3 | | |
|-----------------|--------|-------------|
| Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
| 95 | 5 min | 1 |
| 95 | 60 s | |
| 57 | 45 s | 35 |
| 72 | 30 s | |
| 72 | 10 min | 1 |
| 4 | ∞ | 1 |

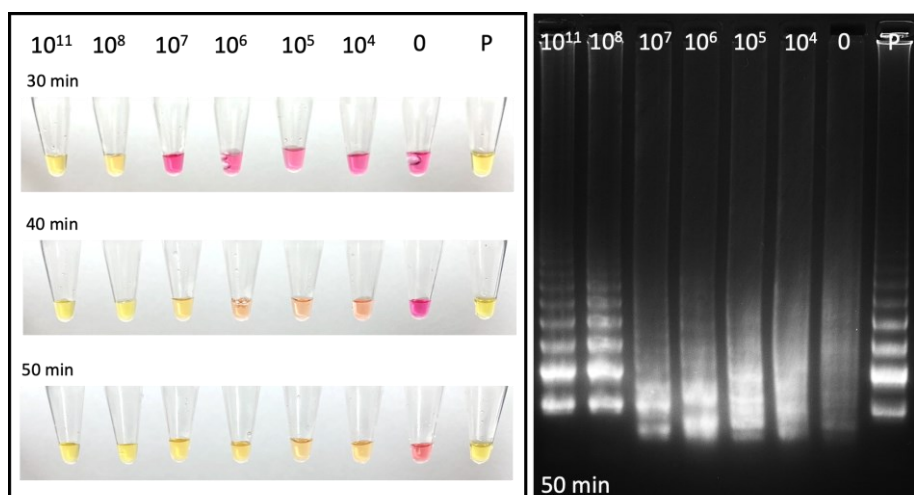
Testování senzitivity pomocí plasmidové DNA

Kvůli nekonzistentním výsledkům testování senzitivity s PCR amplikony byl zvolen druhý přístup testování senzitivity cLAMP eseje pomocí plasmidové DNA s obsaženým cílovým úsekem DNA. Bylo připraveno 7 vzorků s přesnou koncentrací kopií plasmidové DNA 10^{11} , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 a 0 kopií/ μl , přičemž do každé reakce byl přidán 1 μl . Senzitivita ve 30 minutách byla stanovena mezi 10^8 a 10^7 kopií plasmidové DNA v reakci (viz Obrázek 16), u reakcí s 10^7 kopií byla kolorimetricky pozorována pouze slabá pozitivita, a to jen ve 2 ze 3 případů, přítomnost produktu však byla potvrzena pomocí gelové elektroforézy. U nižších koncentrací (10^6 , 10^5 , 10^4) byl výsledek negativní. U dvou vzorků byl však pozorován výsledek pozitivní, s největší pravděpodobností se však jednalo o kontaminaci.



Obrázek 16: Testování senzitivity cLAMP eseje pomocí plasmidové DNA; 65 °C, 30 min. Pozitivní kontrola (P) byla genomová DNA *T. szidati*. Žlutá barva značí pozitivní výsledek, růžová negativní, oranžová barva signalizuje slabě pozitivní výsledek.

Výsledek LAMP reakce je časově závislý, proto byl výsledek pokusu sledován nejen ve 30 minutách dle standardního protokolu, ale i v 40 min a 50 min. Při prodloužení reakčního času byly vzorky s nižším množstvím plasmidové DNA (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4) slabě pozitivní, pomocí gelové elektroforézy však nebyla pozitivita potvrzena, jelikož nebyl pozorován typický žebříkovitý vzor produktů (viz Obrázek 17).

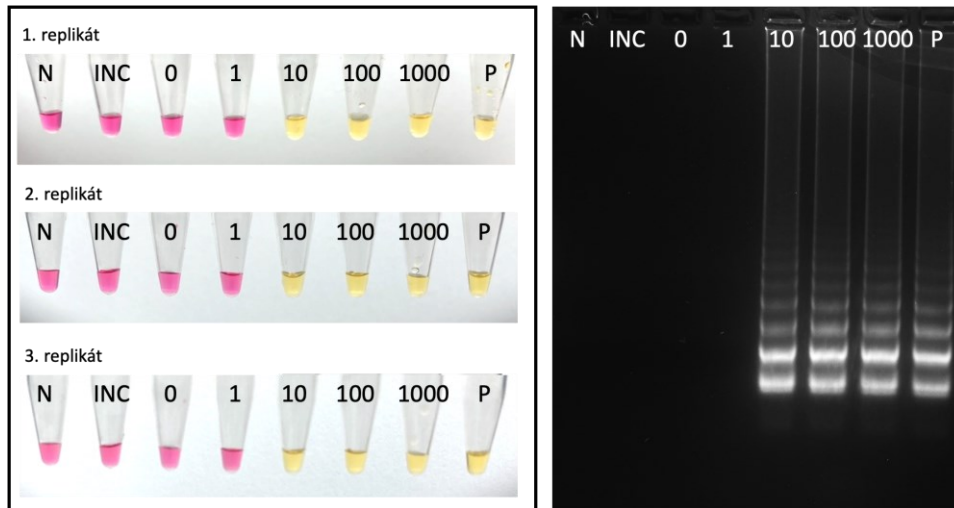


Obrázek 17: Testování senzitivity pomocí plasmidu ve třech časech 30 min, 40 min a 50 min. *cLAMP* probíhala při 65 °C. Po 50 minutách byla reakce ukončena a analyzována pomocí gelové elektroforézy. Všechny reakce s nižší koncentrací než 10^7 nevykazovaly typický žebříkovitý vzor produktů, nejasně odděleně bandy značí nespecifickou amplifikaci primerů. Pozitivní kontrola (P) byla genomová DNA. Žlutá barva značí pozitivní výsledek, růžová negativní, oranžová barva signalizuje slabě pozitivní výsledek kolorimetrické eseje.

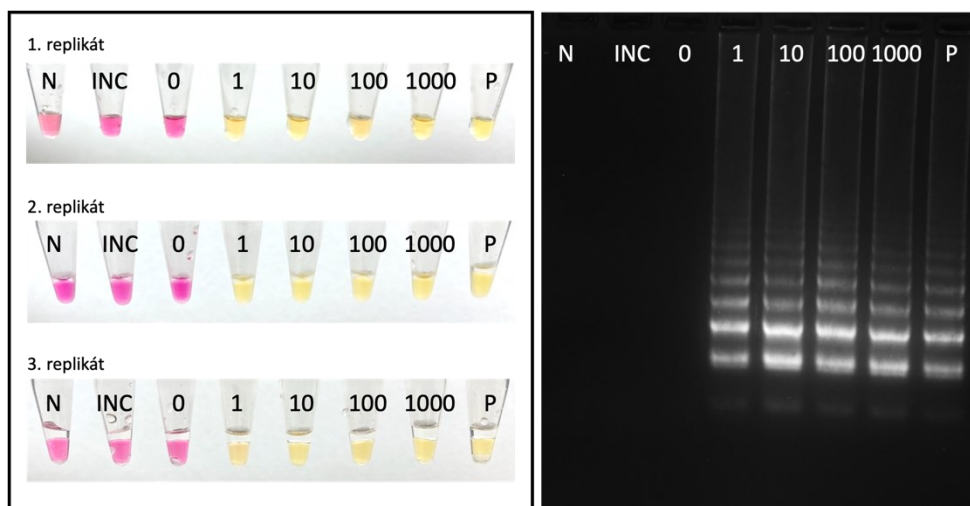
4.4 Filtrace eDNA v laboratorních podmínkách

4.4.1 Testování senzitivity filtračního systému

Pro testování senzitivity cLAMP ve spojení s filtrací eDNA byly připraveny vzorky vody obsahující cercárie *T. szidati* o 5 koncentracích (0, 1, 10, 100 a 1000 cercárií/litr). Výsledky pokusů ukázaly, že metoda je schopna zachytit 10 cercárií v litru vody v obou biologických replikátech (viz Obrázek 18), ve druhém replikátu dokonce 1 cercárii v litru vody (viz Obrázek 19). Navíc byly výsledky v rámci všech technických triplikátů konzistentní.



Obrázek 18: První biologický replikát testování funkčnosti a citlivosti cLAMP a filtrace eDNA. Pokus byl proveden v technickém triplikátu. Jako negativní kontrola (N) byla reakce provedena pouze s vodou bez DNA. Vnitřní negativní kontrola (INC) obsahovala prázdnou eluci izolace DNA z filtrů dle protokolu výrobce. Jako pozitivní kontrola (P) byla použita genomová DNA *T. szidati*. Žlutá barva značí pozitivní výsledek, růžová negativní.



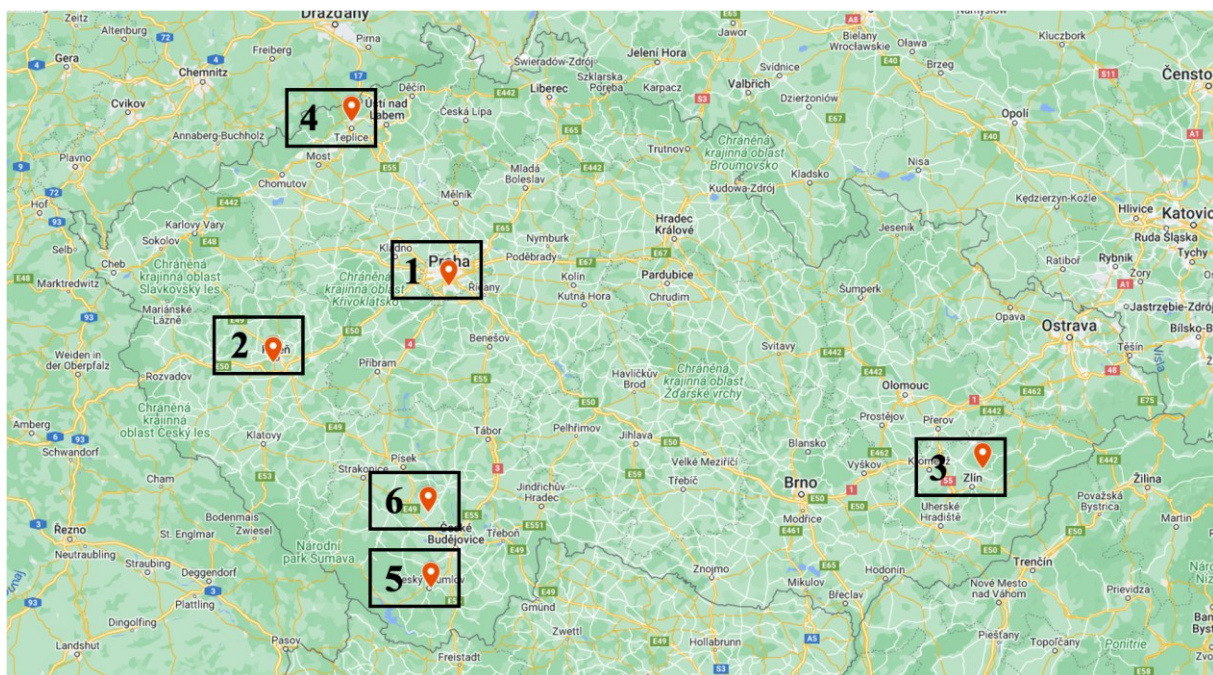
Obrázek 19: Druhý biologický replikát testování funkčnosti a citlivosti cLAMP a filtrace eDNA. Pokus byl proveden v technickém triplikátu. Jako negativní kontrola (N) byla reakce provedena pouze s vodou bez DNA. Vnitřní negativní kontrola (INC) obsahovala prázdnou eluci izolace DNA z filtrů dle protokolu výrobce. Jako pozitivní kontrola (P) byla použita genomová DNA *T. szidati*. Žlutá barva značí pozitivní výsledek, růžová negativní.

4.5 Terénní sběry

Terénní sběry pro detekci původců CD probíhaly od května do srpna 2023, celkem bylo provedeno 30 sběrů vodních plžů na 14 lokalitách. V rámci této práce probíhal odběr pomocí filtrace eDNA pouze na lokalitách, kde byla předem hlášena CD. Celkem se tedy jedná o 6 lokalit (viz Obrázek 20) a 9 sběrů. Sedmá lokalita (N) sloužila jako negativní kontrola, jednalo se o jezírko ve skleníku Botanické zahrady PřF UK, ke kterému je zamezen přístup MH i DH ptačích schistosom. Lokality, na kterých probíhal odběr, shrnuje Tabulka 11. Informace o parametrech vody na sledovaných lokalitách shrnuje Příloha 2.

Tabulka 11: Souhrn odběrů vzorků na lokalitách pomocí metod sběru vodních plžů a filtrace eDNA.

| Odběr | Datum | Město | Název lokality | Typ lokality | Souřadnice |
|-------|--------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 1 | 29.06.2023 | | | | |
| 1.2 | 04.07.2023 | Praha | Lhotka | Biotop/koupaliště | 50.0221000N, 14.4365656E |
| 1.3 | 01.08.2023 | | | | |
| 2.1 | 04.07.2023 | Plzeň | Škodaland | Biotop/koupaliště | 49.7172092N, 13.3524572E |
| 2.2 | 18.07.2023 | | | | |
| 3 | 13.07.2023 | Lukov u Zlína | Dolní bělovodský rybník | Koupací rybník | 49.2908414N, 17.7268689E |
| 4 | 17.07.2023 | Teplice – Proboštov | Proboštovský rybník | Revitalizovaný rybník | 50.6664067N, 13.8385653E |
| 5 | 25.08.2023 | Český Krumlov | Hornobranský rybník | Koupací rybník | 48.8089664N, 14.3253497E |
| 6 | 25.08.2023 | Dívčice | Blatec | Chovný rybník | 49.1167367N, 14.3084103E |
| N | 24. 11. 2023 | Praha | Skleník PřF UK | Jezírko | 50.0712328N, 14.4202856E |



Obrázek 20: Mapa České republiky s vyznačenými lokalitami a čísly sběrů: 1 Biotop Lhotka, Praha; 2 koupaliště Škodaland, Plzeň; 3 Dolní bělovodský rybník, Lukov; 4 Proboštovský rybník, Proboštov; 5 Hornobranský rybník, Český Krumlov, 6 rybník Blatec, Dívčice.

4.5.1 Sběr a vyšetřování vodních plžů na přítomnost původců CD

Na vybraných lokalitách byli sbíráni vodní plži dle normy ČSN 757727. Celkem bylo vyšetřeno 998 plžů čtyř druhů (*Radix auricularia*, *Radix balthica*, *Stagnicola palustris* a *Lymnaea stagnalis*), přičemž byli nalezeny tři druhy ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia* (*T. franki*, *T. szidati* a *T. franki*). Druh *T. franki* byl nalezen na čtyřech lokalitách, *T. regenti* a *T. szidati* byly nalezeny každá pouze na jedné lokalitě. Mezihostitelem *T. regenti* a *T. franki* byl pro každou vždy jeden druh plže (*T. regenti* v *Radix balthica*, *T. franki* v *Radix auricularia*). Oproti tomu druh *T. szidati* byl nalezen ve dvou druzích (*L. stagnalis* a *S. palustris*). Ve dvou případech sběru a vyšetřování vodních plžů nebyl nalezen žádný zástupce ptačích motolic (sběr 1.3, 5). Data sběrů jsou zobrazena v Tabulka 12.

Tabulka 12: Jednotlivé odběry s nalezenými motolicemi rodu *Trichobilharzia* a jejich mezihostiteli. Dále je uveden celkový počet nalezených plžů. suma inf. plžů značí celkový počet nalazených plžů infikovaných motolicemi rodu *Trichobilharzia*, ze kterého byla vypočtena prevalence (P) jako počet infikovaných plžů ku všem nalezeným, vyjádřeno v procentech.

| Odběr | Datum | Lokalita | Druh | Druh plže | ∑ plžů | ∑ inf. plžů | P [%] |
|-------|--------------|--------------------|-------------------|--|--------|-------------|--------------|
| 1 | 29. 06. 2023 | | | | 100 | 4 | 4,0 |
| 1.2 | 04. 07. 2023 | Lhotka Praha | <i>T. regenti</i> | <i>R. balthica</i> | 19 | 1 | 5,3 |
| 1.3 | 01. 08. 2023 | | negativní | | 10 | 0 | 0 |
| 2.1 | 04. 07. 2023 | | <i>T. franki</i> | <i>R. auricularia</i> | 254 | 7 | 2,8 |
| 2.2 | 18. 07. 2023 | Škodaland Plzeň | <i>T. franki</i> | <i>R. auricularia</i> | 290 | 5 | 1,7 |
| | | | <i>T. szidati</i> | <i>L. stagnalis</i> ; <i>S. palustris</i> | 13; 34 | 2; 3 | 15,4; 8,8 |
| 3 | 13. 07. 2023 | Lukov | <i>T. franki</i> | <i>R. auricularia</i> | 9 | 1 | 11,1 |
| 4 | 17. 07. 2023 | Proboštov | <i>T. franki</i> | <i>R. auricularia</i> | 39 | 2 | 5,1 |
| 5 | 25. 08. 2023 | Český Krumlov | negativní | <i>R. auricularia</i> | 30 | 0 | 0,0 |
| 6 | 25. 08. 2023 | Blatec | <i>T. franki</i> | <i>R. auricularia</i> | 200 | 2 | 1,0 |
| N | 24. 11. 2023 | Praha | negativní | | 0 | 0 | 0 |

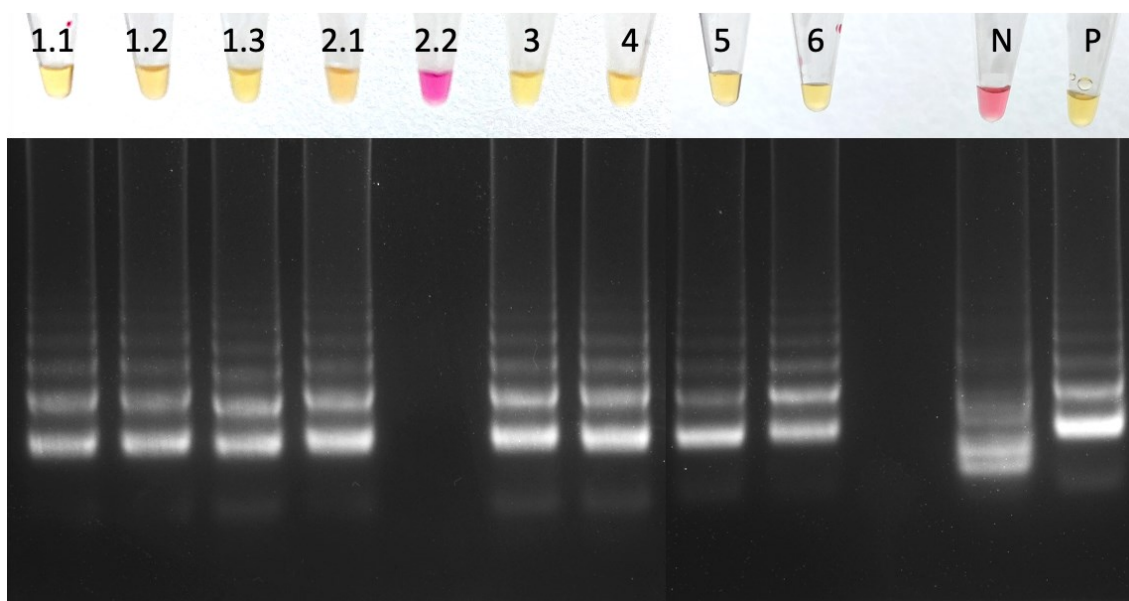
4.5.2 Filtrace eDNA na lokalitách a cLAMP reakce

Na vybraných lokalitách byly odebrány vzorky eDNA pomocí filtrace vody. Výsledky cLAMP reakce odpovídaly výsledkům sběrů a vyšetřování vodních plžů jen ve dvou případech (2.1. a 4). U ostatních pokusů (1.1, 1.2, 2.2, 3, 5) nebyly výsledky jednoznačné, výsledek alespoň jedné reakce neodpovídal výsledku ze sběru plžů. V jednom z případů (1.3) byli všichni nalezení plži negativní, ačkoliv 5 ze 6 cLAMP reakcí ukázaly pozitivní výsledek. Naopak u vzorku 6 bylo i přes pozitivní sběr plžů 5/6 reakcí cLAMP negativní, nejspíše kvůli malému objemu přefiltrované vody. Výsledky u sběru 2.2 jasně ukazují vliv objemu DNA přidaného do reakce, tedy snížené citlivosti při přidání pouze 2 μ l DNA, avšak tento výsledek nebyl patrný u ostatních reakcí. Vzorky odebrané na lokalitě potvrzují problém s kontaminací, jelikož 2 z 5 reakcí byly pozitivní, ačkoli byly odebrány na lokalitě bez výskytu původců CD. Popsané výsledky shrnuje Tabulka 13.

Tabulka 13: Výsledky cLAMP z lokality. Barva políčka označuje výsledek cLAMP. Růžová barva značí negativní výsledek, žlutá pak výsledek pozitivní. Políčka označená jednou hvězdičkou (*) označují reakce, při kterých byla negativní kontrola jasně pozitivní. Políčka se dvěma hvězdičkami (**) pak reakce, při kterých byla negativní kontrola pouze slabě pozitivní. Míra prevalence je vyjádřena počtem +: + <10%, ++ >10% a +++ >15%. N/A reakce nebyly provedeny.

| Odběr | 6 μ l DNA | | | 2 μ l DNA | | | Objem [ml] | Sběr plžů | Prevalence |
|-------|----------------|----|----|---------------|----|----|------------|-------------------|------------|
| | 1. | 2. | 3. | 1. | 2. | 3. | | | |
| 1.1 | | | * | ** | | | 1920 | <i>T. regenti</i> | + |
| 1.2 | | | * | ** | | | 1200 | <i>T. regenti</i> | + |
| 1.3 | | | | ** | | | 1500 | negativní | 0 |
| 2.1 | | | * | ** | | | 2040 | <i>T. franki</i> | + |
| 2.2 | | | * | ** | | | 1380 | <i>TS a TF</i> | +++ |
| 3 | | | * | ** | | | 780 | <i>T. franki</i> | ++ |
| 4 | | | * | ** | | | 1020 | <i>T. franki</i> | + |
| 5 | | | | ** | | | 540 | negativní | 0 |
| 6 | | | | ** | | | 300 | <i>T. franki</i> | + |
| N | 2*/5 pozitivní | | | N/A | | | 1800 | negativní | 0 |

U reakcí označených jednou nebo dvěma hvězdičkami byla negativní kontrola pozitivní pravděpodobně kvůli kontaminaci. Výsledek reakcí označených v Tabulce 14 ** společně s gelovou elektroforézou je zobrazen na Obrázek 21. Výsledek negativní kontroly nebyl jednoznačný pomocí kolorimetrie ani po provedení gelové elektroforézy, vzor amplikonů se totiž plně neshodoval s typickým žebříkovitým vzorem produktů LAMP reakce.



Obrázek 21: Výsledek reakce 1 (viz Tabulka 13), žlutá barva reakční směsi značí pozitivní výsledek, růžová barva značí negativní výsledek reakce. Výsledek potvrzen pomocí gelové elektroforézy. Negativní kontrola (N) bez targetové DNA a pozitivní kontrola (P) s přidanou genomovou DNA T. szidati.









4.6 Analýza produktů cLAMP pro falešnou pozitivitu

U pokusů, při kterých došlo k pozitivnímu výsledku u negativních kontrol, byla DNA separována pomocí gelové elektroforézy a izolována. Pro potvrzení, že tyto produkty vznikly za přítomnosti cílové DNA v reakci a nedošlo jen k nespecifické amplifikaci cLAMP primerů, byly navrženy primery a protokol pro PCR (viz Tabulka 14). Tato sada primerů amplifikuje produkty z cLAMP, jen v případě, že jsou součástí jejich sekvence úseky vyznačené na Obrázku 22, tedy části, na které nenasedá žádný s cLAMP primerů. Pomocí PCR a následné sekvenace bylo potvrzeno, že pozitivní výsledek cLAMP negativní kontroly i všech ostatních vzorků nebyl zapříčiněn nespecifickou amplifikací, ale jednalo se o falešnou pozitivitu v důsledku kontaminace.

Tabulka 14: PCR protokol s inner F a inner R primery

| Inner F a Inner R primery | | |
|---------------------------|--------|-------------|
| Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
| 95 | 5 min | 1 |
| 95 | 60 s | |
| 58 | 45 s | 30 |
| 72 | 30 s | |
| 72 | 10 min | 1 |
| 4 | ∞ | 1 |

5' ACCAGGTAACCTTTCCTCCA GTCAGTAGGCACCTTCCCTCTTCCAGATCTTTT
GCAATAATGGAGTCAGCATATCTGCTGTCGTTTCTGGGTCCGCTTTCAGTGCTTCCG
GGGGTATCCATCTGGTCCAGCTGCTTTCCAGCTTTCAGAAGCTTGATTGCATTCAT
GACTTCAGTTTCGTTGGAGGATTGGTGTC AACTTGCAGTTGTGTACGTGC 3'

| | Sekvence 5' - 3' | barva |
|---------------|---|---|
| F3 | ACCAGGTAACCTTTCCTCCA |  |
| B3 | GCACGTACACAACCTGCAAGT |  |
| FIP | GGACCCAGAAACGACAGCAGAT TCAGTAGGCACCTTCCCTC | |
| F2 | TCAGTAGGCACCTTCCCTC |  |
| F1c | GGACCCAGAAACGACAGCAGAT |  |
| BIP | TTCCATCTGGTCCAGCTGCTTT GACACCAATCCTCCAACGAA | |
| B2 | GACACCAATCCTCCAACGAA |  |
| B1c | TTCCATCTGGTCCAGCTGCTTT |  |
| LF | GCTGACTCCATTATTGCAAAAGATC |  |
| LB | TCCAGCTTTCAGAAGCTTGA |  |
| InnerF | GCTTTCAGTGCTTCCGGG | tučně |
| InnerR | AACTGAAGTCATGAATGCAATCAA | tučně |

Obrázek 22: Navržené innerF a innerR primery.

4.7 Finanční náklady LAMP reakce

Z aktuálních cen od dodavatelů byla vypočtena nákladnost vyšetření jedné lokality jako cena za jednu reakci a cena za triplikát. V případě, kdy byl na lokalitě prováděn jeden odběr a byla provedena jedna cLAMP reakce, finanční náklady byly 606 Kč. V případě třech opakování cLAMP reakce z jednoho odběru eDNA jsou finanční náklady 741 Kč (viz Tabulka 15). Do celkové bilance testu byla započtena i cena lidské práce a byla porovnána s metodou sběru a vyšetřování vodních plžů při hypotetické hodinové mzdě 250 Kč (viz Tabulka 16).

*Tabulka 15: Cena jednotlivých komponent reakce s výpočet ceny za jednu reakci a cenu v případě triplikátu. Ceny jsou uváděny včetně DPH. Do výpočtu nebyla zařazena cena běžného laboratorního plastu a lidské práce. * Počet reakcí primerů je pouze odhadováno, dodané množství od výrobce se vždy liší.*

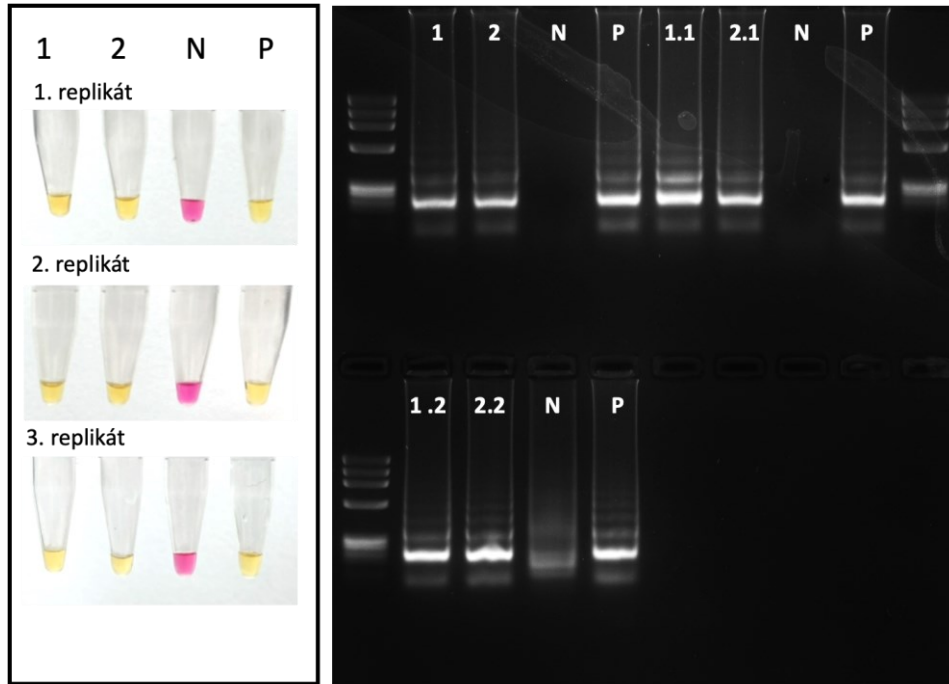
| Název | Cena balení | Počet reakcí | Cena/reakce |
|---|-------------|--------------|---------------|
| Complete eDNA sampling sets (20x) 0,8 uM PES filter | 8 349 Kč | 20 | 417,5 Kč |
| Environmental DNA isolation kit | 2 420 Kč | 20 | 121,0 Kč |
| WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG | 10 951 Kč | 166 | 66,0 Kč |
| Kompletní set primerů | 1 500 Kč | 1000* | 1,5 Kč |
| CENA za reakci | | | 606 Kč |
| CENA triplikátu | | | 741 Kč |

Tabulka 16: Celková finanční bilance metod sběru a vyšetřování vodních plžů a cLAMP s filtrováním eDNA.

| cLAMP, eDNA | | Sběr plžů | |
|---------------|-----------------|-------------|-----------------|
| Činnost | Čas [min] | Činnost | Čas [min] |
| Sběr | 15 | Sběr | 60 |
| Příprava | 10 | Příprava | 30 |
| Izolace DNA | 75 | Vylučování | 120 |
| LAMP | 35 | Úklid | 30 |
| Úklid | 10 | | |
| ΣČas | 145 | ΣČas | 240 |
| Mzda/hod | 250 Kč | Mzda/hod | 250 Kč |
| Práce | 604 Kč | Práce | 1 000 Kč |
| Materiál | 606 Kč | Materiál | 50 Kč |
| Celkem | 1 210 Kč | | 1 050 Kč |

4.8 Amplifikace bez izolace DNA

Byla provedena standardní cLAMP esej pro rod *Trichobilharzia*. Jako vstupní materiál však nebyla použita izolovaná DNA, nýbrž celé fixované cercárie. Po jejich přidání do cLAMP reakční směsi byla pozorována ve všech případech pozitivní reakce. Amplifikaci tudíž lze provést bez izolace DNA.



Obrázek 23: Výsledky pokusu cLAMP bez izolace DNA. Negativní kontrola (N), pozitivní kontrola (P). Žlutá barva označuje pozitivní výsledek reakce, růžová negativní.

5 DISKUZE

5.1 Molekulární analýza

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vytvořit efektivní molekulární metodu pro detekci původců cercáriové dermatitidy zaměřenou na rod *Trichobilharzia*, která by byla použitelná pro rutinní využití pracovníků hygienických stanic. Prvním krokem bylo vybrat vhodný molekulární marker, který by splňoval kritéria pro rodovou specifitu pro rod *Trichobilharzia* a zároveň by byl dostatečně senzitivní pro záchyt velmi nízkých koncentrací eDNA. Bylo zapotřebí vybrat takový úsek, který je v genomu zastoupen ve velkém počtu kopií, takovými jsou např. úsek D1-D2 kódující ribosomální podjednotku 28S, ITS regiony a úsek pro mitochondriální *coxI* gen, které jsou používány i ve fylogenetice ptačích motolic (Hlinka *et al.*, 2002; Horák *et al.*, 2015). Dalšími vysoce zastoupenými sekvencemi v eukaryotických buňkách jsou tzv. repetitivní retrotranspozony (Hancks *et al.*, 2016), které byly úspěšně použity pro LAMP detekci lidských schistosom. Konkrétně byla použita sekvence SjR2, která je v genomu *S. japonicum* zastoupena v 10000 kopií a tvoří tak 14 % jejího genomu, což se odrazilo i ve vysoké senzitivitě eseje, která byla schopna zachytit až 0,08 fg DNA (Laha *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2010). Retrotranspozony patří do skupiny tzv. „transposable elements“ a např. v savčích buňkách mohou zabírat více než 50 % genomu (Hancks *et al.*, 2016). Z důvodu úspěšného použití sekvence SjR2 pro detekci lidských schistosom byla tato sekvence použita i pro návrh LAMP eseje pro detekci ptačích schistosom v rámci této práce.

Ačkoliv motolice rodu *Trichobilharzia* nejsou jedinými zástupci způsobujícími cercáriovou dermatitidu u lidí, dalšími jsou např. *Austroilharzia*, *Gigantobilharzia*, *Bilharziella*, *Schistosoma* (Kolářová *et al.*, 2013), v Evropě se jedná o jejího nejčastějšího původce (Soldánová *et al.*, 2013). Z toho důvodu byl zvolen právě tento rod pro vývoj cLAMP molekulární detekce původců CD. V současnosti je popisováno více než 37 druhů rodu *Trichobilharzia* (Brant a Loker, 2013; Jouet *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2022), avšak celogenomová data jsou dostupná pouze pro dva druhy – *T. szidati* a *T. regenti* (GCA_944472155.2; GCA_900618515). V těchto genomech byly *in silico* nalezeny homology SjR2 a posléze i pomocí PCR v DNA *T. franki*, jelikož nebyla v čase vzniku této práce pro *T. franki* dostupná celogenomová data. Na základě dat z těchto tří druhů bylo potvrzeno, že úsek, na který byly posléze navrhovány primery pro LAMP, je rodově konzervovaný, ačkoli pro úplné potvrzení by bylo zapotřebí získat data ještě z dalších druhů rodu *Trichobilharzia*, což by bylo vzhledem k jejich vysokému počtu, značně obtížné.

5.1.1 Testování specifity navržené cLAMP eseje pro rod *Trichobilharzia*

Na vzorcích izolované genomové DNA různých druhů motolic byla testována specifita navržených cLAMP primerů, tzn. jestli dochází k amplifikaci DNA pouze u motolic rodu *Trichobilharzia*. V rámci pokusu bylo potvrzeno, že dochází k amplifikaci minimálně u 4 vybraných druhů (*T. szidati*, *T. regenti*, *T. franki* a *T. filiformis*). Esej by bylo vhodné otestovat ještě na dalších druzích vyskytujících se v Evropě např. *T. physellae* (Helmer *et al.*, 2021) nebo *T. anseri* (Jouet *et al.*,

2015), aby byla potvrzena rodová specificita. U vybraných motolic mimo rod *Trichobilharzia*, běžně se vyskytujících v Evropě (Brown *et al.*, 2011; Faltýnková *et al.*, 2016) (*Echinostoma*, *Diplostomum*, *Euparyphium*, *Cotylurus*, *Apatemon*, *Allobilharzia*) byla pozorována negativní reakce, až na jednu výjimku. U třech nezávislých vzorků došlo k amplifikaci DNA ptačí schistosomy rodu *Allobilharzia* Kolářová, 2006. Jelikož byly tyto vzorky získány ze střeva labutí, mohla být pozitivní reakce zapříčiněna koinfekcí s motolicemi rodu *Trichobilharzia*, např. *Trichobilharzia filiformis* (Rudolfová *et al.*, 2007), která nemusela být odhalena při molekulární determinaci vzorků. Jelikož byla pozorována cLAMP amplifikace u vzorků ze 3 různých jedinců labutí, opravdu mohlo dojít k amplifikaci DNA motolice *Allobilharzia*. Jedná se totiž o blízce příbuznou ptačí schistosomu k rodu *Trichobilharzia* (Kolářová *et al.*, 2006; Horák *et al.*, 2015), cílová sekvence by tedy nemusela být rodově konzervovaná. V dalších experimentech by bylo vhodné otestovat esej na dalších blízce příbuzných rodech ptačích motolic (např. *Gigantobilharzia*, *Bilharziella*, *Dendritobilharzia*), na základě pokusu bylo zjištěno, že u lidské schistosomy *S. mansoni* k amplifikaci pomocí navržené LAMP eseje nedochází, konzervovanost úseků se tedy pravděpodobně vyskytuje jen u ptačích schistosom. Ačkoliv byl vybrán pro design cLAMP eseje rod *Trichobilharzia* jako nejčastější původce tohoto onemocnění v Evropě (Horák *et al.*, 2015), bylo by vhodné vytvořit esej detekující všechny původce.

Výhoda cLAMP je možnost odečtení výsledku reakce pouhým okem na základě barevné změny spojené s poklesem pH v průběhu amplifikace DNA. Použitý pH indikátor (fenolová červen), tak signalizuje pozitivní výsledek reakce jasně žlutou barvou a negativní barvou růžovou (Daskou *et al.*, 2019). Při testování specificity, byl však u třech vzorků (6.1, 6.2 a 3.3, viz kapitola 4.2, str.31) pozorován výsledek v podobě oranžové barvy, ačkoliv byl očekáván jasně pozitivní výsledek, který byl potvrzen i pomocí gelové elektroforézy. Nedostatečný pokles pH potřebný ke změně barvy na žlutou mohl být způsoben použitým elučním pufrem při izolaci DNA, výrobce mastermixu (NEB) totiž uvádí, že pro nejlepší výsledky je ideální použít pro eluci pouze vodu. U vzorku *Allobilharzia* (A12.3) byla taktéž pozorována oranžová barva reakce, v tomto případě však mohl být tento jev způsoben kromě elučního pufru navíc ještě tím, že použité vzorky byly izolovány ze střev labutí, obsahovaly tak velké množství hostitelské DNA a parazitární byla v nedostatečném množství pro jasně pozitivní výsledek.

5.1.2 Testování senzitivity navržené cLAMP eseje pro rod *Trichobilharzia*

Esej cLAMP pro rod *Trichobilharzia* byla navrhována za účelem použití na vzorcích eDNA. Jelikož je eDNA zastoupena v malých koncentracích, je zapotřebí, aby použitá amplifikační metoda byla vysoce citlivá (Furlan *et al.*, 2015). Senzitivitu detekční eseje lze vyjádřit různými způsoby, například koncentrace DNA přidané do reakce (fg/reakce) (Xu *et al.*, 2010; Fernández-Soto *et al.*, 2014; Gandasegui *et al.*, 2016), nebo počtem kopií cílové sekvence, například v podobě plasmidové DNA (Mori *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2021). V rámci této práce byl využit přístup určení detekčního limitu v počtu kopií cílového úseku DNA v reakci, a to buď s PCR amplikony, nebo s plasmidovou DNA. Detekční limit vyjádřený počtem kopií oproti koncentraci v reakci vystihuje, kolik molekul DNA je metoda schopná zachytit, což je pro využití při eDNA detekci vhodnější.

Testování senzitivity pomocí PCR amplikonů

V prvních experimentech testování senzitivity byla zjišťována závislost času pro pozitivní reakci na počtu přidaných kopií cílového úseku (PCR amplikonů). Reakční čas LAMP eseje se může pohybovat v rozmezí 20-60 min (Mori *et al.*, 2004; Mekata *et al.*, 2006), přičemž výrobce využitého mixu pro cLAMP uvádí optimální čas 30 min. Při kratším reakčním čase 15 a 20 min byla pozorována pouze slabá pozitivita, a to u vzorků s koncentrací 10^4 kopií a vyšší. Pro zajištění jasně pozitivního signálu byl reakční čas stanoven na doporučených 30 min. Očekávaný detekční limit 10^4 kopií byl však v rámci triplikátu ve 30 minutách pozorován pouze ve 2 ze 3 případů, navíc byly výsledky celého pokusu nekonzistentní (náhodné pozitivní/negativní výsledky u nižších koncentrací při opakování pokusu). Prvním vysvětlením nekonzistentních výsledků cLAMP reakcí může být kontaminace některých vzorků (problém kontaminace popsán v kapitole 0). Druhé vysvětlení nekonzistentnosti výsledků může být spojeno se vstupním materiálem (PCR amplikony) a jeho přípravou. Jednalo se totiž o krátké molekuly DNA (221 bp), které jsou obecně nestabilní a mohou fragmentovat, např. i kvůli opakovanému rozmrazování a zamrazování (Röder *et al.*, 2010). Mohlo dojít k špatné vazbě primerů, a tím pádem ke slabé nebo žádné amplifikaci, což mělo za následek negativní výsledek. Dalším problémem při práci s krátkými molekulami DNA o vysoké koncentraci je vliv pipetovací chyby. Například při pipetování 1 μ l 221bp dlouhé DNA o koncentraci 0,5 ng/ μ l může být při pipetovací chybě 0,001 μ l rozdíl v řádu 10^6 kopií DNA. Proto byla koncentrace zásobních roztoků snížena tak, aby do reakce bylo pipetováno 6 μ l DNA, tedy maximální objem, a tím se snížila nepřesnost množství přidané DNA. PCR amplikony se i přes to v rámci této práce ukázaly být nevhodné pro tento typ použití, proto byla senzitivita cLAMP eseje dále testována pomocí metodiky využívající plasmidovou DNA dle již dříve provedených prací (Mori *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2021).

Testování senzitivity pomocí plasmidové DNA

Pro další testování senzitivity byly cílové úseky pro cLAMP (221 bp) vloženy do plasmidové DNA. Cílem využití plasmidové DNA pro testování DNA byla zamezení degradace vzorku, ke které dochází u krátkých vláken DNA (Röder *et al.*, 2010). Zároveň byla díky velikosti plasmidů (2911bp) snížena pipetovací chyba. I přesto, že mělo využití plasmidové DNA zamezit nekonzistentnosti výsledků při testování detekčního limitu, byla opět pozorována nekonzistentnost vzorků s nižší koncentrací DNA v rámci všech tří replikátů při reakčním čase 30 min. Stabilní výsledky byly pozorovány pouze u vzorků s vyšší koncentrací 10^{11} a 10^8 , metoda tedy vykazovala nižší citlivost oproti testování senzitivity s PCR amplikony (10^4 kopií). Výsledky pokusů testování senzitivity v obou případech neodpovídají očekávané senzitivitě, v publikovaných LAMP esejích byla v 30 min pozorována citlivost v rozmezí 10^2 až 7×10^0 kopií (Shi *et al.*, 2021; Thi *et al.*, 2020). Nižší senzitivita mohla být důsledkem špatného pročištění plasmidové DNA od genomové DNA bakterií, naměřená koncentrace zásobního roztoku tak nemusela odpovídat reálné koncentraci plasmidové DNA v roztoku, a tím bylo do jednotlivých reakcí přidáno méně kopií DNA.

Výsledek reakce LAMP je časově závislý, reakční časy v publikovaných esejích se pohybují od 20-60 minut (Mori *et al.*, 2004; Mekata *et al.*, 2006). Pro zvýšení citlivosti byl reakční čas prodloužen na 40 a 50 min. Výsledky odečtené na základě kolorimetrie sice vykazovaly zvýšenou citlivost (10^4 kopií/reakce), změna barvy však byla způsobena nespecifickou reakcí primerů, pomocí gelové elektroforézy totiž nebyl pozorován typický žebříkovitý vzor produktů.

5.2 Filtrace eDNA v laboratorních podmínkách

Detekovat eDNA lze pomocí různých amplifikačních metod, při detekci lidských schistosom je nejčastěji využívána metoda PCR a její modifikace (Sengupta *et al.*, 2019; Alzaylae *et al.*, 2020), avšak existují i práce využívající metodu LAMP (Davis *et al.*, 2020; Peterson *et al.*, 2023; využití těchto metod v parazitologii bylo shrnuto v pracích Kamel *et al.*, 2021 a Sengupta *et al.*, 2022). Před použitím metody filtrace eDNA s cLAMP na vzorcích z lokality, byla funkčnost a citlivost testována v laboratorních podmínkách. Za tímto účelem byly připraveny vzorky s různým množstvím cercárií (0, 1, 10, 100 a 1000) v 1 l vody, která byla následně filtrována, což je již zavedený postup (Sengupta *et al.*, 2019). Výrobce filtrační sady (Sylphium) uvádí, že přefiltrováním alespoň 1 litru je největší šance pro záchyt eDNA. Pokusy prokázaly, že tato metoda je schopna zachytit eDNA z jedné cercárie v jednom litru vyfiltrované vody. Tento experiment byl prováděn v biologickém duplikátu, v jednom z nich však odpovídal detekční limit pouze 10 cercárií v litru. Snížená citlivost při prvním replikátu mohla být způsobena tím, že při přípravě se pipetovaná cercárie přilepila na stěnu špičky, a tím nebyla přidána do vody.

5.3 Terénní sběry eDNA a vodních plžů

Po potvrzení funkčnosti použité metody cLAMP s filtrací eDNA na laboratorních vzorcích byla esej testována na terénních vzorcích. K těmto účelům byly vybrány lokality, kde byla hlášena CD, nebo alespoň bylo podezření na výskyt původců CD, a to základě dotazníku SZÚ (Odkaz 5), nebo ústním sdělením. Zahrnuty byly i dvě lokality (1 a 2), které byly kvůli výskytu CD celosezónně zavřeny. Cílem bylo otestovat metodu na potenciálně pozitivních vzorcích, a tím potvrdit její funkčnost v reálných podmínkách. Poslední lokalitou byla negativní kontrola, jezírko ve skleníku PřF UK bez výskytu MH i DH, tudíž s prakticky nulovou šancí výskytu původců CD. Na všech vybraných 7 lokalitách byla kromě molekulární detekce cLAMP provedena i detekce založená na sběru vodních plžů, aby mohly být výsledky obou metod porovnány z hlediska úspěšnosti detekce a náročnosti provedení. Výsledky detekce původců CD se u obou metod plně shodovaly jen ve dvou případech (2.1 a 4), rozdílné výsledky však byly očekávány, jelikož je v literatuře uváděno, že metoda vyšetřování plžů vykazuje nižší senzitivitu (Nwoko *et al.*, 2021). Například u sběrů 1.3 a 5 byl pozorován pozitivní výsledek molekulární detekce, ačkoliv nebyli na lokalitě nalezeni pozitivní plži. První zmíněný odběr 1.3 byl však ovlivněn zásahem provozovatelů biotopu, tedy systematickým strojovým odstraňováním všech plžů na lokalitě, celkem tak bylo nalezeno pouze 10 plžů malé velikosti. Opakované odběry na lokalitě č. 1 měly poskytnout informace o možnostech využití molekulární metody detekce pro určení, zda je po zásahu

lokalita vhodná k znovu otevření. Pozitivní výsledek molekulární detekce tohoto odběru by mohl poukazovat na riziko přítomnosti původců CD.

Problémy spojené s filtrací eDNA z vody

S detekcí založené na filtraci eDNA je spojeno několik problémů, které mohou ovlivnit její výsledek. Jedním z nich může být ucpávání při použití velmi hustých filtrů a tím snížení šance zachycení eDNA (Liang a Keeley, 2013; Minamoto *et al.*, 2016). Jelikož byl v rámci této práce využit filtr s velikostí ok 0,8 μm (Sylphium), došlo u sběru č. 6 před ucpáním k filtraci pouze 300 ml vody, a to kvůli vysoké turbiditě (zákalu) vody, průhlednost vody byla jen 20 cm, zároveň byla naměřena největší koncentrace chlorofylu ze všech sledovaných lokalit (71 $\mu\text{g/l}$). Výsledek molekulární detekce byl tak negativní, byla však na lokalitě nalezena *T. franki*. Ačkoliv výrobce uvádí, že oproti jiným běžně používaným filtrům (např. Sterivex) je jejich systém schopen přefiltrovat až 10x větší objem vody, je z tohoto výsledku patrné, že pro detekci na lokalitách s vysokou turbiditou vody není tento filtrační systém zcela vhodný. Řešení by mohly nabídnout alternativní systémy zachycení eDNA (viz Literární úvod) založené např. na smotcích vaty a gázy (Maiello *et al.*, 2022).

Dalším problémem spojeným s detekcí eDNA je interpretace samotných výsledků. Pozitivní reakce jednoznačně potvrzuje přítomnost DNA, v případě této práce motolic rodu *Trichobilharzia*. V kontextu CD však tento výsledek nemusí znamenat přítomnost vývojových stádií způsobující toto onemocnění (cerkárii). DNA může pocházet z jiných stádií, např. z miracidí, která však bez přítomnosti vhodného MH nemohou pokračovat ve vývoji v cercárie. Dalším problémem je fakt, že se může DNA vyskytovat na lokalitě i dlouho po tom, co parazit z lokality vymizel; např. může být usazená v sedimentech, kde je díky anoxickému prostředí zpomalen její rozpad a po zviření se opět dostane do vodního sloupce (Harper *et al.*, 2019). Obecně je životnost eDNA ovlivněna mnoha faktory, abiotickými (působení UV světla, teplota, pH) a biologickými (mikrobiální aktivita atd.), přičemž nejrychleji dochází k jejímu rozpadu teplé vodě s nízkým pH (Strickler *et al.*, 2015, Peixoto *et al.*, 2023). Životnost molekuly eDNA může pohybovat od 2 týdnů až po 1 měsíc, přičemž konkrétně v uzavřených vodních plochách (rybník, koupaliště) navíc dochází k akumulaci eDNA, což zvyšuje šanci jejího zachytu a pozitivní výsledek molekulární detekce (Harper *et al.*, 2019). Tento fakt může vysvětlovat i výše popsany pozitivní výsledek při sběru 1.3, kdy byla sice vysbírána z lokality většina plžů, DNA však ve vodě mohla přetrvávat. Výsledek by byl v tom případě falešně pozitivní, jelikož na lokalitě již nehrozilo nebezpečí CD.

Distribuce eDNA v rámci vodní plochy nemusí být homogenní (Herder *et al.*, 2014, citováno dle Peixoto *et al.*, 2023), proto byla zvolena metodika, jež by měla poskytovat větší šanci zachycení eDNA, a to odebírání menších objemů na několika místech v rámci jedné lokality místo filtrace co největšího objemu z jednoho místa. S publikovanou literaturou se shoduje i metodické doporučení výrobce použitých filtrů. Ačkoliv byla snaha zvýšit šanci zachycení eDNA použitím filtrů s velkou filtrační kapacitou (až 2,5 l) a odebíráním vzorků na několika místech na lokalitě, byla v průběhu testování pozorována u vzorků 1.1, 1.2, 1.3, 2.2, 3, 5, 6 nekonzistentnost v rámci jednotlivých replikátů.

Problém optimalizace protokolu cLAMP s filtrací eDNA

Použitý filtrační set od firmy Sylphium byl navržen pro použití v kombinaci s qPCR. Součástí setu byl i izolační kit, jehož posledním krokem bylo dle protokolu rozpuštění peletu DNA v pufru, po rozpuštění doporučuje výrobce využít 2 μ l DNA do qPCR reakce (Sylphium). V případě této práce byla však využita cLAMP esej, z toho důvodu byl DNA pelet po izolaci rozpuštěn ve vodě, aby nedocházelo k ovlivnění barevné změny v průběhu reakce dle doporučení výrobce mastermixu (tento jev byl popsán výše). Výrobce cLAMP mastermixu navíc uvádí, že do reakce lze přidat i větší objemy DNA (Sylphium). Proto byly v rámci této práce testovány dva objemy přidané DNA, konkrétně 2 μ l a 6 μ l (vždy v triplicátu). Vliv přidaného objemu DNA do reakce, se však projevil pouze u výsledku ze sběru 2.2, kdy všechny reakce s 2 μ l byly negativní. Ačkoliv se projevil tento výsledek pouze u jednoho vzorku, byl standardní objem přidané DNA stanoven na 6 μ l. Pro optimalizaci metody by však bylo vhodné otestovat vliv přidaného objemu DNA na více vzorcích.

Kontaminace a falešná pozitivita

Problémem využití vysoce senzitivních metod při detekci či diagnostice je nebezpečí kontaminace, která může vyústit ve falešně pozitivní výsledky (Aysal *et al.*, 2020), přičemž detekce založená na eDNA není výjimkou (Ballantyne *et al.*, 2013). Kontaminace může mít více zdrojů: buďto dochází ke kontaminaci mezi vzorky při přípravě reakce, tzv. zkřížená kontaminace, dále může dojít k přenesení produktů předešlých reakcí z dlouhodobě kontaminovaného prostředí, ty pak slouží jako templát pro reakce další, tzv. „carryover“ kontaminace (Lo *et al.*, 2006; Zen *et al.*, 2020). Těmito dvěma způsoby může dojít ke kontaminaci buďto samotné reakční směsi, ale v horším případě i používaných zásobních reagentů. Z toho důvodu je doporučováno jednotlivé kroky při přípravě od sebe prostorově oddělit, na tzv. „čisté“ místnosti a „špinavé“ místnosti. V praxi to znamená, že by izolace vzorku (čistá m.), příprava reagentů pro reakci (čistá m.), amplifikace vzorku (špinavá m.) a analýza produktů reakce (špinavá m.) měly probíhat v separátních místnostech (Aysal *et al.*, 2020). Kromě prostorového oddělení jednotlivých kroků přípravy byl v rámci této práce využit speciální cLAMP master mix, který místo nukleotidové báze T, obsahoval U, který byl inkorporován do všech vzniklých amplikonů. Reakce navíc obsahovala enzym UDG (uracil-DNA glykosylázu), který v případě „carryover“ kontaminace amplikony z minulých reakcí enzymaticky odstraní, a to bez ovlivnění ostatní DNA ve vzorku (Zen *et al.*, 2020). Pro zamezení zkřížené kontaminace bylo v rámci této práce testováno využití minerálních olejů, které tvoří na hladině reakční směsi bariéru, a tím zamezují přenosu DNA v podobě aerosolu mezi vzorky při manipulaci se zkumavkou. Manipulace s otevřenými vzorky navíc probíhala v laminárním boxu, kde mezi jednotlivými přípravami bylo použito UV světlo pro dekontaminaci. Proces dekontaminace UV světlem však může být ovlivněn sekvencí DNA, UV světlo totiž způsobuje strukturální poškození, založené na spojování pyrimidinových bází (T a C), při nízkém obsahu těchto bází je DNA odolnější k působení UV světla. Při dekontaminaci povrchů bylo navíc prokázáno, že DNA v „suchém stavu“ je více odolná k působení UV světla, dekontaminované povrchy by tedy měly být vlhké (Glišin *et al.*, 1967; Aysal *et al.*, 2020).

I přes veškeré preventivní kroky, byla pozorována pozitivní kolorimetrická změna reakce u některých negativních kontrol. Jelikož LAMP esej využívá větší počet primerů než PCR, v tomto případě 6, je více náchylná k falešné pozitivitě, kdy samotné primery mohou iniciovat reakci bez přítomnosti DNA (Hardinge *et al.*, 2019). Jelikož byla využita sekvenčně nezávislá metoda vizualizace produktů LAMP reakce, bylo nutné tyto pozitivní výsledky u negativních kontrol dále analyzovat. Pro potvrzení přítomného produktu byly reakce analyzovány pomocí gelové elektroforézy, přičemž v případě amplifikace templátové DNA byly pozorovány typické žebříkovité vzory. Navíc byla navržena sada primerů pro PCR na úsecích, které by se bez přítomnosti templátové DNA v produktech nevyskytovaly. U všech vzorků bylo potvrzeno, že se se jednalo o falešně pozitivní výsledek v důsledku kontaminace vzorků. Zdroj samotné kontaminace je však velice obtížné určit, s největší pravděpodobností došlo ke zkřížené kontaminaci při přípravě jednotlivých reakcí. Falešná pozitivita u sekvenčně nezávislých vizualizačních metod, kterou je i kolorimetrie pomocí pH indikátorů využitých v této práci, je problém, jehož řešení nabízí sekvenčně závislé metody (shrnuto v přehledovém článku Becherer *et al.*, 2020, pro uvedení do praxe mají tyto metody nevýhodu vyšší ceny).

5.4 Finanční náklady a využitelnost metody při rutinním monitoringu

Pro uvedení vyvíjené metody do praxe při rutinním monitoringu původců CD, je kladen důraz na nízkou celkovou cenu. Aby byli sníženy náklady na jednu cLAMP reakci byl reakční objem snížen z 25 μ l na 15 μ l, což dle protokolu výrobce a dostupné literatury nemá vliv na výsledek reakce (Shi *et al.*, 2021). Tím bylo docíleno snížení ceny reagensů potřebných pro cLAMP na jednu reakci o 40 %. Při porovnání celkové ceny dvou metod, sběru a vyšetřování vodních plžů s cLAMP v kombinaci s eDNA, s hodinovou mzdou 250 Kč byla molekulární detekce pouze o 160 Kč dražší. V praxi tato metoda umožňuje zpracovávat více vzorků najednou oproti sběru plžů, který je prostorově a časově náročný. Jelikož se momentálně oficiálně monitoringu CD v ČR věnují pouze 4 pracoviště, není metoda sběru a vyšetřování vodních plžů z kapacitních důvodů zcela vyhovující a molekulární detekce by mohla nabídnout vhodnou alternativu. Odběr vodních plžů navíc musí provádět erudovaný pracovník, oproti filtraci vody, která je běžně prováděna techniky hygienických stanic (Pummann 2023, ústní sdělení).

5.4.1 Amplifikace bez izolace DNA

V literatuře je popisováno využití molekulárních detekčních metod bez izolace DNA, za účelem tzv. „point-of-care“ detekce. Vynecháním kroku izolace DNA je celý proces detekce urychlen, navíc je snížena finanční náročnost (Modak *et al.*, 2016). V kontextu cercáriové dermatitidy by cLAMP bez izolace DNA mohla sloužit pro rychlou rodovou a druhovou determinaci vyloučených cercárií z plžů. Pro druhovou determinaci cercárií na základě morfologie je totiž zapotřebí zkušeného pozorovatele, navíc jsou jednotlivé druhy rodu *Trichobilharzia* na základě morfologie v podstatě neodlišitelné (Podhorský *et al.*, 2009). Výsledky provedených pokusů s celými cercáriemi přidanými do reakce bez izolace DNA ukazují pozitivní výsledek ve všech provedených replikátech. Tento postup by mohl v praxi sloužit pro rychlou a nenáročnou druhovou determinaci.

5.5 Závěr diskuze

Molekulární detekce cLAMP v kombinaci s filtrací eDNA může poskytnout žádanou alternativu pro rutinní monitoring původců CD nejen v ČR. Díky využití izotermální amplifikace cLAMP není oproti qPCR zapotřebí drahého přístrojového vybavení. Oproti sběru a vyšetřování vodních plžů je tato metoda časově nenáročná, vzorky mohou být odebrány v rámci standardního odběru vody např. pro výskyt sinic techniky hygienických stanic. Sběr a vyšetřování vodních plžů musí být provedeno do 24 h po odběru, při velkém počtu plžů je z prostorových důvodů možno vyšetřit jedince pouze z jedné lokality najednou. Odběr a fixace eDNA pomocí filtrů umožňuje skladovat vzorek až 14 dní, a lze vyšetřovat vzorky hned z několika lokalit najednou. Pro rutinní aplikaci však musí být vyřešen problém kontaminace vzorků.

6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo vytvoření molekulární detekční eseje pro rod *Trichobilharzia*, nejčastějšího původce cercáriové dermatitidy v ČR, založené na cLAMP a filtraci eDNA z vody, otestovat její specificitu, senzitivitu, využití v terénu, porovnat její výsledky s metodou sběru a vyšetřování vodních plžů a zhodnotit její využitelnost v praxi při rutinním monitoringu původců cercáriové dermatitidy.

V rámci této práce se podařilo:

- Pomocí molekulární analýzy nalézt specifickou sekvenci pro rod *Trichobilharzia*, na jejím základě navrhnout sadu primerů pro cLAMP esej a optimalizovat její protokol.
- Otestovat a potvrdit specificitu navržené eseje na 4 druzích rodu *Trichobilharzia* a 7 druzích motolic jiných rodů. Určit senzitivitu cLAMP eseje na vzorcích PCR amplikonů (10^4 kopií) a plasmidové DNA (10^8 kopií).
- Potvrdit funkčnost spojení metody cLAMP a filtrování eDNA z vody, otestovat tuto metodu na terénních vzorcích a porovnat ji s metodou sběru a vyšetřování vodních plžů.

7 ZDROJE

7.1 Seznam použité literatury:

- Ahmed, A.A.M. et al. (2002) 'Development of a modified baited trap for detection of schistosome cercariae using natural oils rich in polyunsaturated fatty acids in Sudan', 82(3), pp. 363–368.
- Ahmed, M.U. et al. (2010) 'Meat species identification based on the loop mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor', *Food Control*, 21, pp. 599–605.
- Ai, L. et al. (2010) 'Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay', *Veterinary parasitology*, 174(3–4), pp. 228–233.
- Aldhoun, J.A. et al. (2009) 'Schistosomes in the North: A unique finding from a prosobranch snail using molecular tools', *Journal of Helminthology* 58(3), pp. 314–317.
- Al-Jubury, A. et al. (2020) 'Temperature and light effects on *Trichobilharzia szidati* cercariae with implications for a risk analysis', *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1).
- Allan, F. et al. (2013) 'Use of sentinel snails for the detection of *Schistosoma haematobium* transmission on Zanzibar and observations on transmission patterns', *Acta Tropica*, 128, pp. 234–240.
- Alzaylaee, H. et al. (2020) 'Environmental DNA-based xenomonitoring for determining *Schistosoma* presence in tropical freshwaters', *Parasites and Vectors*, 13(1), pp. 1–11.
- Amin Almasi, M. (2012) 'Development of Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus', *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 04(01).
- Arimatsu, Y. et al. (2012) 'Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* copro-DNA using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)', *Parasitology International*, 61(1), pp. 178–182.
- Aysal, A. et al. (2020) 'How to Set Up a Molecular Pathology Lab: A Guide for Pathologists', *Turkish Journal of Pathology*, 36(3), p. 179.
- Baláž, V. et al. (2023) 'Angie-LAMP for diagnosis of human eosinophilic meningitis using dog as proxy: A LAMP assay for *Angiostrongylus cantonensis* DNA in cerebrospinal fluid', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 17(5).
- Ball, C.S. et al. (2016) 'Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters in Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Enabling Bright, Single-Step, Closed-Tube, and Multiplexed Detection of RNA Viruses', *Analytical chemistry*, 88(7), pp. 3562–3568.
- Ballantyne, K.N. et al. (2013) 'Environmental DNA monitoring: beware of the transition to more sensitive typing methodologies', *Australian Journal of Forensic Sciences*, 45(3), pp. 323–340.
- Bärenbold, O. et al. (2017) 'Estimating sensitivity of the Kato-Katz technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* and hookworm in relation to infection intensity', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(10), p. e0005953.
- Bartoniček, Z. (2023) Schistosomes and how to find them – advancing the molecular environmental monitoring of schistosomiasis. Disertační práce, *University College London*.
- Bass, D. et al. (2023) 'Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ecology'. *Trends in Parasitology*
- Becherer, L. et al. (2020) 'Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection', *Analytical Methods*, 12(6), pp. 717–746.
- Brant, S. V. and Loker, E.S. (2013) 'Discovery-based studies of schistosome diversity stimulate new hypotheses about parasite biology', *Trends in Parasitology*, 29(9), pp. 449–459.
- Brown, R. et al. (2011) 'Small-scale to large-scale and back: Larval trematodes in *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* in Central Europe', *Parasitology Research*, 108(1), pp. 137–150.
- Buddhachat, K. et al. (2021) 'One-step colorimetric LAMP (cLAMP) assay for visual detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice', *Crop Protection*, 150.
- Cai, X.Q. et al. (2010) 'Sensitive and rapid detection of *Clonorchis sinensis* infection in fish by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)', *Parasitology Research*, 106(6), pp. 1379–1383.

- Chen, M.X. et al. (2011)** ‘Sensitive and rapid detection of *Paragonimus westermani* infection in humans and animals by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)’, *Parasitology Research*, 108(5), pp. 1193–1198.
- Chuang, T.L. et al. (2012)** ‘A polycarbonate based surface plasmon resonance sensing cartridge for high sensitivity HBV loop-mediated isothermal amplification’, *Biosensors and Bioelectronics*, 32(1), pp. 89–95.
- Cort, W.W. (1928)** ‘Schistosome dermatitis in the united states (michigan)’, *Journal of the American Medical Association*, 90(13), pp. 1027–1029.
- ČSN 75 7737 (2021):** Kvalita vod – Stanovení původců cercáriové dermatitidy ve vodním prostředí
- Dao Thi, V.L. et al. (2020)** ‘A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples’, *Science Translational Medicine*, 12(556).
- Daskou, M. et al. (2019)** ‘WarmStart colorimetric LAMP for the specific and rapid detection of HPV16 and HPV18 DNA’, *Journal of Virological Methods*, 270, pp. 87–94.
- Davis, C.N. et al. (2020)** ‘Rapid detection of *Galba truncatula* in water sources on pasture-land using loop-mediated isothermal amplification for control of trematode infections’, *Parasites and Vectors*, 13(1), pp. 1–11.
- Davis, N.E., Blair, D. and Brant, S. V. (2022)** ‘Diversity of *Trichobilharzia* in New Zealand with a new species and a redescription, and their likely contribution to cercarial dermatitis’, *Parasitology*, 149(3), pp. 380–395.
- Doi, H. et al. (2017)** ‘Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA’, *Limnology and Oceanography: Methods*, 15(2), pp. 212–218.
- Dvořák, J. et al. (2002)** ‘Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences’, *Parasitology*, 124(3), pp. 307–313.
- Ebbs, E.T. et al. (2022)** ‘Phylogenomics and Diversification of the Schistosomatidae Based on Targeted Sequence Capture of Ultra-Conserved Elements’, *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(7).
- Faltýnková, A., Sures, B. and Kostadinova, A. (2016)** ‘Biodiversity of trematodes in their intermediate mollusc and fish hosts in the freshwater ecosystems of Europe’, *Systematic Parasitology*, 93(3), pp. 283–293.
- Ferguson, B.S. et al. (2009)** ‘Integrated microfluidic electrochemical DNA sensor’, *Analytical Chemistry*, 81(15), pp. 6503–6508
- Fernández-Soto, P. et al. (2014)** ‘A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model’, *PLoS neglected tropical diseases*, 8(9).
- Fernández-Soto, P. et al. (2020)** ‘Molecular Markers for Detecting *Schistosoma* Species by Loop-Mediated Isothermal Amplification’, *Disease Markers*, 2020.
- Ficetola, G.F. et al. (2008)** ‘Species detection using environmental DNA from water samples’, *Biology Letters*, 4(4), pp. 423–425.
- Furlan, E.M. et al. (2016)** ‘A framework for estimating the sensitivity of eDNA surveys’, *Molecular Ecology Resources*, 16(3), pp. 641–654.
- Galvez, L.C. et al. (2020)** ‘Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of abaca bunchy top virus and banana bunchy top virus in abaca’. *Crop portection*
- Gandasegui, J. et al. (2016)** ‘Biompha-LAMP: A New Rapid Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detecting *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* Snail Host’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(12).
- Gandelman, O. et al. (2011)** ‘Loop-mediated amplification accelerated by stem primers’, *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), pp. 9108–9124.
- Glišin, V.R. and Doty, P. (1967)** ‘The cross-linking of DNA by ultraviolet radiation’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 142(2), pp. 314–322.
- Goto, M. et al. (2009)** ‘Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue’, *BioTechniques*, 46(3), pp. 167–172.
- Hamburger, J. et al. (2013)** ‘Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Suitable for Molecular Monitoring of Schistosome-Infected Snails in Field Laboratories’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(2), p. 344.

- Han, E.T. et al. (2007)** ‘Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis’, *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), pp. 2521–2528.
- Hancks, D.C. and Kazazian, H.H. (2016)** ‘Roles for retrotransposon insertions in human disease’, *Mobile DNA* 2016 7:1, 7(1), pp. 1–28.
- Hardinge, P. and Murray, J.A.H. (2019)** ‘Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers’, *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), pp. 1–13.
- Harper, L.R. et al. (2019)** ‘Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds’, *Hydrobiologia*, 826(1), pp. 25–41.
- Helmer, N. et al. (2021)** ‘First record of trichobilharzia physellae (Talbot, 1936) in europe, a possible causative agent of cercarial dermatitis’, *Pathogens*, 10(11), p. 1473.
- Herder, J., V.A., B.E., D.T., van D.J., T.P.F., & T.P. (2014)** ‘Environmental DNA → a review of the possible applications for the detection of (invasive) species.’, *Stichting RAVON, Nijmegen*
- Hlinka, O., Murrell, A. and Barker, S.C. (2002)** ‘Evolution of the secondary structure of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in hard ticks (Ixodidae, Arthropoda)’, *Heredity*, 88, pp. 275–279.
- Hoekstra, P.T. et al. (2022)** ‘Diagnosis of Schistosomiasis without a Microscope: Evaluating Circulating Antigen (CCA, CAA) and DNA Detection Methods on Banked Samples of a Community-Based Survey from DR Congo’, *Tropical medicine and infectious disease*, 7(10).
- Horák, P. et al. (2015)** ‘Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis’, *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), pp. 165–190.
- Horák, P., Kolářová, L. and Adema, C.M. (2002)** ‘Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*’, *Advances in parasitology*, 52, pp. 155–233.
- Horák, P., Kolářová, L. and Dvořák, J. (1998)** ‘*Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe’, *Parasite*, 5(4), pp. 349–357.
- Hsieh, K. et al. (2012)** ‘Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification’, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 51(20), pp. 4896–4900.
- Iwamoto, T., Sonobe, T. and Hayashi, K. (2003)** ‘Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Sputum Samples’, *Journal of clinical microbiology*, 41(6), pp. 2616–2622.
- Jackson, M. et al. (2017)** ‘Using nested PCR to improve detection of earthworm eDNA in Canada’, *Soil Biology and Biochemistry*, 113, pp. 215–218.
- Jaroenram, W., Cecere, P. and Pompa, P.P. (2019)** ‘Xylenol orange-based loop-mediated DNA isothermal amplification for sensitive naked-eye detection of *Escherichia coli*’, *Journal of microbiological methods*, 156, pp. 9–14.
- Jones, R.A. et al. (2018)** ‘Detection of *Galba truncatula*, *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi* environmental DNA within water sources on pasture land, a future tool for fluke control?’, *Parasites and Vectors*, 11(1), pp. 1–9.
- Jouet, D. et al. (2015)** ‘*Trichobilharzia anseri* n. sp. (Schistosomatidae: Digenea), a new visceral species of avian schistosomes isolated from greylag goose (*Anser anser* L.) in Iceland and France’, *Infection, Genetics and Evolution*, 34, pp. 298–306.
- Kamel, B. et al. (2021)** ‘Detecting and identifying schistosoma infections in snails and aquatic habitats: A systematic review’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science.
- Kane, R.A. et al. (2013)** ‘Detection and quantification of schistosome {DNA} in freshwater snails using either fluorescent probes in real-time {PCR} or oligochromatographic dipstick assays targeting the ribosomal intergenic spacer’, *Acta Tropica*, 128(2), pp. 241–249.
- Karthik, K. et al. (2014)** ‘New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination’, *MethodsX*, 1, pp. 137–143.
- Kolářová, L. et al. (2006)** ‘*Allobilharzia visceralis* gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae-Trematoda) from *Cygnus cygnus* (L.) (Anatidae)’, *Parasitology International*, 55(3), pp. 179–186.
- Kolářová, L. et al. (2013)** ‘Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease’, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 45(1), pp. 63–74.

- Kolářová L., Horák, P. and Sitko, J. (1997)** ‘Cercarial dermatitis in focus: schistosomes in the Czech Republic’, *Helminthologia*, 34(3), pp. 127–139.
- Laha, T. et al. (2002)** ‘Reverse transcriptase activity and untranslated region sharing of a new RTE-like, non-long terminal repeat retrotransposon from the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*’, *International Journal for Parasitology*, 32(9), pp. 1163–1174.
- Lai, M.Y., Ooi, C.H. and Lau, Y.L. (2021)** ‘Validation of SYBR green I based closed-tube loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for diagnosis of knowlesi malaria’, *Malaria Journal*, 20(1), pp. 1–6.
- Lashaki, E.K. et al. (2020)** ‘Global prevalence status of avian schistosomes: A systematic review with meta-analysis’. *Parasite Epidemiology and Control*
- Le, T.H. et al. (2012)** ‘Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *Opisthorchis viverrini* (opisthorchiidae; trematoda; platyhelminthes)’, *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), pp. 1178–1184.
- Lear, G. et al. (2018)** ‘Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples’, *New Zealand Journal of Ecology*, 42(1), pp. 1–50.
- Lee, M.F., Chen, Y.H. and Peng, C.F. (2009)** ‘Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*’, *Journal of microbiological methods*, 76(2), pp. 174–180.
- Liang, Z. and Keeley, A. (2013)** ‘Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples’, *Environmental Science and Technology*, 47(16), pp. 9324–9331.
- Van Lieshout, L. et al. (1997)** ‘Detection of the circulating antigens CAA and CCA in a group of Dutch travellers with acute schistosomiasis’, *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 2(6), pp. 551–557.
- Lo, Y.M.D. and Chan, K.C.A. (2006)** ‘Setting up a polymerase chain reaction laboratory’, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 336, pp. 11–18.
- Loker, E.S., Dejong, R.J. and Brant, S. V. (2022)** ‘Scratching the Itch: Updated Perspectives on the Schistosomes Responsible for Swimmer’s Itch around the World’, *Pathogens 2022*, Vol. 11, Page 587, 11(5), p. 587.
- Macháček, T. et al. (2018)** ‘Cercarial dermatitis: a systematic follow-up study of human cases with implications for diagnostics’, *Parasitology Research*, 117(12), pp. 3881–3895.
- Maiello, G. et al. (2022)** ‘Little samplers, big fleet: eDNA metabarcoding from commercial trawlers enhances ocean monitoring’, *Fisheries Research*, 249, p. 106259.
- Mekata, T. et al. (2006)** ‘Detection of yellow head virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)’, *Journal of Virological Methods*, 135(2), pp. 151–156.
- Minamoto, T. et al. (2016)** ‘Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction’, *Limnology*, 17(1), pp. 23–32.
- Modak, S.S. et al. (2016)** ‘Rapid Point-of-Care Isothermal Amplification Assay for the Detection of Malaria without Nucleic Acid Purification’, *Infectious Diseases: Research and Treatment*
- Mori, Y. et al. (2001)** ‘Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation’, *Biochemical and biophysical research communications*, 289(1), pp. 150–154.
- Mori, Y. et al. (2004)** ‘Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA’, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59(2), pp. 145–157.
- Müller, V. and Kimmig, P. (1994)** ‘*Trichobilharzia franki* n. sp.--the cause of swimmer’s dermatitis in southwest German dredged lakes’, *Applied Parasitology*, 35(1), pp. 12–31.
- Nagamine, K., Hase, T. and Notomi, T. (2002)** ‘Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers’, *Molecular and Cellular Probes*, 16, pp. 223–229.
- Nakamura, N. et al. (2007)** ‘Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip’, *Analytical Chemistry*, 79(24), pp. 9484–9493.
- Neuhaus, W. (1952)** ‘Biology and Development of *Trichobilharzia szidati*, a Cause of Human Dermatitis.’, *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, 15(3), pp. 203–66.

- Nimitphak, T., Kiatpathomchai, W. and Flegel, T.W. (2008)** ‘Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick’, *Journal of Virological Methods*, 154, pp. 56–60.
- Nkouawa, A. et al. (2009)** ‘Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species’, *Journal of clinical microbiology*, 47(1), pp. 168–174.
- Nolasco, O. et al. (2021)** ‘Multicopy targets for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* detection by colorimetric LAMP’, *Malaria Journal*, 20(1).
- Notomi, T. et al. (2000)** ‘Loop-mediated isothermal amplification of DNA.’, *Nucleic acids research*, 28(12), p. 63.
- Nwoko, O.E., Mogaka, J.J.O. a Chimbari, M.J. (2021)** ‘Challenges and Opportunities Presented by Current Techniques for Detecting Schistosome Infections in Intermediate Host Snails: A Scoping Review’, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(10).
- Nzulu, C.O. et al. (2016)** ‘A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool’, *Acta Tropica*, 153, pp. 116–119.
- Ogram, A., Saylor, G.S. and Barkay, T. (1987)** The extraction and purification of microbial DNA from sediments, *Journal of Microbiological Methods*.
- Ouma, J.H. et al. (1989)** ‘A comparative evaluation of snail sampling and cercariometry to detect *Schistosoma mansoni* transmission in a large-scale, longitudinal field-study in Machakos, Kenya’, *Parasitology*, 99 Pt 3(3), pp. 349–355.
- Pace, N.R. (1997)** ‘A molecular view of microbial diversity and the biosphere’, *Science*, 276(5313), pp. 734–740.
- Patton, G.C. et al. (2021)** ‘Optimizing a rapid, isothermal workflow for detection of SARS-CoV-2 viral RNA using WarmStart® LAMP Reagents with UDG’. *New England Biolabs Application Note*
- Pawlowski, J., Apothéoz-Perret-Gentil, L. a Altermatt, F. (2020)** ‘Environmental DNA: What’s behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring’, *Molecular Ecology*, 29(22), pp. 4258–4264.
- Peixoto, S. et al. (2021)** ‘Species detection from aquatic eDNA: Assessing the importance of capture methods’, *Environmental DNA*, 3(2), pp. 435–448.
- Peixoto, S. et al. (2023)** ‘Multi-species occupancy modeling reveals methodological and environmental effects on eDNA detection of amphibians in temporary ponds’, *Environmental DNA*, 5(4), pp. 796–811.
- Peterson, D.L. et al. (2023)** ‘Specificity and Sensitivity of a Rapid LAMP Assay for Early Detection of Emerald Ash Borer (*Agrilus planipennis*) in Europe’, *Forests*, 14(2), p. 436.
- Podhorský, M. et al. (2009)** ‘Cercarial dimensions and surface structures as a tool for species determination of *Trichobilharzia* spp.’, *Acta Parasitologica*, 54(1), pp. 28–36.
- Poole, C.B. et al. (2017)** ‘Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP)’, *PloS one*, 12(2).
- Prentice, M.A. and Ouma, J.H. (1984)** ‘Field comparison of mouse immersion and cercariometry for assessing the transmission potential of water containing cercariae of *Schistosoma mansoni*’, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 78(2), pp. 169–172.
- Rashwan, N. et al. (2017)** ‘Isothermal diagnostic assays for the detection of soil-transmitted helminths based on the SmartAmp2 method’, *Parasites and Vectors*, 10(1), pp. 1–12.
- Ravan, H. and Yazdanparast, R. (2013)** ‘Loop region-specific oligonucleotide probes for loop-mediated isothermal amplification-enzyme-linked immunosorbent assay truly minimize the instrument needed for detection process’, *Analytical biochemistry*, 439(2), pp. 102–108.
- Renshaw, M.A. et al. (2015)** ‘The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction’, *Molecular ecology resources*, 15(1), pp. 168–176.
- Röder, B. et al. (2010)** ‘Impact of Long-Term Storage on Stability of Standard DNA for Nucleic Acid-Based Methods’, *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), p. 4260.

- Rosser, A. et al. (2015)** ‘Isothermal Recombinase Polymerase amplification (RPA) of *Schistosoma haematobium* DNA and oligochromatographic lateral flow detection’, *Parasites & Vectors*, 8(1).
- Rudko, S.P. et al. (2018)** ‘Use of qPCR-Based Cercariometry to Assess Swimmer’s Itch in Recreational Lakes’, *EcoHealth*, 15(4), pp. 827–839
- Rudko, S.P. et al. (2019)** ‘Species-specific qPCR assays allow for high-resolution population assessment of four species avian schistosome that cause swimmer’s itch in recreational lakes’, *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9(April), pp. 122–129.
- Rudolfová, J. et al. (2007)** ‘Bird schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland’, *Folia Parasitologica*, 54(2), pp. 88–93.
- Rusch, J.C. et al. (2020)** ‘Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe Advancing research on alien species and biological invasions’, *NeoBiota*, 58, pp. 1–32.
- Safavieh, M. et al. (2012)** ‘Microfluidic electrochemical assay for rapid detection and quantification of *Escherichia coli*’, *Biosensors and Bioelectronics*, 31(1), pp. 523–528.
- Salinas, N.R. and Little, D.P. (2012)** ‘Electric LAMP: Virtual Loop-Mediated Isothermal AMplification’, *ISRN bioinformatics*, 2012, pp. 1–5.
- Sambrook J, F.E.M.T. (1989)** ‘Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York’, *Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*
- Sato, M.O. et al. (2018)** ‘Usefulness of environmental DNA for detecting *Schistosoma mansoni* occurrence sites in Madagascar’, *International Journal of Infectious Diseases*, 76, pp. 130–136.
- Schabacker, J.C. et al. (2020)** ‘Increased eDNA detection sensitivity using a novel high-volume water sampling method’, *Environmental DNA*, 2(2), pp. 244–251.
- Schneider, L., Blakely, H. and Tripathi, A. (2019)** ‘Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis’, *Electrophoresis*, 40(20), p. 2706.
- Sengupta, M.E. et al. (2019)** ‘Environmental DNA for improved detection and environmental surveillance of schistosomiasis’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(18), pp. 8931–8940.
- Sengupta, M.E. et al. (2022)** ‘Environmental DNA in human and veterinary parasitology-Current applications and future prospects for monitoring and control’, *Food and Waterborne Parasitology*, 29, p. 183.
- Shi, Y. et al. (2021)** ‘WarmStart colorimetric loop-mediated isothermal amplification for the one-tube, contamination-free and visualization detection of *Shigella flexneri*’, *International Journal of Infectious Diseases*, 112, pp. 55–62.
- Shiff, C.J. et al. (1993)** A Trap for the Detection of Schistosome Cercariae, Source: *The Journal of Parasitology*.
- Singleton, J. et al. (2014)** ‘Electricity-Free Amplification and Detection for Molecular Point-of-Care Diagnosis of HIV-1’, *PLOS ONE*, 9(11), p. e113693.
- Soldánová, M. et al. (2013)** ‘Swimmer’s itch: etiology, impact, and risk factors in Europe’, *Trends in Parasitology*, 29(2), pp. 65–74.
- Sorgho, H. et al. (2005)** ‘Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens’, *Acta tropica*, 93(2), pp. 169–180.
- Spear, R. et al. (2015)** ‘Spatial and temporal variability in schistosome cercarial density detected by mouse bioassays in village irrigation ditches in Sichuan, China’, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71, pp. 554–557.
- Spens, J. et al. (2017)** ‘Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter’, *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), pp. 635–645.
- Strand, D.A. et al. (2019)** ‘Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction’, *Journal of Applied Ecology*, 56(7), pp. 1661–1673.
- Strickler, K.M., Fremier, A.K. and Goldberg, C.S. (2015)** ‘Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms’, *Biological Conservation*, 183, pp. 85–92.

- Sturrock, R.F. (1986)** ‘Snail collection to detect schistosome transmission sites’, *Parasitology Today*, 2(3), pp. 59–61.
- Taberlet, P. et al. (2012)** ‘Environmental DNA’, *Molecular Ecology*, 21(8), pp. 1789–1793.
- Takahashi, M. et al. (2023)** ‘Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution’, *Science of The Total Environment*, 873, p. 162322.
- Tanner, N.A., Zhang, Y. and Evans, T.C. (2015)** ‘Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes’, *BioTechniques*, 58(2), pp. 59–68.
- Theron, A. (1979)** ‘A differential filtration technique for the measurement of schistosome cercarial densities in standing waters’, *Bulletin of the World Health Organization*, 57(6), p. 971.
- Tomita, N. et al. (2008)** ‘Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products’, *Nature Protocols*, 3(5), pp. 877–882.
- Valentini, A. et al. (2016)** ‘Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding’, *Molecular Ecology*, 25(4), pp. 929–942.
- Wang, D.G. et al. (2015)** ‘Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification’, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(4), pp. 6048–6059.
- Wastling, S.L. et al. (2010)** ‘LAMP for human African trypanosomiasis: A comparative study of detection formats’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11).
- WHO (2023):** Schistosomiasis, Dostupné na: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/schistosomiasis> [online, 11.12.2023]
- Williams, M.R. et al. (2017)** ‘Isothermal amplification of environmental DNA (eDNA) for direct field-based monitoring and laboratory confirmation of *Dreissena* sp.’, *PLOS ONE*, 12(10), p. e0186462.
- Xie, S. et al. (2014)** ‘Development of an electrochemical method for Ochratoxin A detection based on aptamer and loop-mediated isothermal amplification’, *Biosensors and Bioelectronics*, 55, pp. 324–329.
- Xu, J. et al. (2010)** ‘Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)’, *International journal for parasitology*, 40(3), pp. 327–331.
- Xu, J. et al. (2015)** ‘DNA detection of *Schistosoma japonicum*: diagnostic validity of a LAMP assay for low-intensity infection and effects of chemotherapy in humans’, *PLoS neglected tropical diseases*, 9(4).
- Xue, Y. et al. (2021)** ‘A novel loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow-dipstick (LAMP-LFD) device for rapid detection of *Toxoplasma gondii* in the blood of stray cats and dogs’, *Parasite (Paris, France)*, 28.
- Xunhui, Z. et al. (2019)** ‘DNA detection of *Paragonimus westermani*: Diagnostic validity of a new assay based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with a lateral flow dipstick’, *Acta Tropica*, 200, p. 105185.
- Zen, L.P.Y., Lai, M.Y. and Lau, Y.L. (2020)** Elimination of contamination in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of human malaria, *Tropical Biomedicine*.
- Zhang, X., Lowe, S.B. and Gooding, J.J. (2014)** ‘Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP)’, *Biosensors and Bioelectronics*, 61, pp. 491–499.

7.2 Internetové zdroje:

- Odkaz 1: https://www.novinky.cz/clanek/domaci-biotop-v-prazske-lhotce-byl-uzavren-kvuli-vyskytu-vyrazky-po-koupani-40435313?_zn=aWQ1M0Q5NTIwMDU0MTYzNjMxNjQwODgyJTdDdCUzRDE3MDA0ODA5MzguNDExJTdDdGU1M0QxNzAwNDgwOTM4LjQxMSU3Q2MIM0RBMzdCMEQwNkVGMkM2QzE3MzkxNUU1RDdCOTIBRjY1RA%3D%3D [citováno 11.12.2023]
- Odkaz 2: <http://www.koupaliste-lhotka.cz/informace-o-vyvoji-situace-na-koupalisti-lhotka/> [citováno 11.12.2023]

- Odkaz 3: <https://szu.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/zivotni-prostredi/kvalita-vody/koupaliste-a-bazeny/dotaznik-zdravotni-problemy-vznikle-v-dusledku-koupani-nebo-kontaktu-s-koupaci-vodou/> [citováno 11.12.2023]
- Odkaz 4: <https://www.printables.com/cs/model/426113-200ml-microtubes-and-strips-stand> [citováno 11.12.2023]
- Odkaz 5: <https://szu.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/zivotni-prostredi/kvalita-vody/koupaliste-a-bazeny/dotaznik-zdravotni-problemy-vznikle-v-dusledku-koupani-nebo-kontaktu-s-koupaci-vodou/> [citováno 11.12.2023]

8 PŘÍLOHY:

Příloha 1: alignment sekvencí TR a TS, zeleně a červeně označena sada primerů č. 3 pro PCR, modře označena sekvence navržené cLAMP eseje

```

TS_HAPLOTYPE_00907 -AATCCAGCTTGTCTCGGTCGGAGTTCTGTATCCAGGATGATGCGACTCAG--GATTTTA 57
TR_HAPLOTYPE_05438 GAATCCAGCTTGTCTCGGTCGGAGTTCTGTATCCAGTGCCTTTATTCTCTCCAGGAT 60
***** * *

TS_HAPLOTYPE_00907 CTTGGCGTCGACAGGAGCGTGATTCTCGCCAGT-----TCT---- 94
TR_HAPLOTYPE_05438 GATGCGAGTCAGGATTTTATTGGCATCGACAGGAGCATGATTCTCGCTAGTTCTTGCG 120
** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 TGCAGAGTCCCAGGTCGCCCTTCTTTGGTAGTTTCACCAGGTAACCTTTCCTCCAGTCAG 154
TR_HAPLOTYPE_05438 GAGTGAGTCTAAGTCGCGCTTCTTCGGTAGTTTCACGAGGTAACCTTTCCTCCAGTCAG 180
***** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 TAGGCACCTTTCCTCTTTCCAGATCT-----TTTGAATAATGGAGTCAGCATATCTGC 209
TR_HAPLOTYPE_05438 TAGGCACCTTTCCTCTTTCCAGATCTTTTGGCAACAACGGAGTCAGCATATCTGC 240
***** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 CGTCGTTTTTGGGTCGGCTTTCAGTGCTTCCGGGGTATTCCATCTGGTCCAGCTGCTTT 269
TR_HAPLOTYPE_05438 TGTAGTCTCTGGGTCGGCTTTCAGTGCTTAAGGGGGTATTCCATCTGGTCCAAGTCTTT 300
** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 TCCAGCTTTCAGAAGCTTGATTGCATTCAGACTCCAGTTTTCGTTGGAGGATTGGTGTC 329
TR_HAPLOTYPE_05438 TCCAGCTTTCAGAAGCTTGATTGCATTCAGACTTCAGCTCTCGTTGGAGGATTGGTGTC 360
***** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 AACTGTCAGTTGTGTACGTGCTGTTGTTGGTATTACTGGACGGGTTGTAGGTGGTGGTCG 389
TR_HAPLOTYPE_05438 AACTTGCAGTTATGTGCGCGCTGTGTTGGTATTCTGGACGGGTTGCAGGTGATGGTCG 420
***** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 GTTCAAGAGTCCTTTGAAGTGGTCCGCCATTTGTTAATCTGTCTTTCTTCTTTGGTAAT 449
TR_HAPLOTYPE_05438 GTTCAAGAGTCCTTTGAAGTGGTCCGCCATTTGTTAATCTGTCTTTCTTCTTTGGTGAT 480
***** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 TGGGTTCCCTTGGCTGTCTTTTATAGGTTTCACTTGTGTTGATCTCTTCCCGATAGAGA 509
TR_HAPLOTYPE_05438 TGGGTTCCCTTGTCTGTCTTTTATAGGTTTTCGCTTTTGTGATCTCTTCCAGATAGAGA 540
***** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 CTTGGTTATCTGATATAGTGTCTCAGGTCCTTTTGCCTGCTGCCTTCTCAGCTTCAGT 569
TR_HAPLOTYPE_05438 TTTGGTTATCTGATATAATGTCTCAGGTCCTTTTGCCTGCTGCCTTCTCAGCTTCAGT 600
***** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 AGCCAGGTTGTCGTAGAAATGTCTTTTGTCTTCCCTGGCACTCTTCTTCACTTCTTTGTC 629
TR_HAPLOTYPE_05438 GGCCAGGTTGTCGTAGAAATGTCTTTTGTCTTCCCTAGCACTCTTCTTCACTTCTTTGTC 660
***** * * * * *

TS_HAPLOTYPE_00907 CAGTGCTGTGTAAGTTGAGTTCAGCGTCTCTTCTCTTGTCCATCTTGCATTGAATCAT 689

```


| | | |
|--------------------|---|------|
| TR_HAPLOTYPE_05438 | CAGTGCTGTGTACGTTGAGCACAAACATCTTTTCTCTTGCCCGTCTTTGCATTGAATCAT | 720 |
| | ***** ** * ** * ***** ** ***** | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | TTTTTCTTTACACCTTCTCCTCTCCTCTATTAGTTTCCAAGTGTCTGTTGAGAGCCATTC | 749 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | TTTCTCTGTCACTATTCAACTCTCTTCTATCAGCTTCCAATTGTCCGTTGAGAG----- | 774 |
| | *** ** * ** * ***** ** ***** | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | CTTGCTTGTTTCTTCTTTCTTCCATAAACCCGTTGAGCACGTTTCGTTGAAAATTACCTT | 809 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | -----TCTCTTCTTTCTTCCATAAACCCGTTGAACACGTTTCGTTAAAATACCTT | 825 |
| | * ***** ***** ***** ***** | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | CAGAGAGTTCCAATGGTCTTCCACGGATGATTCCTCAGTGGTGCTACGTAGTGTTCCTG | 869 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | CAGAGAGTTCCAATGGTCTTCCACGCATGATTCCTCAGTGTGTCACGTAGTGTTCCTG | 885 |
| | ***** ***** ** ***** | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | CTTTGCTCTGACAGTTGACAGTGAAGTGTCTGTGTGATTGTGCTTCAGTTTGTGAGT | 929 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | CTTTGCTCTGACAGTTTTCAGTGAAGTGTCTTTGTGGTTGTGCTTTCAGTTTCTGAGT | 945 |
| | ***** ***** ***** ***** ***** | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | GTTGAACCTTGCATTGTGGCCTATCCCAGGTATCCTCGAGGCTTTCAGCTTACCTTGAA | 989 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | GTTGAACCTTGCATTGTGGCCTATCCCAGGTATCCTCGAGGCTTTCAGCTTACCTTGAA | 1005 |
| | ***** ***** ***** ***** * | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | AGTCCCTTGTACCAGATAGTGGTCTGAACCCACATCTGCTCCTCTCCTCGATCTTGTGTC | 1049 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | AGTCCCTTGTACTAGATAGTGGTCTGAACCCACATCTGCTCCTCTCCTCAACCTTGTGTC | 1065 |
| | ***** ***** ***** * | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | CAGTAGGCTCCGCTCCACCTTCTTGAGATTGAAATGAAGTCTATCTGGTTTTGGTGTG | 1109 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | CAGTAGGCTCCGCTCCACCTTCTTGAAATTGAGATGAAGTCTATTTGATTCTTGGTGTG | 1125 |
| | ***** ***** ***** ** * | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | TCCATCTGGTGAATCCATGTGCGCTTGTGTATATCCCTGTGTTTGAACACACTGCCACC | 1169 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | TCCATCTGGTGAATCCATGTGCGCTTGTGTATATCCCTGTGTTTGAACACACTACCGCC | 1185 |
| | ***** * ***** ***** ***** ** ** | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | AATCACCAAATCATGAAGGCGCAGAAGTCTGAGAAGAGTTCGCCATTTTCGTTTCATTTT | 1229 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | AATCATCAAATCATGAAGGCGCAGAAGTCTGAGAAGAGTTAACCATTTGCATTTCATTTT | 1245 |
| | **** ***** ***** ***** ** ***** | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | ACCGAGGGCCTCATGACCCATGGTGTGAGTTCTTCTCCTGCATTGTCTCCTCCAGTTTCGC | 1289 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | ACCGAGGGCCTCACGACCCATGGTGTGAGTTCTTCTCCTGTGTGTCTCCTCCAGTTTCGC | 1305 |
| | ***** ***** ***** ***** | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | ATTCATATCACCATCAGGATTTCTGATATCGCTCTTTGGGACGTTGTCCATTACTGTTTG | 1349 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | ATTCGATACACCAACAGGATTTTCTGATATCGCCATTTGGGACGTTGTCCATTACTGTTTG | 1365 |
| | *** ***** ***** ***** ***** | |
| TS_HAPLOTYPE_00907 | TAGTTGACTGTAGAAATCCTCCTTCTTCTCATGTTCTGAGGCGTTTGTAGGCGGTAGCA | 1409 |
| TR_HAPLOTYPE_05438 | TAGTTGCTGTAGAACGCTCCTTCTTCTCATGTTCTGAGGCGTTTGTAGGCGCATAGCA | 1425 |
| | ***** ***** ***** ***** ***** | |

```

TS_HAPLOTYPE_00907      CTGAATGATTGTAACCTTTTTCCTTTTGAGTTGAACCTGGCTGTCATTATCCTGGAGGA 1469
TR_HAPLOTYPE_05438      CTGGATGATTGTGAACTCTCTTCCTTTTGAGTTGAACCTGGCTGCCATTATCCTGGAGGA 1485
                        *** ***** * ** * ***** ***** ***** ***** *****
TS_HAPLOTYPE_00907      GATTGGTTCCCACTGCATGAGAGCTTTAGCCGCTGTGGTGACATCATGATGGCTACTCC 1529
TR_HAPLOTYPE_05438      GATTGGTTCTCACTGCATGAGAGCTTTGGCTGCTGTCGATGACATCATGATGACCACTCC 1545
                        ***** ***** ***** ** ***** * ***** ***** * *****
TS_HAPLOTYPE_00907      CTCGGTGTGCTCGTGATTGTCCTCTGGGTGACCGGAGTAGATTATGTCTCTCCAGTTGA 1589
TR_HAPLOTYPE_05438      CTCGATGTGCTCATGGTTGTCCTCTGAGTGGCCGGAATAGATTATGGTCTTCCAGTTGG 1605
                        **** ***** ** ***** *** ***** ***** **** *****
TS_HAPLOTYPE_00907      TAGTTGGCTCCTTCCACATCCGTTCCATCTGCTCTCGCAGATTCCAACACTTCTATTCT 1649
TR_HAPLOTYPE_05438      TAGTTGGCACCTACCACATCCGTTCTATCTGCTCTCGCAGATTCCAGCACTTCTATTTT 1665
                        ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** *
TS_HAPLOTYPE_00907      ATATCTCCTCATTTCTGCGCTACCTGAGC----- 1679
TR_HAPLOTYPE_05438      ATATCTCCTCATTTCTGCGCTACCTGGCAGCCTTCCAGTTTCGTACATTGCACGAAC 1725
                        ***** ***** **
TS_HAPLOTYPE_00907      ----- 1679
TR_HAPLOTYPE_05438      ATTCATATCCCCATGCTTATTTTGGCTTTCATCGAAAGAAGGCACATCGGCTGACTG. 1783

```

*Příloha 2: Parametry vody odebrané na lokalitách (1-6). *Secchiho deska dopadla na dno*

| Sběr | Průhlednost [m] | pH | Teplota [°C] | G [mS/cm] | Chlorofyl [µg/L] |
|------|-----------------|------|--------------|-----------|------------------|
| 1 | 5,5 | 7,6 | 24 | 0,96 | 2 |
| 1.2 | 10 | 7,7 | 23,8 | 0,98 | 2 |
| 1.3 | N/A | 7,8 | 21,5 | 1,04 | 2 |
| 2.1 | 2,1* | 7,7 | 23 | 0,38 | 3 |
| 2.2 | 2,1* | 7,5 | 26,5 | 0,38 | 4 |
| 3 | 0,45 | 7,74 | 25,8 | 0,65 | 18 |
| 4 | 4* | 7,8 | 25,5 | 0,4 | 5 |
| 5 | 0,4 | 8,1 | 26,3 | 0,24 | 18 |
| 6 | 0,2 | 7,9 | 33 | 0,42 | 71 |
| N | 1* | 8 | 27 | 0,93 | 3 |