

Perspektivy
MOLEKULÁRNÍCH METOD
pro detekci původců
CERKÁRIOVÉ DERMATITIDY
v praxi



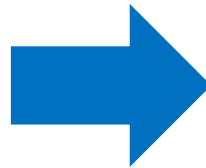
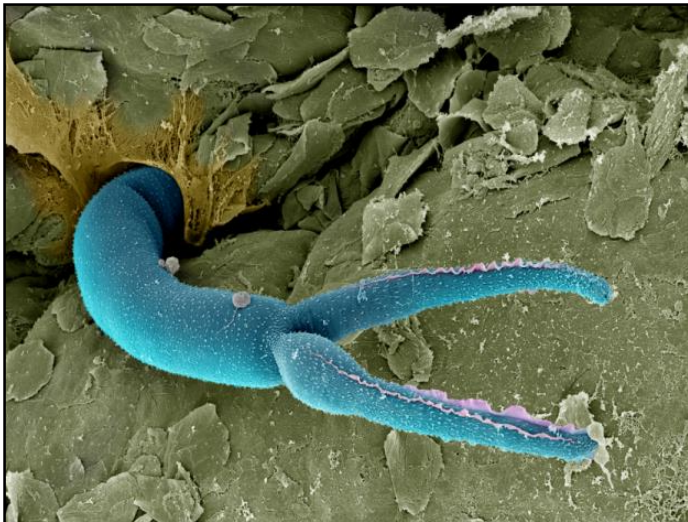
JAN PROCHÁZKA, JANA BULANTOVÁ
PETR PUMANN



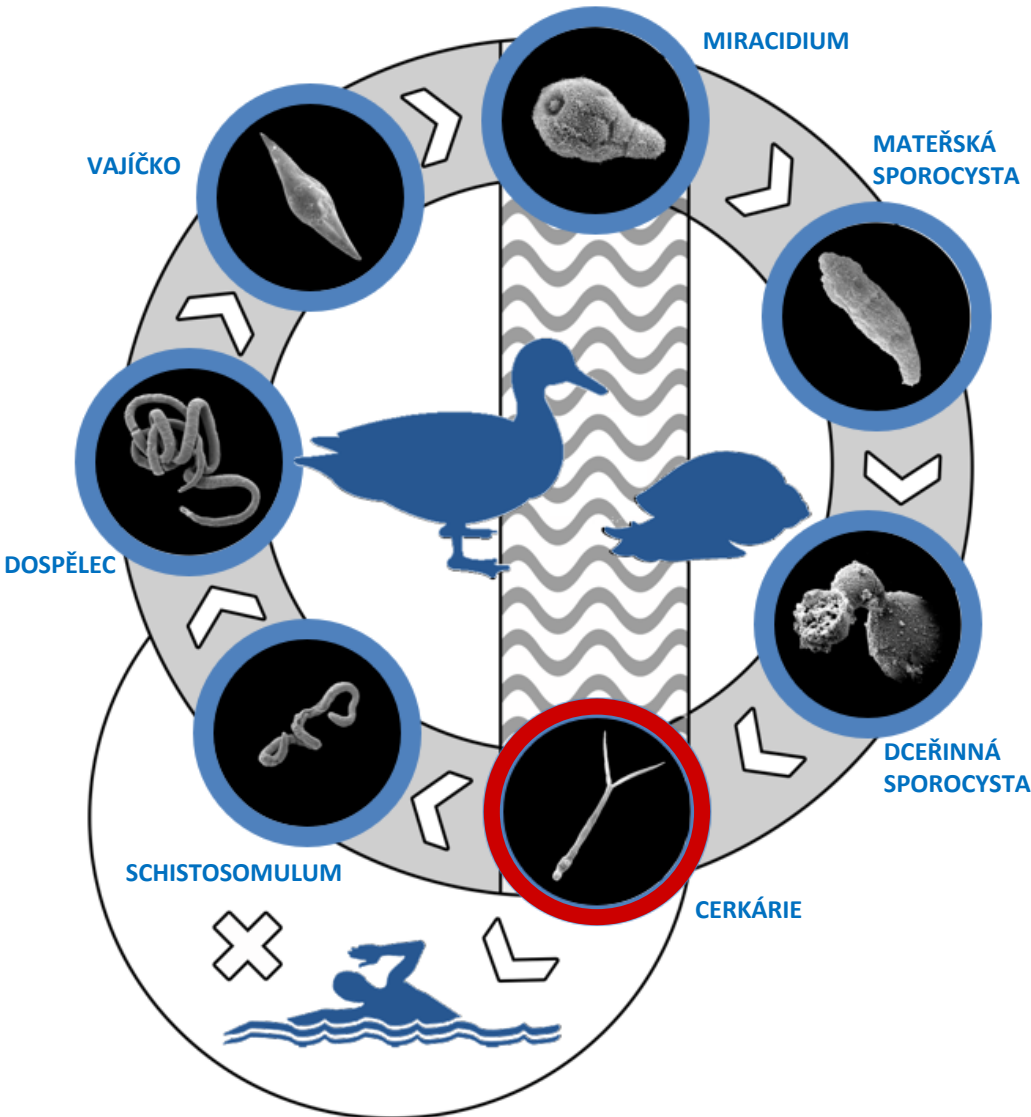
Cerkáriová dermatitida



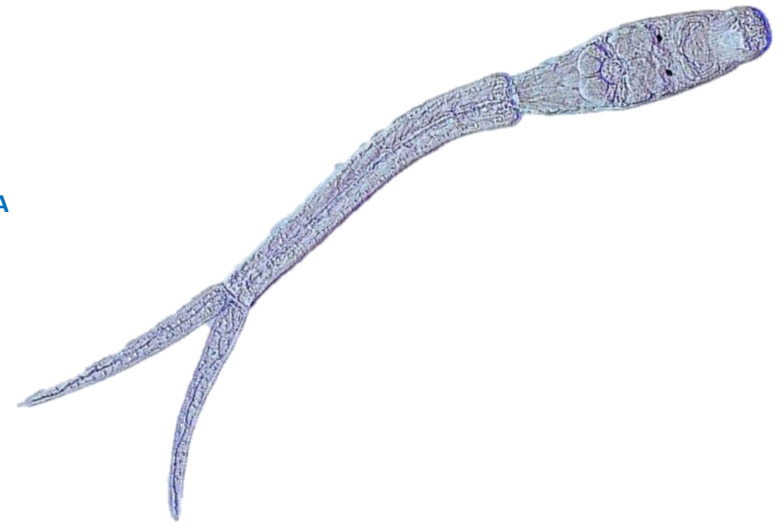
**Hypersenzitivní imunitní reakce
hostitele na průnik cercárií a
jejich likvidaci v kůži.**



Cerkáriová dermatitida

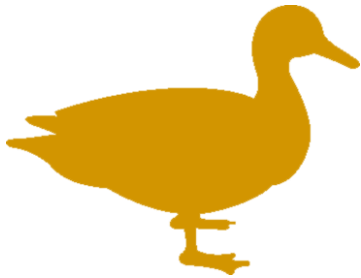


- Dvojhostitelský cyklus
 - Vodní ptactvo
 - Vodní plži
- Náhodný hostitel člověk!
⇒ Cerkáriová dermatitida



Monitoring ptačích schistosom

OBRATLOVEC (DH)



- Kadaver (pitva)†
- Krev (ELISA, cfDNA)
- Biopsie (histologie)
- Trus (koprologie)
- Laváž (líhnutí miracidii)

PLŽ (MH)



- Kadaver (pitva)†
- Kadaver (DNA)†
- **Nasvícení
(vyučování cercárií)**
- Hemolymfa
 - cfDNA
 - Imunodiagnostika

VODNÍ PROSTŘEDÍ



- Cercáριοvé pasti
(využití atraktantů)
- Filtrace
(cercáriometrie)
- **Filtrace
(zachycení eDNA)**

Sběr a vyšetřování plžů

- ČSN 75 7737

ČESKÁ TECHNICKÁ NORMA

ICS 13.060.60

2. návrh

Listopad 2020

Kvalita vod – Stanovení původců cerkáriové
dermatitidy ve vodním prostředí

ČSN 75 7737



Sběr a vyšetřování plžů

- ČSN 75 7737
- **Princip:**
vylučování cercárií pod světlem

- **VÝHODY:**
 - + nízká cena
 - + nenáročnost na vybavení
 - + okamžitý výsledek

- **NEVÝHODY:**
 - časová náročnost
 - nároky na zkušenosti
 - obtížná determinace



Sběr a vyšetřování plžů

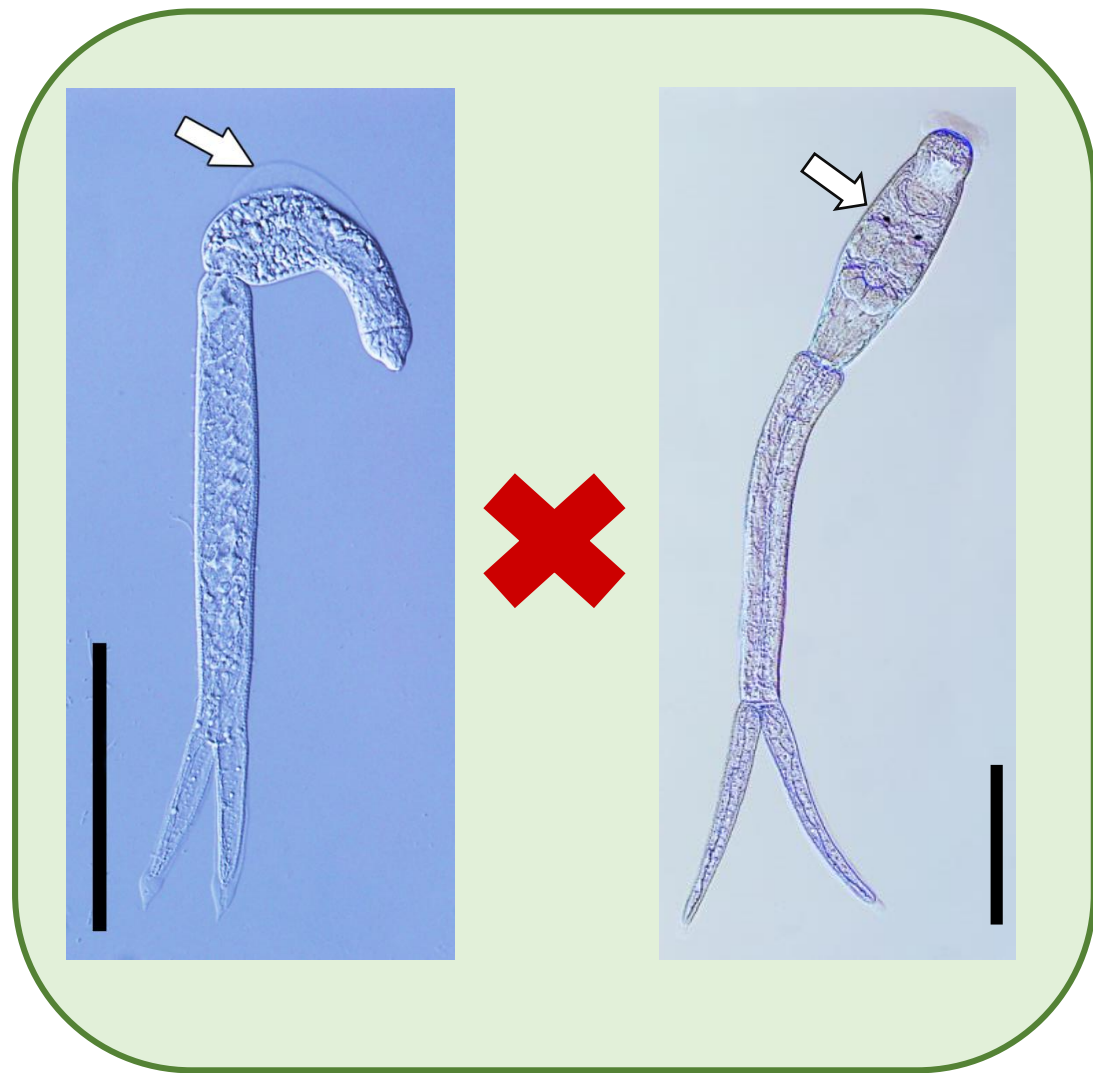
- ČSN 75 7737
- **Princip:**
vylučování cercárií pod světlem

- **VÝHODY:**

- + nízká cena
- + nenáročnost
na vybavení
- + okamžitý výsledek

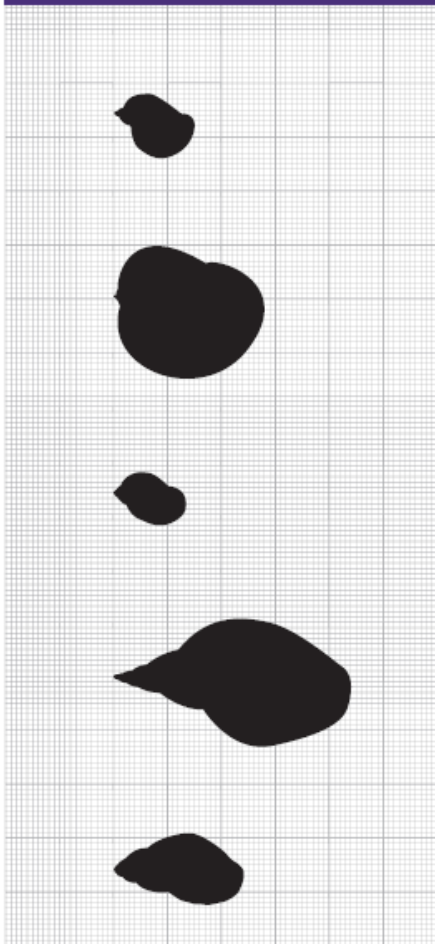
- **NEVÝHODY:**

- časová náročnost
- nároky na zkušenosti
- obtížná determinace



Sběr a vyšetřování plžů

Lymnaeidae



Radix auricularia

Ø Š: 12-18 mm
Ø V: 14-31 mm
– strana 2

Radix ampla

Ø Š: 20-40 mm
Ø V: 18-38 mm
– strana 3

Radix spp.

Ø Š: 7-20 mm
Ø V: 11-30 mm
– strana 4

Lymnaea stagnalis

Ø Š: 15-35 mm
Ø V: 30-60 mm
– strana 5

Stagnicola spp.

Ø Š: 6-10 mm
Ø V: 18-30 mm
– strana 6

Lymnaeidae

Physidae

Planorbidae

Prosoobranchiata

Radix auricularia

uchatka nadmutá

Znaky

- 1 rozšířená trojúhelníková tykadla
- 2 široký poslední závit
- 3 ulita světlá s tmavými skvrnami

šířka: 12-18 mm; výška: 14-31 mm
(viz měřítko Lymnaeidae)

Možná záměna

Radix ampla:

má výrazněji rozšířené obústí (vzácná)

Ostatní šneci rodu *Radix:*

mají méně rozšířené obústí a poslední závit (velice obtížně rozpoznat u jedinců do 1 cm)

Druhy motolic napadající *R. auricularia*

- ☹ *Trichobilharzia franki*
- ☺ *Apatemon, Diplostomum, Notocotylus, Paryphostomum, Plagiorchis, Sanguinicola, Tylolephix*

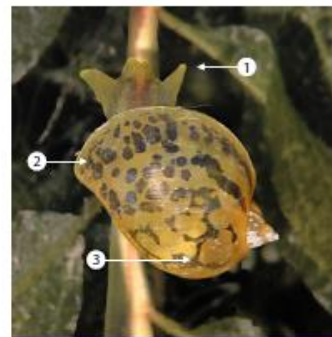
Stanoviště

Stojaté vody, pomalu tekoucí vodní toky, slepá ramena řek

Rychle osidluje nově vzniklá stanoviště (pískovny, doły)

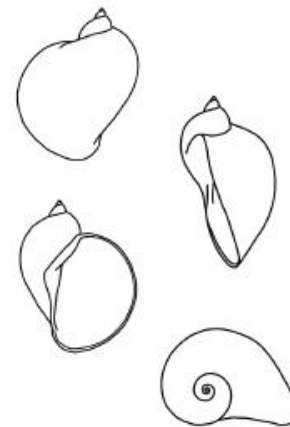
Nepřilíší zarostlé a zazemněné vodní biotopy

- na povrchu spadáných větví ve vodě
- ve zmeti vláknitých řas
- na kamenech a jemnohlitých vodních rostlinách



původní v ČR

chráněný



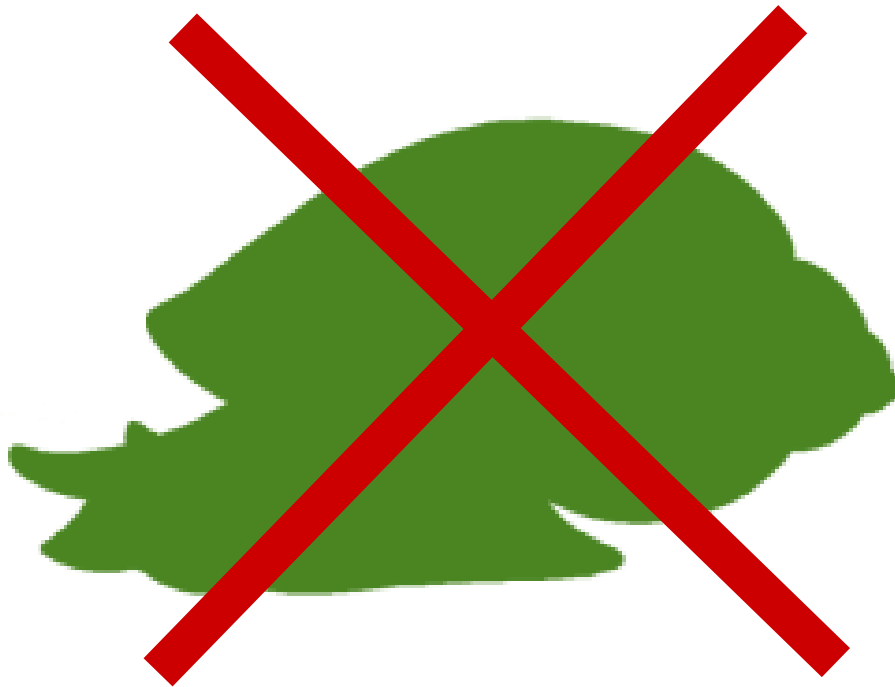
Lymnaeidae

Metody ve vývoji

Všechny následující metody jsou schopny detekovat parazity bez použití mezihostitelských plžů.

Cerkáriové pasti

Cerkáriometrie



Detekce eDNA



Cerkáριοvé pasti



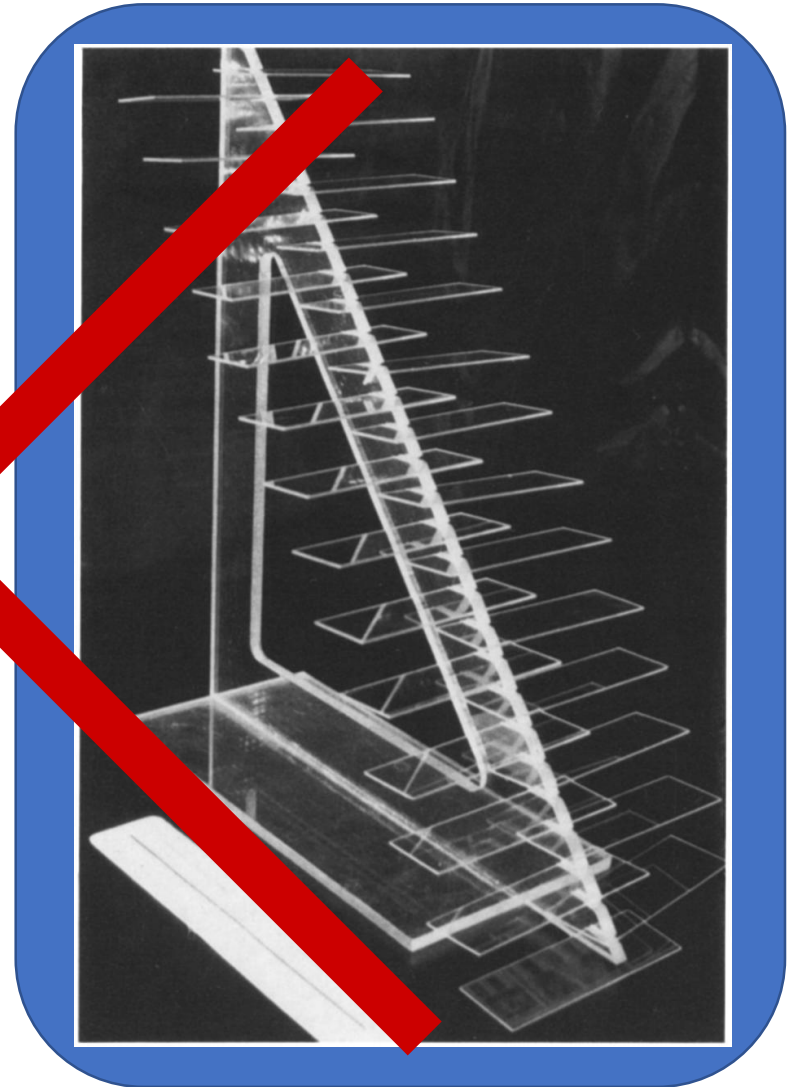
- **Princip:** lákání na vhodné atraktanty
- Statické umístění

• VÝHODY:

- + nízká cena
- + funkčnost i při vyšší turbiditě vody

• NEVÝHODY:

- omezený dosah
- časová náročnost
- nízké procento zachycení



Cerkáriometrie



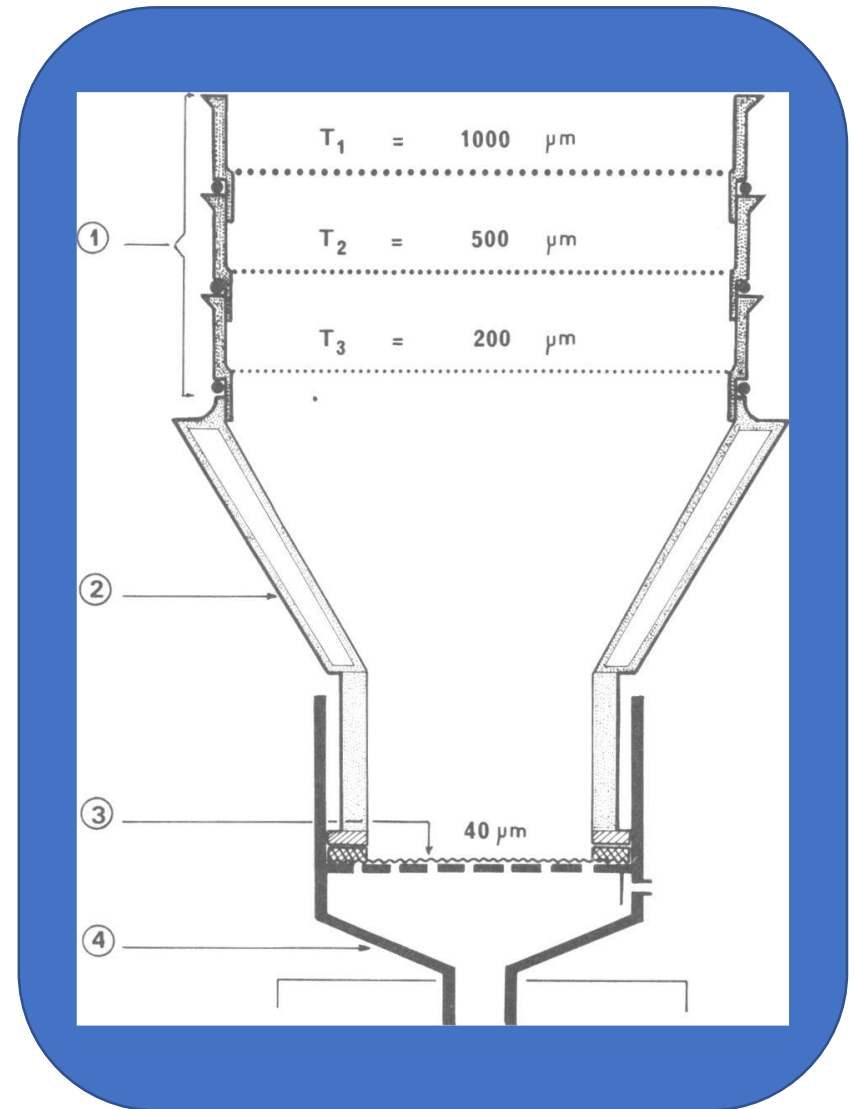
- **Princip:** zachytávání volných živých cercárií z vody
- **Filtrace:** filtrační aparát, planktonka

- **VÝHODY:**

- + nízké náklady
- + rychlost odběru
- + mobilní aparát
- + molekulární metody?

- **NEVÝHODY:**

- ovlivnění dobou a místem sběru
- ucpávání při vysoké turbiditě vody



Odběr a analýza eDNA



- **Princip:** filtrace eDNA parazitů z vody



Odběr a analýza eDNA



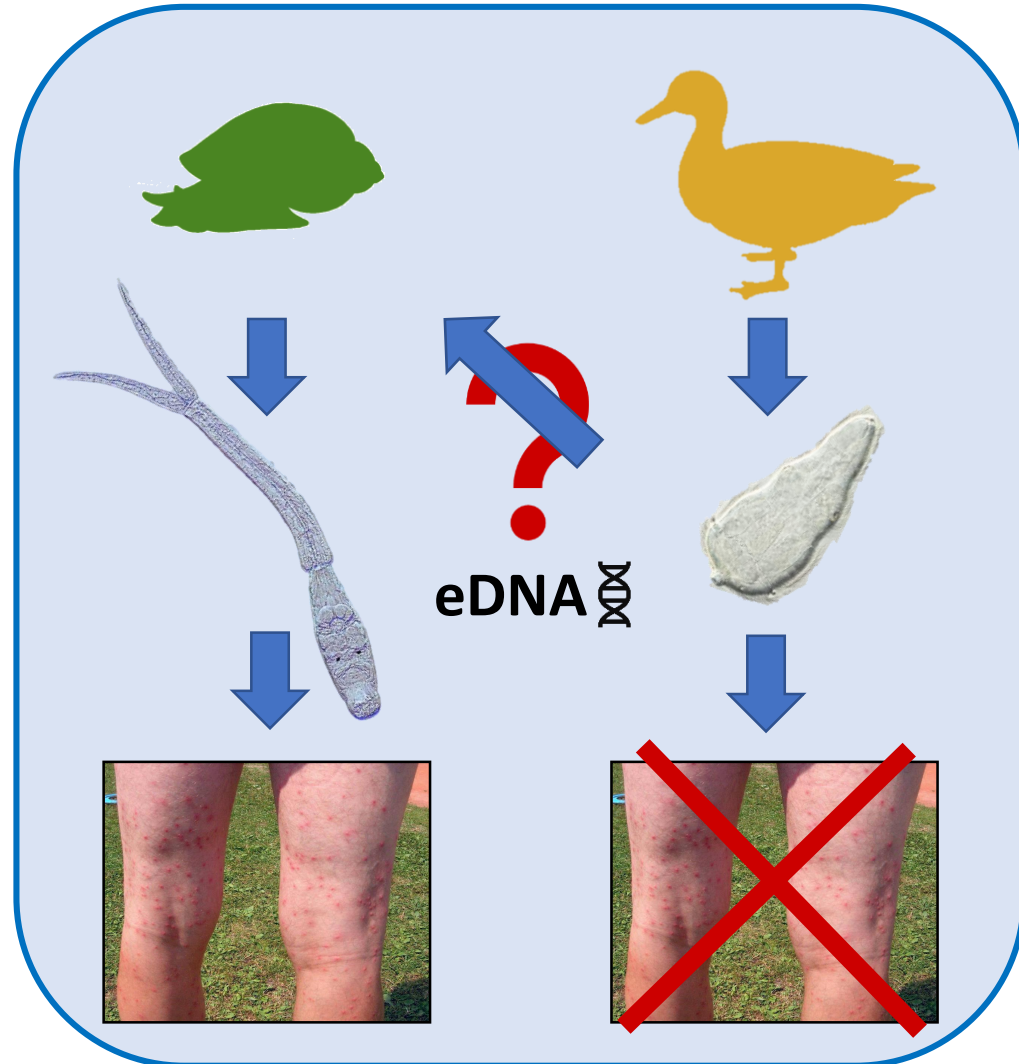
- **Princip:** filtrace eDNA parazitů z vody

- **VÝHODY:**

- + rychlost odběru
- + vysoká senzitivita
- + přesná determinace

- **NEVÝHODY:**

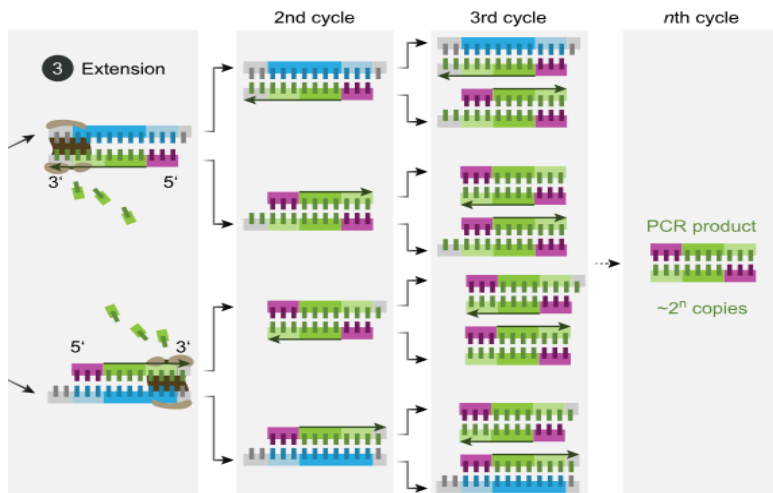
- ucpávání filtru
- speciální přístroje
- obtížná interpretace dat



Molekulární metody

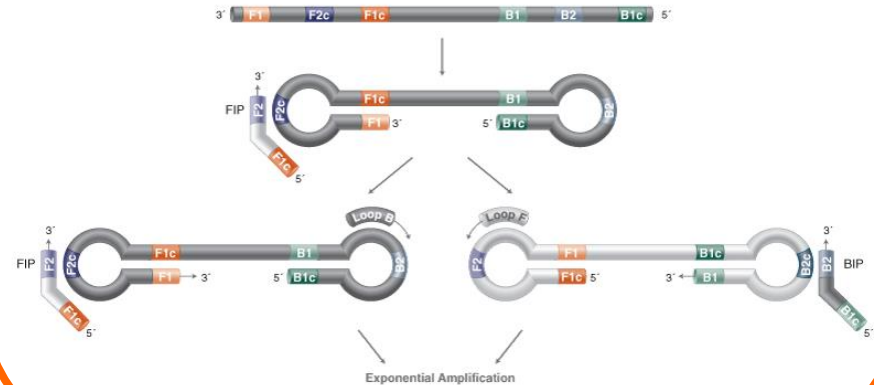
qPCR

- Kvantitativní PCR
- Cyklické změny teplot
=> thermocycler s fluorometrem
- Sada 2 primerů



LAMP

- Loop-mediated isothermal amplification
- **Izotermální podmínky**
=> nenáročné na vybavení
- Speciální sada 6 primerů



Molekulární metody

qPCR

- Drahý komerční kit

Trichobilharzia sp. eDNA qPCR detection kit

€219.00

- 20 samples analysed in 8 fold (200 reactions in total)
- Controls and biochemicals included
- Manual & Validation report



SKU: SYL108

Categories: Flatworms, Pathogenic species, qPCR kits



LAMP

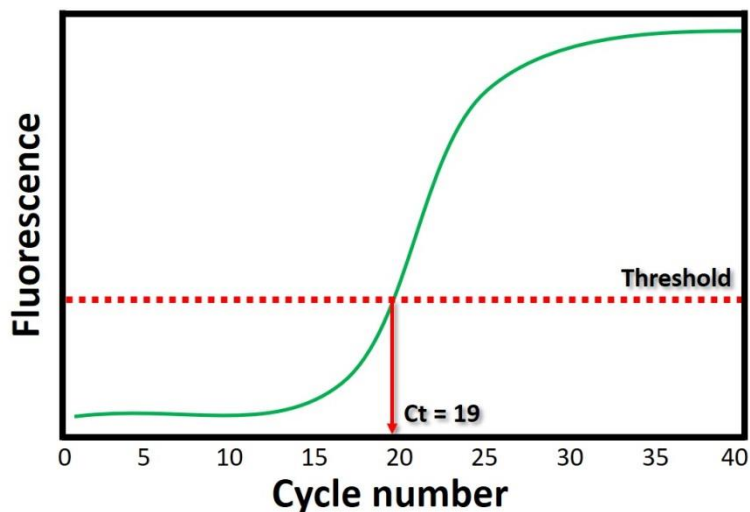
- Primery **ve vývoji**



Molekulární metody

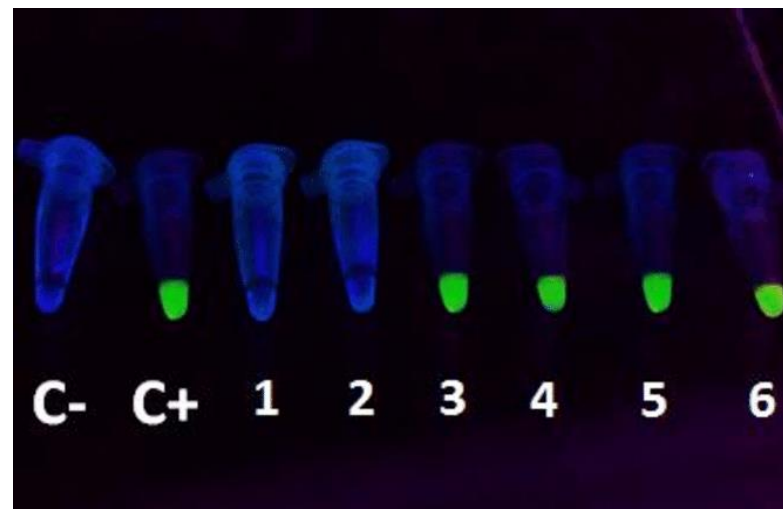
qPCR

- Pozitivní výsledek vizualizován křivkou



LAMP

- Pozitivní výsledek viditelný pouhým okem



Shrnutí



VS.



- Časová náročnost
- Finanční náročnost
- Úroveň vybavení
- Zkušenosti vyšetřující osoby

Výzva ke spolupráci

Citlivost a specifita
VS.
Cena?



Granty

Výzkum ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (grant č. 18-11140S), projektem „Centrum pro výzkum patogenity a virulence parazitů“ (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000759) fondu pro Evropský regionální rozvoj a MŠMT ČR, příspěvkem MŠMT ČR na česko-rakouskou mobilitu v projektu č. 8J21AT011, institucionálními prostředky na vědu a výzkum Univerzity Karlovy PROGRES Q43 (2016-2020), UNCE/SCI/012 - 204072/2018 (2018-2023), SVV 260432/2018 a prostředky MZ ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330).

Seznam zdrojů

SHIFF, C. J., CHANDIWANA, S. K., GRACZYK, T., CHIBATAMOTO, P. A BRADLEY, M. (1993) 'A Trap for the Detection of Schistosome Cercariae', *The Journal of Parasitology*, 79(2), s. 149–154.

HASHIZUME, H., SATO, M., SATO, M. O., IKEDA, S., YOONUAN, T., SANGUANKIAT, S., PONGVONGSA, T., MOJI, K. A MINAMOTO, T. (2017) 'Application of environmental DNA analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in water samples', *Acta Tropica*, 169, s. 1–7.

THÉRON, A. (1979) 'A differential filtration technique for the measurement of schistosome cercarial densities in standing waters', *Bulletin of the World Health Organization*, 57(6), s. 971–975.

Seznam zdrojů

eDNA sampling rod for Sylphium sample kits [online] Nizozemí: Sylphium Webshop, , © 2022 [cit. 8.02.2022]. Dostupné z: <https://sylphium.com/webshop/product/syl003-sampling-rod/>

Trichobilharzia sp. eDNA qPCR detection kit [online] Nizozemí: Sylphium Webshop, © 2022 [cit. 8.02.2022]. Dostupné z: <https://sylphium.com/webshop/product/trichobilharzia-sp-edna-qpcr-detection-kit/>

What Is A Cycle Threshold (Ct) Value In qPCR? [online] Top Tip Bio © 2021 [cit. 8.02.2022]. Dostupné z: <https://toptipbio.com/ct-value-qpcr/>

Loop-Mediated Isothermal Amplification [online] New England: Biolabs © 2022 [cit. 8.02.2022] <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp>

Schematic mechanism of PCR [online] Enzoklop © 2020 [cit. 8.02.2022] https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#/media/File:Polymerase_chain_reaction-en.svg