

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jan Procházka

Detekce a diagnostika motolic čeledi Schistosomatidae u hostitelů a v prostředí
Detection and diagnostics of Schistosomatid trematodes in hosts and environment

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jana Bulantová, PhD.

Praha, 2021

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, 12.8.2021

Jan Procházka

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat své školitelce, RNDr. Janě Bulantové, PhD., za vedení mé práce, cenné připomínky a upřímnost. Dále patří dík i všem mým blízkým přátelům a rodině za psychickou podporu.

Abstrakt

Motolice čeledi Schistosomatidae představují významné zdravotní riziko zejména pro obyvatelstvo tropů a subtropů. Pro účinnou prevenci a kontrolu jejich výskytu je důležité volit vhodné nástroje k jejich detekci a diagnostice. Tylze využít na úrovni mezihostitele, obratlovčího hostitele nebo i vnějšího prostředí. Předkládaná práce je souhrnem a porovnáním známých mikroskopických, molekulárně-biologických a imunologických metod detekce či diagnostiky různých vývojových stadií zejména lidských schistosom působících schistosomózu, ale i kosmopolitně se vyskytujících ptačích zástupců čeledi, kteří jsou známi i z České republiky jako původci cercáriové dermatitidy.

Klíčová slova

Detekce, diagnostika, hostitel, eDNA, *Schistosoma*, *Trichobilharzia*

Abstract

Schistosomatid trematodes are important human pathogens mainly in tropical and subtropical areas worldwide. Thus, the use of reliable detection and diagnostic tools is necessary for effective prevention and control of these parasites. The methods used can be performed at the level of an intermediate host, vertebrate host or even the external environment. This bachelor thesis summarizes and compares known microscopic, molecular, and immunological methods used for detection and diagnostics of various ontogenetic stages of predominantly human schistosomes causing schistosomiasis, but also of avian representatives of the family, widely distributed in temperate zone including Czech Republic and known as causative agents of cercarial dermatitis.

Key words

Detection, diagnostics, host, eDNA, *Schistosoma*, *Trichobilharzia*

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam/český ekvivalent
AWA	Adult worm antigen
CAA	Circulating anodic antigen
CCA	Circulating cathodic antigen
cfDNA	Circulating-free DNA / volná cirkulující DNA
CLSM	Confocal laser scanning microscopy / konfokální laserová skenovací mikroskopie
COPT	Circuoval precipitin test
DH	Definitive host / definitivní hostitel
eDNA	Environmental DNA / enviromentální DNA
EIA	Enzym immuno assay
EPG	Eggs per gram / počet vajíček na gram vzorku
FRET PCR	Fluorescence Resonance Energy Transfer PCR
CHR	Cercarien Hüllen reaction
IFA	Immunofluorescein assay
IFAT	Immunofluorescein antibody test / imunofluorescenční protilátkový test
IHA	Immuno hemagglutination assay / hemoaglutinační
ITS-1 a ITS-2	Intertranscribed spacers
JTU	Jackson turbidity unit / Jacksonovy jednotky kalnosti
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
MEIA	Magneticbead-based enzyme immuno assay
MH	Mezihostitel
MX	Molekulární xenomonitoring
OC PCR	Oligochromatic PCR / oligochromatická PCR
PCR	Polymerase chain rection / polymerázová řetězová reakce
qPCR; RT PCR	Quantitative; Real-Time PCR / kvantitativní PCR
SEA	Soluble egg antigen

Obsah

1	Úvod	1
2	Biologie schistosom	2
3	Metody determinace schistosom	5
3.1	Determinace schistosom na základě morfologických znaků	5
3.2	Molekulárně-biologické metody	6
3.2.1	Amplifikační metody pro molekulární determinaci	6
3.3	Imunologické metody	7
4	Detekce schistosom v meziphostiteli	8
4.1	Metodika a mechanismy detekce schistosom v meziphostiteli	8
4.1.1	Mikroskopické metody detekce schistosom v meziphostiteli	9
4.1.2	Molekulární metody detekce schistosom v meziphostiteli	10
4.1.3	Imunologické metody detekce parazitů v meziphostiteli	12
4.2	Limity a porovnání metod detekce schistosom v meziphostiteli.....	12
5	Detekce parazitů v obratlovčím hostiteli	16
5.1	Metodika a mechanismy detekce parazitů v obratlovčím hostiteli.....	16
5.1.1	Detekce schistosom založená na zobrazovacích metodách	16
5.1.2	Molekulární metody detekce schistosom v definitivním hostiteli	18
5.1.3	Imunologické metody detekce schistosom v obratlovčím hostiteli	20
5.2	Limity a porovnání metod detekce schistosom v definitivním hostiteli.....	22
6	Detekce schistosom ve vnějším prostředí	26
6.1	Metodika a mechanismy detekce schistosom ve vnějším prostředí	26
6.1.1	Mikroskopické metody detekce schistosom ve vnějším prostředí	26
6.1.2	Molekulární metody detekce schistosom ve vnějším prostředí	27
6.2	Limity a porovnání metod detekce schistosom ve vnějším prostředí.....	28
7	Závěr	31
8	Seznam citované literatury	32

1 Úvod

Parazitické motolice čeledi Schistosomatidae (Trematoda – Digenea) představují významné zdravotní riziko pro obyvatele zejména tropických a subtropických oblastí Afriky, Asie a Jižní Ameriky (WHO, 2009). V oblastech mírného podnebného pásma se oproti tomu vyskytují problematické zvířecí druhy schistosom, které v člověku sice nedospívají, ale mohou způsobit tzv. cercáriovou dermatitidu (Horák *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009). Pro účinnou kontrolu onemocnění působených schistosomami je mj. důležitá možnost jejich spolehlivé detekce.

Přístupy využívané při detekci a diagnostice lze rozdělit do tří kategorií; tj. na úroveň detekce v mezihostiteli, v definitivním hostiteli a v prostředí. Nejstarší používané metody bývají založeny na mikroskopické analýze. Tu však provází omezená senzitivita a náročná, často až nemožná druhová determinace parazitů. K řešení těchto problémů od přelomu tisíciletí výrazně přispěly metody molekulárně-biologické. Pro vysoké náklady na vývoj těchto metod i nezbytné přístrojové vybavení se však ve zdravotnické praxi až na výjimky zatím nevyužívají. Už nyní však existují snahy o jejich zařazení mezi běžné vyšetřovací parazitologické metody, což je spojené i se snižováním nákladů na vyšetření (Abath *et al.*, 2006). Dalšími přístupy, využívanými zejména v oblasti diagnostiky schistozomózy u lidských pacientů, pak jsou metody imunologické (Hinz *et al.*, 2017).

Snahou této bakalářské práce je vytvořit přehled detekčních a diagnostických metod se zaměřením na schistosomy, a to jak lidské ve spojitosti s humánní schistosomózou, tak i ptačí zodpovědné za cercáriovou dermatitidu. Důraz je přitom kladen na objasnění mechanismů těchto metod, výčet jejich výhod a nevýhod v souvislosti s využitím v praxi. Zdroji, ze kterých tato práce čerpá, jsou odborné publikace zabývající se detekcí a diagnostikou zejména lidských druhů schistosom. Z nich pak často odvozeny i metody modifikované pro tutéž problematiku řešenou u ptačích druhů. Kromě již běžných laboratorních postupů vycházejících z vyšetřování mezihostitelských plžů nebo obratlovčích hostitelů se práce zabývá i novou možností detekce environmentální DNA (eDNA) parazitů z vodního prostředí, jejíž optimalizace pro ptačí schistosomy působící cercáriovou dermatitidu i porovnání s tradičními vyšetřovacími metodami bude hlavním tématem navazující diplomové práce.

2 Biologie schistosom

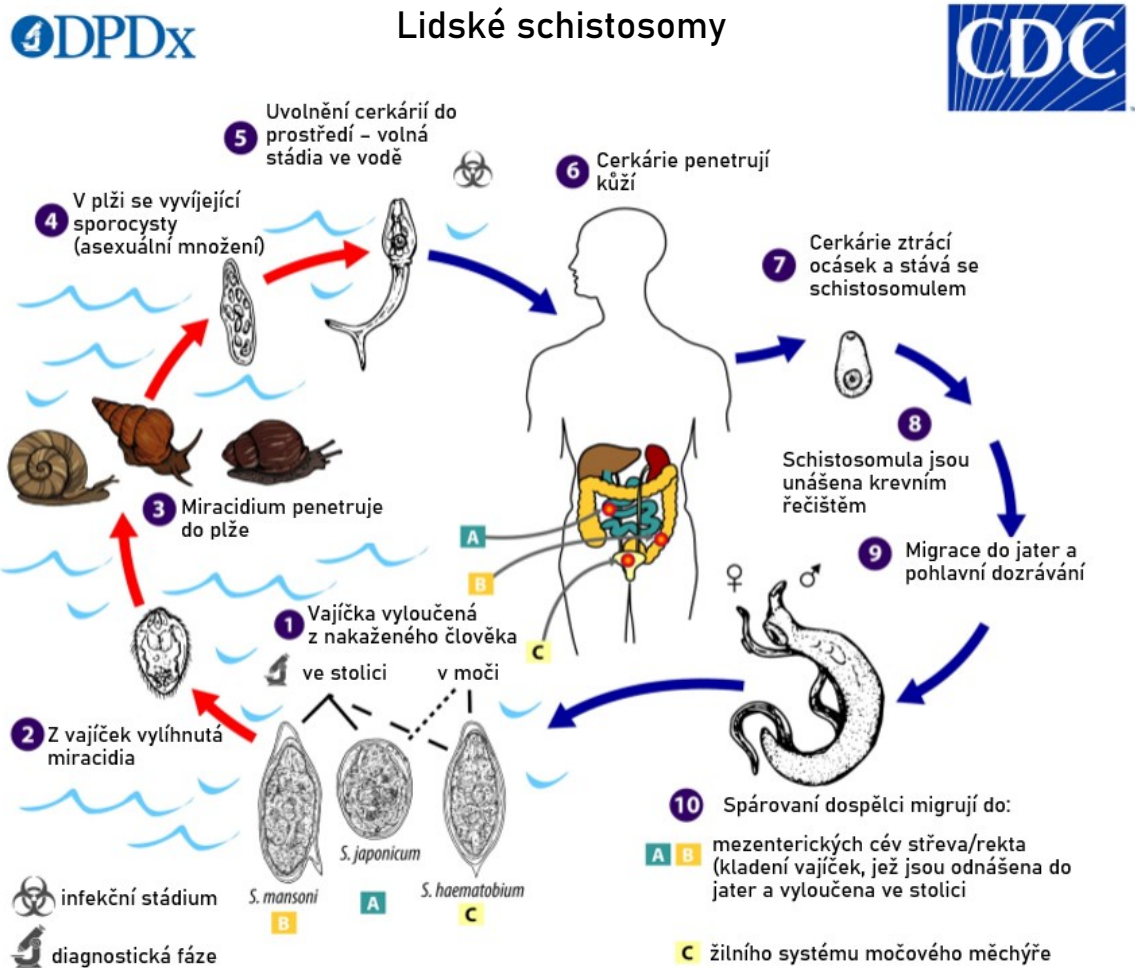
Schistomy (Digenea, Schistosomatidae) patří mezi dvouhostitelské motolice využívající jako definitivního hostitele (DH) savce nebo ptáky. Dle lokalizace v DH je lze dělit na nasální (dospělci žijí v cévách nosní sliznice) a viscerální (dospělci se nachází v tkáních či cévách vnitřních orgánů). Schistomy jsou gonochoristé, s více či méně výrazným pohlavním dimorfismem v závislosti na taxonomické skupině (Snyder & Loker, 2000). Biologie schistosom je v mnoha ohledech podobná u většiny druhů. V souvislosti s tématem bakalářské práce je pro ilustraci životního cyklu a ujasnění pozice člověka v něm použito nejčastěji detekovaných lidských zástupců *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* a *S. haematobium* a ptačích druhů schistosom způsobujících u člověka cercáriovou dermatitidu. V ČR se jedná nejčastěji o druhy *Trichobilhazia franki*, *T. szidati* nebo *T. regenti* (Rudolfová *et al.*, 2007). Znalost životních cyklů, hostitelské specifity a lokalizace konkrétních druhů v daném stádiu je důležitá z hlediska možné diagnostiky, detekce v terénu i plánování laboratorních experimentů.

Dospělci lidských schistosom se v DH nacházejí v cévách různých orgánů v závislosti na druhu u *S. mansoni* okolo tlustého střeva, v případě *S. japonicum* kolem tenkého střeva, u *S. haematobium* okolo močového měchýře, případně i rekta nebo urogenitálního traktu. Oplozené samice kladou vajíčka, která se v ideálním případě dostávají z cév do lumen vnitřních orgánů, odkud odcházejí z těla DH se stolicí (*S. japonicum* a *S. mansoni*) nebo s močí (*S. haematobium*). Z vajíčka se po kontaktu s vodou na základě snížení osmolarity líhne obrvené, neparazitické, larvální stadium - miracidium. Miracidia penetrují do svého mezihostitele (MH), vodního plže. V něm se vyvinou v mateřskou sporocystu. Asexuálním množением dochází ke tvorbě dceřiných sporocyst, produkujících jak cercárie, tak další dceřiné sporocysty. Vyvinuté cercárie (larvální stadium infekční pro obratlovce) opouštějí svého MH a na základě světelných a chemických stimulů začnou ve vodním prostředí vyhledávat svého DH (člověka). Cercárie penetrují jeho kůži, přičemž odhazují ocásek, vyprazdňují penetrační žlázy a mění tegument. Z cercárií se stávají schistosomula, která jsou cévním systémem odnášena do plic, dále do srdce a jater, kde dospívají a párují se. Z jater migrují do své finální lokalizace, kde kopulují a produkují vajíčka (viz Obrázek 1) (McManus *et al.*, 2018; Nelwan, 2019).

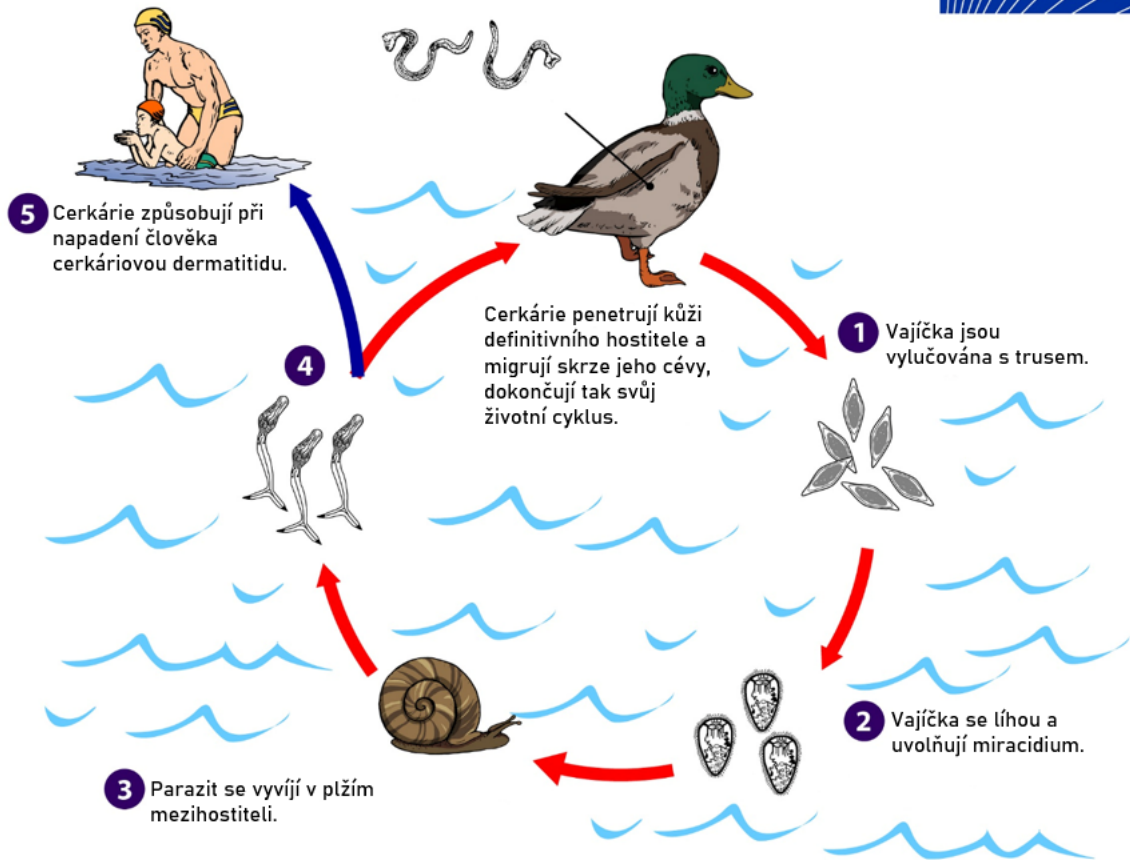
Ptačí schistomy mají životní cyklus velmi podobný, jejich DH jsou však ptáci. Viscerální druhy ptačích schistosom se podobně jako lidské schistomy vyskytují v cévách různých vnitřních orgánů v závislosti na druhu. Dospělci – *T. franki* se například vyskytují v jaterních cévách (Müller & Kimmig, 1994), *T. szidati* v cévách střeva (Neuhaus, 1952). Vajíčka obou druhů opouští DH spolu s trusem a po kontaktu s vodou se z nich líhnou miracidia.

Nasální druh *T. regenti* oproti tomu migruje skrze míchu přes čichové nervy do cév sliznice nosní dutiny, ve které jsou pak lokalizována i vajíčka. Ta se na rozdíl od viscerálních druhů líhnou již v DH, tudíž v izoosmotickém prostředí. Poté, co vylíhlé miracidium penetruje do MH (vodního plže), dochází stejně jako u lidských schistosom k jeho transformaci na mateřskou sporocystu a následnému vývoji

dceřiných sporocyst a cercárií. Vyvinuté cercárie opouští MH a vyhledávají svého ptačího DH. V případě, že penetrují do kůže člověka (nebo jiného savce), mohou způsobit tzv. cercáriovou dermatitidu. (viz Obrázek 2). V savčím hostiteli pak dochází pouze k omezenému vývoji a migraci schistosomul, která nedospívají. Člověk je tak u ptačích schistosom v pozici tzv. náhodného hostitele (Horák *et al.*, 2002).



Obrázek 1: Schéma životního cyklu vybraných druhů lidských schistosom. – 1. Vajíčka opouští DH ve stolici (*S. mansoni*, *S. japonicum*) nebo v moči (*S. haematobium*), 2. Z vajíček se v hypotonickém prostředí vody líhnou miracidia, 3. Miracidium penetruje do plže (druh motolice – druh plže: *S. haematobium* – *Bulinus* spp.; *S. japonicum* – *Oncomelania* spp.; *SM* – *Biomphalaria* spp.), 4. V plži se vyvíjejí matřské a dceřinné sporocysty (asexuální množení), 5. Cercárie opouští plže a plavou volně ve vodě, 6. Cercárie penetrují kůží DH (člověk), 7. Cercárie ztrácí ocásek a stává se schistosomulem, 8. Schistosomula jsou unášena krevním řečištěm DH, 9. Dostávají se do jater, kde pohlavně dozrávají a párují se, 10. Dospělci migrují do: A,B) mezenterických cév střeva/rekta (kladění vajíček, jež jsou odnášena do jater a vyloučena ve stolici), C) žilního systému močového měchýře, kde kladou vajíčka, jež jsou následně vyloučena. Upraveno z angl. originálu dle CDC - Schistosomiasis - Biology, 2019.



Obrázek 2: Schéma životního cyklu ptačích viscerálních schistosom způsobujících cerkáriovou dermatitidu – 1. Vajíčka jsou u viscerálních druhů ptačích schistosom vylučována s trusem, 2. Po kontaktu s vodou se vajíčka líhnou a uvolňují miracidia, 3. Miracidium penetruje MH plže, kde se posléze vyvíjí, 4. Cercárie penetruje svého DH, migruje skrze jeho cévy, dospívají a kopulují, 5. Při napadení člověka způsobují cerkáriovou dermatitidu. Upraveno z angl. originálu dle CDC - DPDx - Cercarial Dermatitis, 2019

3 Metody determinace schistosom

Determinační metody slouží k taxonomickému zařazení zkoumaných organismů. Toho se využívá při detekci zaměřené na hledání konkrétního parazita na různé taxonomické úrovni. Determinace objektů zájmu (v případě této bakalářské práce schistosom) bývá založena na hodnocení morfologických znaků, hostitelské specifity, výsledků molekulárně-biologické analýzy a v omezené míře i na imunologických metodách.

3.1 Determinace schistosom na základě morfologických znaků

Morfologické znaky jsou obvykle hodnoceny mikroskopickými metodami. Taxonomická úroveň, na kterou lze takto motolice zařadit, se však u různých životních stádií liší. Vajíčka schistosom jsou obvykle tenkostěnná, bez hnědavého nádechu skořápky, bez operkula, spozorovatelným vyvíjejícím se miracidium uvnitř (Bilharz, 1856). Tvar a velikost schistosomích vajíček se napříč druhy může lišit, pro přesnou druhovou determinaci však tyto znaky obecně využity být nemohou, a to kvůli mezidruhové podobnosti, i kvůli faktu, že vajíčka svoji velikost během vývoje miracidia mění (Jurberg *et al.*, 2009).

Dokonce i vajíčka tří nejrozšířenějších lidských schistosom (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*) s typickým tvarem a pozicí trnů či výčnělků tak nemusí být při porovnání s ostatními druhy rodu *Schistosoma* vždy spolehlivě rozpoznatelná. (Candido *et al.*, 2018). Ještě komplikovanější je pak situace u ptačích schistosom, z nichž mnohé, např. z rodu *Trichobilharzia*, se vyznačují takřka totožným protáhlým vřetenovitým tvarem s typickým háčkem na jednom z konců. Dalším pomocným ukazatelem se proto často stává lokalizace vajíček v definitivním hostiteli (viz Biologie schistosom, str. 2) odpovídající finální lokalizaci dospělců (Horák *et al.*, 2002).

I když miracidia schistosom vykazují rozdíly v počtu a uspořádání ciliárních destiček, v morfologii penetračních žláz, v ultrastruktuře terebratoria nebo v uspořádání zárodečných buněk do klastrů, běžně se pro identifikaci druhu nevyužívají (Horák *et al.*, 2002). To pravděpodobně souvisí s obtížnými možnostmi získávání miracidíí pro identifikaci i s náročností metod, které příslušné znaky dokážou odhalit (histologie, barvení dusičnanem stříbrným, elektronová mikroskopie). Stejně tak při determinaci na základě morfologie nelze využít ani sporocyst, jelikož specifické struktury odlišující jednotlivé druhy nebo i vyšší taxonomické skupiny u nich prakticky chybí (Horák *et al.*, 2002)

Cerkárie schistosom jsou od cercárií ostatních motolic snadno rozeznatelné na základě morfotypu, chování cercárií ve vodním sloupci či hostitelské specifity (Haas, 1994; Horák *et al.*, 2002). Druhová a v některých případech i rodová determinace je však obtížná až nemožná. V omezené míře mohou být určujícími znaky charakteristika exkreceční soustavy nebo počet a rozmístění sensorických papil (Islam, 1986; Horák *et al.*, 2002; Podhorský *et al.*, 2009), což jsou však metody kladoucí vysoké nároky na pozorování.

Dospělce schistosom lze často určit až na úroveň druhu na základě velikosti a charakteristického tvaru jejich těl, specifických tegumentálních útvarů (tuberkulů) nebo dle počtu, pozice a velikosti vnitřních orgánů, zejména pak pohlavní soustavy, přítomnosti či absence přísavek, velikosti canalis

gynecophorus u samců atd. (Farley, 1971; Horák *et al.*, 2002). U ptačích schistosom, které kvůli extrémně tenkému a křehkému tělu není vždy možné při pitvě získat v celku (Ashrafi & Brant, 2020) však na parametry jako počty varlat nebo celková délka nelze spoléhat.

3.2 Molekulárně-biologické metody

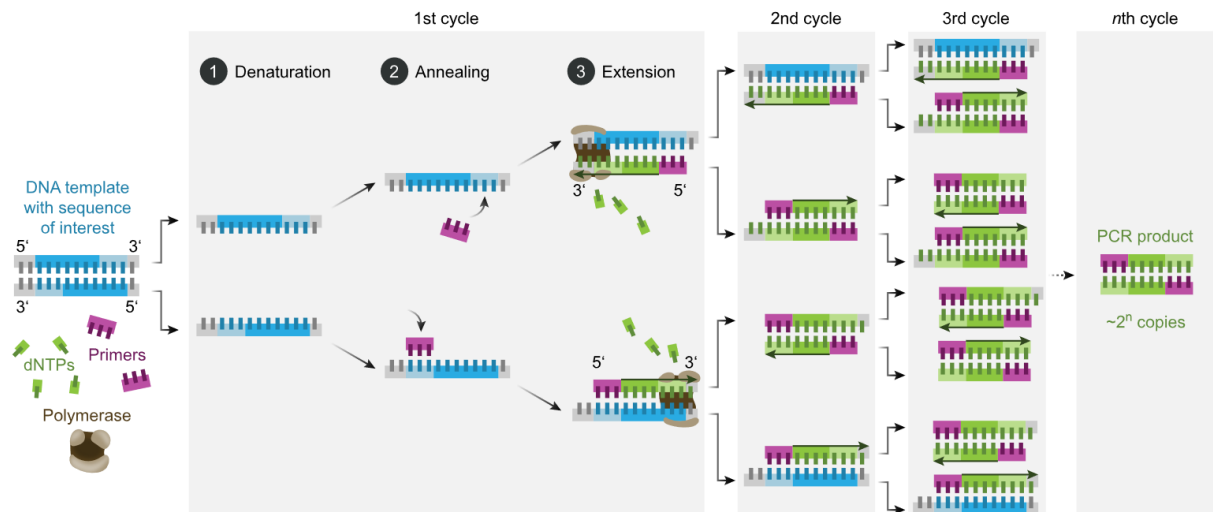
Molekulárně-biologické metody přiřadí parazita do druhu (nezávisle na jeho stádiu) na základě sekvence jeho DNA. Aby bylo možné DNA analyzovat, je potřeba ji nejprve namnožit pomocí amplifikačních postupů (PCR, LAMP). K tomu jsou využívány specifické primery cílící na konkrétní úseky DNA, jež slouží jako molekulární markery; tj. jejich sekvence jsou dostatečně unikátní pro danou taxonomickou úroveň. Při determinaci a detekci schistosom je nejčastěji využívána mitochondriální DNA (gen pro cytochrom c oxidázu I – *CoxI*) a ribozomální DNA v podobě tzv. „Internal Transcribed Spacers“ (ITS-1 a ITS-2), malé 18S podjednotky, velké 28S podjednotky. (Hanelt *et al.*, 1997; Dvořák *et al.*, 2002; De *et al.*, 2019). Využit lze i primery cílené na tandemové repetice, např. *DraI* (Hamburger *et al.*, 2001). Podmínkou pro úspěšné taxonomické zařazení studovaného organismu je možnost amplifikovaný a osekvenovaný úsek porovnat s již existujícími záznamy v databázích, např. GenBank, BOLD, atp. (Cipriani *et al.*, 2011).

3.2.1 Amplifikační metody pro molekulární determinaci

Zdrojem DNA pro molekulární determinaci schistosom může být jakékoli stadium z MH nebo DH získané intravitálně či postmortálně, případně i environmentální DNA (eDNA) získaná z prostředí. Materiál je dále zpracováván pomocí amplifikačních metod. Díky použití specifických primerů lze pro analýzu využít i parazitologický materiál z předchozích mikroskopických analýz s příměsí jiných biologických kontaminantů (hostitelská tkáň, zbytky potravy, plankton).

PCR

Polymerázová řetězová reakce („Polymerase Chain Reaction“; PCR) je molekulární metoda, jež slouží k řízené amplifikaci vybraného úseku DNA (viz Obrázek 3). Jejím principem je cyklické zahřívání DNA v přístroji zvaném termocykler, díky kterému dochází k denaturaci dvojvlákna DNA. To je tak zpřístupněno sekvenčně specifickým primerům, které umožní nasednutí termostabilní DNA polymerázy. K reakci jsou zapotřebí dva sekvenčně odlišné primery vybrané tak, aby ohraničovaly úsek, která má být zmnožen (např. ITS-1, IT-2). Opakovaným zahříváním, denaturací, nasedáním primerů a syntézou je docíleno toho, že se množství DNA při každém cyklu zdvojnásobí. Tento cyklus se 20-30krát opakuje. Produkty amplifikace jsou následně separovány pomocí gelové elektroforézy (Mullis *et al.*, 1986; Alberts, 2008).



Obrázek 3 – Schéma PCR – Prvním krokem cyklu je tzv. denaturace – oddělení dvou vláken DNA od sebe. Následně na jednovláknovou DNA nasedají primery, jež umožňují zahájení dosyntetizování komplementárního vlákna dle jednovláknové předlohy. Každým cyklem vzniká 2^n kopií, n se rovná počtu cyklů. (Enzoklop (2020), English: Schematic mechanism of PCR. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction-en.svg, citování dne 4.8.2021).

LAMP

Alternativní metodou k PCR je metoda LAMP („Loop-mediated Isothermal Amplification“). Tato metoda je taktéž založena na amplifikaci určitého úseku DNA. K samotné namnožení DNA je však přístupováno rozdílně. Tento proces na rozdíl od PCR probíhá v izotermických podmínkách, není tudíž zapotřebí disponovat speciálními přístroji. Hlavními komponentami jsou vzorek DNA, DNA polymeráza a 4-6 primerů rozpoznávajících 6-8 různých oblastí. Primery jsou navrženy tak, aby v průběhu amplifikace docházelo k tvorbě různě větvených dvojláken DNA se smyčkami (Notomi *et al.*, 2000; Notomi *et al.*, 2015).

3.3 Imunologické metody

Pro determinaci imunologickými metodami se využívají antigeny specifické v některých případech až na úroveň druhu pocházející z různých stadií. Využívají se obvykle jako součást detekce konkrétního parazita či skupiny parazitů během imunodiagnostických vyšetření, nikoli jako samostatné metody determinace (Hinz *et al.*, 2017).

4 Detekce schistosom v meziphostiteli

Motolice z čeledi Schisomatidae využívají během svého životního cyklu meziphostitele (MH) v podobě vodních plžů (viz Biologie schistosom, str. 2). Sběr plžů a jejich kontrola na vylučování infekčních stadií (cerkárií) po nasvícení stále patří v současné době k nejhojněji využívaným metodám detekce lidských i ptačích schistosom na lokalitách, kde se jejich výskyt sleduje. Intravitální detekci parazitů, při níž nedochází k usmrcení MH, lze provést také odběrem a analýzou vzorků tělních tekutin plžů. Pro zjištění přítomnosti larválních stadií schistosom ještě před jejich vylučováním mimo tělo MH je možné využít také postmortální detekci, při níž jsou MH usmrceni a pitváni na přítomnost parazitů v jejich tkáních (Caron *et al.*, 2008) nebo homogenizování pro analýzu molekulárními metodami (Schols *et al.*, 2019)

4.1 Metodika a mechanismy detekce schistosom v meziphostiteli

Pro účely detekce schistosom v MH je potřeba nejprve provést jejich sběr. Ten probíhá obvykle v příbřežních pásmech, kde se plži přirozeně vyskytují na kamenech, dně, vodních rostlinách, či se pohybují zespoda na vodní hladině. Odtud jsou sbíráni buď ručně, nebo pomocí cedníků (Aldhoun *et al.*, 2009; Soldánová *et al.*, 2010; Selbach *et al.*, 2020). Použití těchto nástrojů při sběru je efektivnější v hustém rostlinném porostu a zároveň je bezpečnější díky eliminaci kontaktu rukou sběrače s vodou potenciálně obsahující cercárie schistosom (Mandahl-Barth, 1962).

Způsob transportu plžů do laboratoře k dalšímu zpracování závisí na zvolené metodě detekce parazitů. Pokud je zvolena intravitální detekce, je třeba snížit úmrtnost plžů při transportu na minimum. V odborných člancích je metodika transportu živých jedinců obvykle popisována jen sporadicky nebo vůbec, zvyklosti se často liší i mezi různými laboratořemi.

Pro přepravu se obvykle využívají plastové vzorkovnice s víkem či polyethylenové sáčky (Wolmarans *et al.*, 2002; Kaewkes *et al.*, 2012). Claugher (1960) doporučuje plže ihned po sběru vložit do malých polyethylenových sáčků, do kterých je přidáno trochu mokré trávy, mechu, filtračního papíru či bavlněné vaty. Přidáním těchto měkkých materiálů dochází k eliminaci vzájemných nárazů ulit a zároveň se takto lépe udržuje vlhké prostředí; ve vodě by oproti tomu mohlo docházet k nežádoucím nárazům plžů, případně k jejich udušení. Uzavřené a datem, místem sběru a typem stanoviště označené pytlíky jsou následně vkládány do tepelně izolovaného přepravního boxu vychlazeného na cca 16 °C. Oproti tomu Mandahl-Barth (1962) pro transport plžů nepoužívá sáčky, ale blíže nespecifikované nádoby, zmiňuje však, že by do jedné neměly být dávány malé, křehké a velké, těžké druhy zároveň. Kombinací obou postupů (využití širokohrdlých nádob vyplněných měkkým materiálem bez vody k převozu plžů roztríděných dle velikosti) využívá i Helmintologická laboratoř na katedře parazitologie PřF UK (Bulantová, osobní sdělení).

Plži určené k postmortální detekci pomocí molekulárních metod mohou být fixováni na místě v roztoku ethanolu. Toto se však v praxi využívá zřídka, většinou jen při přepravě na delší vzdálenosti, kdy se předpokládá vysoká úmrtnost plžů (Fuss *et al.*, 2020).

4.1.1 Mikroskopické metody detekce schistosom v meziphostiteli

V meziphostiteli se nachází stadia od dceřiných sporocyst přes mateřské sporocysty až po cercárie. Mikroskopickými metodami lze přítomnost schistosom v MH odhalit v patetní fázi infekce stimulací vylučování cercárií. Rané nebo prepatentní fáze infekce MH pak lze mikroskopicky potvrdit během parazitologické pitvy plže.

Stimulace plžů k vylučování cercárií:

Sledování vylučování cercárií z plžů je jedna z nejdéle používaných intravitálních metod umožňující zjistit patentní fázi infekce plže motolicemi (Cort, 1922). Zcela univerzální metodika však neexistuje a postupy se v konkrétních vědeckých pracích liší např. v délce expozice plžů světlu.

Před vyšetřením jsou plži opláchnuti pod tekoucí vodou kvůli zamezení vzájemné kontaminace cercáriemi vyloučenými během transportu a vkládání jednotlivě do malých průhledných nádob či kultivačních destiček s odstátou vodou. (Kaewkes *et al.*, 2012; Bakuza *et al.*, 2017; Doanh *et al.*, 2018). V den sběru, nejpozději však další den, jsou plži při teplotě 20-25 °C vystaveni po dobu několika hodin zdroji světla o vysoké intenzitě (Sharif *et al.*, 2010; Cipriani *et al.*, 2011; Selbach *et al.*, 2020).

Kombinace teploty a intenzity světla se využívá k navození podmínek, v nichž mají cercárie největší pravděpodobnost nalezení dalšího hostitele a svého MH přirozeně opouští. Z důvodu přirozeného vylučování některých cercárií v noci či v brzkých ranních hodinách je proto vhodné vyšetření zopakovat po proběhlé temné periodě (Born-Torrijos *et al.*, 2014) U většiny schistosom dochází k vylučování většinou přes den (Théron, 2015), nebo během ranních hodin (Soldánová *et al.*, 2016).

Makroskopicky lze cercárie schistosom od ostatních skupin motolic odlišit na základě specifického, pozitivně fototaktického chování (Horák *et al.*, 2002). Pod mikroskopem je dále v nativním stavu odhalen základní morfotyp; v případě schistosom jde o ocelátní nebo anocelátní furkocercárie s viditelnými penetračními žlázami a acetabulem (Frandsen & Christensen, 1984).

Pozorováním konkrétních morfologických znaků v kombinaci s hostitelskou specifitou k MH lze u některých skupin motolic dosáhnout určení cercárií až na úroveň rodu (Faltýnková *et al.*, 2007). V případě schistosom jsou si však cercárie natolik podobné, že pro jejich přesnou determinaci je nezbytné použít speciální barvicí, nebo molekulární metody (viz Metody determinace schistosom, str. 5). Po vyloučení jsou proto cercárie koncentrovány a fixovány, např. v ethanolu či formaldehydu podle dalšího zpracování (Sharif *et al.*, 2010).

Pitvy plžů:

Detekce parazitů pomocí parazitologické pitvy meziphostitele vyžaduje znalost biologie a morfologie parazita, ale i anatomie meziphostitelského plže. Na základě toho jsou v těle MH vyhledávány tkáně, ve kterých dochází k vývoji různých stadií parazita.

Velmi malé druhy plžů s tenkou ulitou mohou být vyšetřovány metodou roztlaku celého plže mezi dvěma skleněnými destičkami nebo podložními skly. U větších druhů je nezbytné nejprve rozdrtit

nebo rozlomit poslední závit ulity pomocí pinzety s následným vytažením měkkého těla plže ze zbytku schránky (Sharif *et al.*, 2010). Ve stereomikroskopu je pak na Petriho misce s malým množstvím vody pozorován zejména hepatopankreas, přičemž již jeho změněná barva a struktura mohou poukazovat na přítomnost larev různých druhů motolic, zejména v podobě dceřiných sporocyst (Choubisa *et al.*, 2012). Jejich přítomnost je poté potvrzována na roztlakových preparátech pod mikroskopem.

4.1.2 Molekulární metody detekce schistosom v meziphostiteli

Molekulární metody detekce jsou založeny na rozpoznání parazitární DNA mezi DNA tkáně hostitele, což je známé jako molekulární xenomonitoring (MX). Ten je úspěšně využíván i v případě detekce schistosom uvnitř meziphostitelských plžů, a to již od raných fází infekce (Schols *et al.*, 2019)

Materiál pro MX lze získat intravitálně odběrem hemolymfy vyšetřovaných plžů, kteří jsou předem opláchnuti, osušeni a následně podrážděni na noze, čímž je stimulováno vylučování hemolymfy hemálním pórem (Šteiger, 2018). Hemolymfa odebraná pipetou obsahuje u pozitivních jedinců tzv. volnou cirkulující DNA („Circulating free DNA“; „Cell-free DNA“; cfDNA) detekovatelnou molekulárními metodami. Postmortálně lze materiál získat prostou homogenizací těla plže skalpelem, nůžkami, homogenizátorem zbaveného ulity (Schols *et al.*, 2019), nebo včetně ní (Thanchomnang *et al.*, 2011).

Materiál odebraný pro XM, který není určený k okamžitému zpracování, lze fixovat v ethanolu (Schols *et al.*, 2019). V dalším kroku je extrahována DNA, a to nejčastěji pomocí komerčně dostupných kitů, které jsou speciálně navrženy na extrakci nukleové kyseliny z konkrétního typu tkáně (v případě plžů bohaté na mukopolysacharidy, které mohou extrakci významně ovlivnit). Využívá se rovněž fenol-chloroformové extrakce (Jannotti-Passos *et al.*, 2006; Caron *et al.*, 2008; Abbasi *et al.*, 2010). Tímto krokem je tak DNA připravena pro další zpracování jednou z molekulárních detekčních metod.

PCR

Nejčastěji používané molekulární metody detekce parazitů jsou založeny na polymerázové řetězové reakci („Polymerase Chain Reaction“; PCR) popsané blíže u molekulárních metod determinace (viz PCR, str.6). Využití této metody pro detekci je však odlišné oproti přístupu pro druhovou determinaci. Potvrzení přítomnosti hledané motolice probíhá na základě volby druhově či jinak taxonomicky specifických primerů. Amplikon je vizualizován a detekován pomocí gelové elektroforézy a samotná jeho přítomnost značí pozitivní výsledek detekce (Melo *et al.*, 2006). Autor využívá tuto základní metodu k detekci *S. mansoni*, s použitím druhově specifických primerů pro gen18s rRNA.

Kromě tohoto základního postupu mohou pro specifickou detekci sloužit i další modifikace PCR (Multiplex PCR, Nested PCR atd.; viz níže), které jsou vhodné i pro detekci malých množství parazitární DNA mezi DNA hostitelskou (Melo *et al.*, 2006).

Nested PCR

Metodou vycházející z klasické PCR je tzv. vnořená PCR (Nested PCR; NPCR) využívající k amplifikaci specifického úseku DNA dvou sad primerů, tzv. vnějších a vnitřních. Tyto primery

ohraničují stejný úsek, avšak každý na trochu jiném místě sekvence. Amplifikace pak probíhá ve dvou krocích - první kolo je běžná PCR probíhající se sadou vnějších primerů. Produkty prvního kola jsou využity v kole druhém, ve kterém je využito sady vnitřních primerů. Díky tomu je tato metoda vysoce senzitivní (Hanelt *et al.*, 1997). Autor využívá tuto metodu pro velmi přesnou detekci *S. mansoni* v homogenátu nakažených plžů rodu *Biomphalaria*.

Kvůli výraznému snížení nebezpečí vzájemné kontaminace vzorků při složité manipulaci byl vytvořen postup SNPCR probíhající v jedné zkumavce („Single-tube Nested PCR“, SNPCR) (Abath *et al.*, 2002).

Multiplex PCR

Při Multiplex PCR je do reakční zkumavky přidáno více sad primerů, které umožní amplifikaci více úseků DNA zároveň. Výsledkem je detekce více druhů parazitů, popřípadě parazita a jeho hostitele najednou (Chamberlain *et al.*, 1988).

Využití Multiplex PCR u schistosom ilustruje práce Jannotti-passos (1997, 2006), která využívá k detekci a zároveň k determinaci parazitů druhově specifických primerů pro mitochondriální DNA a k určení druhu jeho hostitele primery pro ITS. Tato metoda, ač náročná na optimalizaci, dokázala detekovat *S. mansoni* zároveň s jejím hostitelem rodu *Biomphalaria*.

Real – Time PCR

Kvantitativní PCR (RT PCR; qR-T PCR; qPCR; Real-time PCR) umožňuje detekovat a kvantifikovat množství vytvořeného produktu v reálném čase, a to za použití fluorescenčního značení a speciálního termocykleru s fluorometrem. Po navázání fluoroforu na vznikající produkty PCR dojde k emisi světla. Měřením intenzity signálu pak lze určit množství nasyntetizované DNA. Běžně se využívá dvou typů tohoto značení – nespecifického, u něhož dochází k sekvenčně nezávislému navázání fluoroforu na dvoušroubovici DNA, nebo sekvenčně specifického (tzv. prób). Aby při použití nespecifického značení nedocházelo k falešně pozitivní reakci, je nutná optimalizace funkčnosti a specifity primerů i prób. Specifické primery zajistí amplifikaci konkrétních úseků DNA, a tím pádem i detekci pouze kýžené sekvence (Garibyan and Avashia, 2013; Kane *et al.*, 2013). Tato metoda byla využita při zkoumání koinfekce MH plžů schistosomami ze skupin *haematobium* a *mansoni*, přičemž byly použity rodově specifické primery a skupinově specifické próby (Kane *et al.*, 2013).

FRET Real – Time PCR

„Realtime Fluorescence Resonance Energy Transfer“ PCR (FRET PCR) je metoda založená na kombinaci Real-Time PCR a analýzy křivky teploty tání („melting curve“) (Sanpool *et al.*, 2012). Po amplifikaci DNA pomocí R-T PCR je v systému postupně zvyšována teplota, dochází tak k denuraci dvojvlákna DNA a vyvazování fluoroforu, což se projeví jako pokles světelného signálu. Průběh tohoto procesu je zaznamenáván a vyneseno pomocí křivky do grafu. Ta je pak porovnávána se standardy křivek pro konkrétní parazity. Tato metoda byla např. využita při detekci *S. mekongi* v plžích hostitelích (Sanpool *et al.*, 2012).

LAMP

Produkty získané amplifikací pomocí LAMP (viz LAMP, str. 7) mohou být následně detekovány různými způsoby: pomocí fluorescenčního barviva (SYBR green I), které je detekováno UV světlem přímo ve zkumavce. Pro zobrazení výsledků může být rovněž využito elektroforézy (Abbasi *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Hamburger *et al.*, 2013). LAMP se ukázala být vhodnou při detekci *S. mansoni* a *S. haematobium* ve velkém měřítku, zejména pro její nízké náklady (Hamburger *et al.*, 2004, 2013).

4.1.3 Imunologické metody detekce parazitů v meziphostiteli

Imunodiagnostické metody jsou obecně využívány zejména k detekci protilátek vytvořených hostitelem v odpovědi na probíhající infekci. Meziphostitelští plži však nedisponují tzv. adaptivní imunitou a specifické protilátky proti parazitům neprodukují. (Coustau, 2009). Při detekci v plžích je proto princip imunologické detekce modifikován k přímému prokázání parazita – tj. detekční protilátky se váží specificky přímo na proteiny produkované parazitem, nikoli hostitelem. Tyto proteiny jsou přitom vybrané tak, aby nedocházelo ke zkřížené reakci protilátek s proteiny hostitele (Hamburger *et al.*, 1989a; Alba *et al.*, 2014). I když je tyto metody schopny prokázat přítomnost parazita již v prepatentní fázi infekce, v praxi se využívají mnohem méně než metody molekulární, což pravděpodobně souvisí s náročností hledání ideálních cílových proteinů pro eliminaci zkřížených reakcí (Hamburger, Weil, Turetzky, *et al.*, 1989).

ELISA

Při detekci schistosomích antigenů v plžích je nejvíce využívanou metodou ELISA („Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“), při které dochází k detekci pomocí monoklonálních protilátek spojených s enzymy (Hamburger *et al.*, 1989b). Tyto protilátky jsou získávány ze séra imunizovaných myší a využívají se k tomu, aby se navázaly na daný antigen a umožnili tím jeho detekci. Samotná detekce pak probíhá pomocí anti-myších protilátek konjugovaných s křenuvou peroxidázou, která v reakci s roztokem chromogenu zajistí barevný signál (Gan and Patel, 2013).

4.2 Limity a porovnání metod detekce schistosom v meziphostiteli

Mikroskopické metody

Nespornou výhodou těchto metod je jejich nenáročnost na speciální vybavení a rychlá informace o přítomnosti hledaných parazitů v plžích již během procesu jejich vyšetřování. Počet vylučujících plžů lze určit ovšem pouze za předpokladu, že jsou tyto MH před vyšetřením důkladně opláchnuty a rozmístěny do samostatných nádob. Nízká cena vybavení je kompenzována časovou náročností při analýze vysokého počtu plžů, která navíc vyžaduje erudici vyšetřující osoby (Joof *et al.*, 2020). Při intravitálních metodách je výhodou možnost využití plžů i v dalším výzkumu (např. při infekčních pokusech), je však nutné udržet je živé. Raná stadia infekce, kdy nakažený plž ještě cercárie nevykládá (méně než 3-4 týdny po napadení MH), se neobejdou bez opakování stimulace vylučování po delších časových intervalech (Chu & Dawood, 1970; Abath *et al.*, 2006). Delší chov však bývá spojen i s vyšší mortalitou plžů a tedy i ke zkreslení výsledku. V omezené míře však lze prepatentní fázi infekce

motolicemi u plžů zachytit pomocí pitvy vyšetřovaných plžů; tato metoda však selhává u stádií, jež jsou menší než limitní pozorovatelná velikost (např. v případě přítomnosti pouze mateřských sporocyst) (Loker *et al.*, 1982). Studie věnující se detekci motolice *Fasciola* sp. ovšem uvádí, že pitva je nerychlejší a nejsnazší způsob určení prevalence plžů na daném území (Dreyfuss *et al.*, 2005; Caron *et al.*, 2008). Přehledný souhrn výhod a nevýhod mikroskopických metod lze najít v tabulce 1.

Tabulka 1- Souhrn mikroskopických metod detekce schistosom v mezipříteli

	metoda	Způsob odběru; typ vzorku	výhody	nevýhody
Mikroskopické metody	stimulace vyučování cerkárií z plžů	intravitální: vyloučené cercárie	- nenáročnost na vybavení - nízká cena - okamžitý výsledek - zaznamenání výskytu motolic, které nejsou předmětem vyšetřování	- vysoké nároky na zkušenosti pozorovatele - nízká specifita a senzitivita - obtížná druhová determinace - nemožnost detekce prepatentní fáze infekce
	pitvy plžů	postmortální: intramoluskální stádia	- nenáročnost na vybavení - nízká cena - okamžitý výsledek - zaznamenání výskytu motolic, které nejsou předmětem vyšetřování - detekce prepatentní fáze infekce (mimo raná stádia)	- vysoké nároky na zkušenosti pozorovatele - nízká specifita a senzitivita - obtížná druhová determinace

Molekulární metody

Nedostatky mikroskopických metod v podobě problematické detekce parazitů v raných stádiích vývoje v MH a problematické druhové determinace parazitů vedly k rozvoji využití molekulárních metod. Ty disponují nástroji k druhovému určení jak parazita, tak i hostitele (viz Metody determinace , str. 6). Avšak i tyto metody mají své limity (viz Tabulka 2).

Klasická PCR je schopna bezpečné druhové determinace i odhalení prepatentní fáze infekce (Melo *et al.*, 2006). Nevýhodou všech metod založených na PCR je však jejich náročnost na speciální vybavení a u většiny využití časově náročné gelové elektroforézy. Ta je navíc méně senzitivní než např. qPCR nebo FRET PCR, jejichž detekční limit je až 10 fg DNA. (Abath *et al.*, 2006).

V případě, že je potřeba zvýšit specifitu při analýze, se nabízí využití Nested PCR. Ta má všechny výhody klasické PCR, navíc je při ní stále možné detekovat 10 fg parazitární DNA, což umožňuje potvrdit infekci plže už jeden den po nákaze. Slabinou této metody je nebezpečí kontaminace vzorku během složité manipulace ve více zkumavkách (Hanelt *et al.*, 1997). Z tohoto důvodu byla vyvinuta modifikace SNPCR, jenž probíhá v jedné zkumavce – její nevýhodou je však lehce snížená senzitivita (Melo *et al.*, 2006). Přesto, že je při obou modifikacích Nested PCR využívána elektroforéza, autoři článku Hanelt *et al.* (1997) uvádí, že prověření plžů z jedné lokality lze provést za jediný den.

Pro úsporu času i materiálu při detekci a následné determinaci parazitů či jejich mezihostitelů je velkou výhodou metoda Multiplex PCR. Oproti ostatním PCR metodám jí lze detekovat a determinovat jak parazita, tak jeho hostitele zároveň při jedné reakci. A to s vysokou senzitivitou mezi 0,1 ng – 1 ag. Také se takto dá detekovat více druhů parazitů najednou v jediném hostiteli (Mesquita *et al.*, 2020) Autoři článků Jannotti-Passos *et al.*, 1997 a Jannotti-Passos *et al.* 2006 navíc uvádí, že infekci je možno odhalit již 7 dní po nákaze, zároveň lze vyšetřovat i 24 hodin mrtvé plže. Nevýhodou je vysoká náročnost na optimalizaci a využití elektroforézy, která proces získání výsledku prodlužuje.

Největší výhodou Real-Time PCR je její rychlost, které je dosaženo využitím systémů zachycení signálu bez gelové elektroforézy. Díky pozorování v reálném čase dovoluje tato metoda i kvantifikaci tvořeného produktu (Kane *et al.*, 2013). Další výhodou je vysoká senzitivita, přičemž je uváděno, že je takto možné detekovat jednu jedinou cercárii uměle přidanou do vzorku 10 neinfikovaných plžů. (Sanpool *et al.*, 2012). Nevýhodou je náročnost na vybavení, tj. speciální termocykler s fluorometrem.

Z R-T vycházející FRET PCR dále zvyšuje její specifitu a senzitivitu. Intapan a kol. (2008) ve svém článku věnující se detekci *Opisthorchis viverrini* vyzdvihují rychlost metody a její senzitivita – lze tak detekovat jednu jedinou cercárii uměle přidanou do vzorku 30 neinfikovaných plžů (velikost plžů však není uvedena).

Z hlediska nároků na laboratorní vybavení je nejjednodušší metoda LAMP. Díky tomu jsou s ní v porovnání s předchozími molekulárními metodami spojeny i nižší náklady i nároky na odbornost provádějící osoby. Pozitivní výsledek je navíc pozorovatelný pouhým okem a odpadá tak nutnost využití elektroforézy, což proces analýzy zrychluje až na dobu cca dvou hodin (Abbasi *et al.* 2010). Z těchto důvodů je tato metoda s detekčním limitem 0,1 fg DNA vhodná ke MX ve velkém měřítku i v rozvojových zemích. Navíc má 10x vyšší specifitu než klasická PCR, dá se tak detekovat infekce MH již 1 den po nákaze. Nevýhodou však může být vysoká citlivost k inhibici činidly využívanými při extrakci DNA, což může vést k falešně negativním výsledkům (Fernández-Soto *et al.*, 2014).

Imunologické metody

Imunologické metody mají v tomto případě značně limitované využití, zdroje informací navíc pocházejí pouze od jednoho autora (Hamburger *et al.*, 1989a; Hamburger *et al.*, 1989b). Výhodou metody může být možná detekce již 2 týdny po nákaze plže, tedy ještě v prepatentní fázi infekce. Velkým problémem bývá náročná optimalizace a zamezení výskytu zkřížené reaktivity působící falešně pozitivní výsledky. Při správném nastavení mohou ale být tyto metody vysoce senzitivní – při detekci *S. mansoni* byla pozorována až 100% specifita a senzitivita (Hamburger *et al.*, 1989b)

Tabulka 2 - Souhrn molekulárních a imunologických metod detekce schistosom v meziphostiteli

	metoda	Způsob odběru; typ vzorku	výhody	nevýhody
Molekulární metody	amplifikační metody založené na PCR		<i>*rozdíl oproti Klasické PCR</i>	
	Klasická PCR	intravitální; hemolymfa	- detekce i prepatentní fáze infekce vč raných stadií - druhová determinace - dostatečná senzitivita a specifita	- vysoké finanční nároky na speciální vybavení - časová náročnost
	Nested PCR	postmortální; volná stadia,	* vysoká senzitivita a specifita	* vyšší riziko kontaminace vzorku
	Multiplex PCR	homogenizovaný plž	* detekce více markerů najednou	* náročnost optimalizace
	Real-Time PCR, FRET PCR		* vysoká rychlost * vysoká senzitivita a specifita	- vysoké finanční nároky na speciální vybavení
	ostatní amplifikační metody			
Imunologie	LAMP	intravitální; homogenizovaný plž postmortální; volná stadia, hemolymfa	- detekce i prepatentní fáze infekce - druhová determinace vč. raných stadií - vysoká senzitivita a specifita - vysoká rychlost - nenáročnost na vybavení - uživatelská přívětivost	- náročnost optimalizace
	imunologické metody			
	ELISA	intravitální; hemolymfa	- při správné optimalizace je vysoce senzitivní - možná detekce i prepatentní fáze infekce	- zkřížené reakce s antigeny hostitele - náročnost optimalizace a nutnost vývoje vlastních monoklonálních protilátek

5 Detekce parazitů v obratlovčím hostiteli

Obratlovci mohou sloužit v životním cyklu schistosom jako definitivní hostitelé, ve kterých dochází k pohlavnímu množení a tvorbě vajíček, případně jako hostitelé náhodní, kde paraziti nedospívají a nemnoží se (viz Biologie schistosom, str. 2).

5.1 Metodika a mechanismy detekce parazitů v obratlovčím hostiteli

Intravitální metody detekce schistosom v obratlovcích se zaměřují na detekci možných přítomných stádií, jejich „stop“ (cfDNA), nebo protilátek, které proti nim produkuje samotný hostitel. Jako materiál pro detekci mohou sloužit výkaly či různé tělní tekutiny. V různé míře zde lze využít metody kopromikroskopické, molekulární a imunologické. Další možností je využití postmortálních metod, mezi něž řadíme zejména pitvy obratlovčích hostitelů.

5.1.1 Detekce schistosom založená na zobrazovacích metodách

Nejrozšířenější zobrazovací metodou detekce schistosom je světelná mikroskopie využívaná zejména při analýze koprologických či histologických vzorků s cílem potvrdit přítomnost nejčastěji vajíček či miracidíí. Pokročilé zobrazovací metody schopné detekovat parazity a patologie jimi působené jsou oproti tomu poměrně novým, ale rozvíjejícím se přístupem, a to na úrovni humánní medicíny i experimentálních prací na laboratorních zvířatech.

Koprologické metody detekce parazitů

Pro intravitální potvrzení přítomnosti dospělých savčích i ptačích schistosom v definitivním hostiteli lze využít koprologických metod zaměřených na detekci jejich vajíček v exkrementech (Cringoli *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2014) v modifikované verzi i v moči (Cringoli *et al.*, 2017). Tyto metody lze rozdělit na roztěrové (Kato-Katz), sedimentační (formol-etherová metoda), flotační (např. FLOTAC) a metody filtrační (Bellova filtrační metoda). V případě schistosom patří mezi nejvíce používané Kato-katzova metoda vhodná pro analýzu čerstvých vzorků, případně sedimentační metody využívané zejména pro zpracování velkých množství fixovaných vzorků (Speich *et al.*, 2014).

Sběr exkrementů pro průkaz schistosom může být proveden jednorázově nebo během delšího intervalu (např. 24 h) (Gomes *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2019). V závislosti na metodě může být vzorek fixován pomocí 10% formalínu pro zamezení líhnutí miracidíí z vajíček během zpracování (viz Biologie schistosom, str. 2) (Glinz *et al.*, 2010). V tomto stavu může být navíc skladován až po dobu několika málo měsíců.

Aby byla vajíčka jakýkoliv parazitů lépe detekovatelná, je potřeba ze vzorku odstranit co nejvíce ostatních rušivých složek. U Kato-Katzovy metody je využíváno protlačení měkkého vzorku přes sítko, které omezí přítomnost velkých částic ve vzorku (Komiya & Kobayashi, 1966; Katz *et al.*, 1971; Speich *et al.*, 2014). U sedimentačních metod se využívá chemikálií, které čistí materiál od balastu ztěžujícího prohlížení vzorku (sedimentační formalín-etherová metoda) (Ridley & Hawgood, 1956; Allen & Ridley, 1970; Glinz *et al.*, 2010; Uga *et al.*, 2010). U metod flotačních dochází k cezení ředěného vzorku přes

sítka a jeho opětovné koncentraci centrifugací (Cringoli *et al.*, 2010). Dalším způsobem pak může být postupné promývání vzorku solným roztokem (Coelho *et al.*, 2009).

Úspěšnost detekce vajíček ve vzorku může být zvýšena koncentračními metodami; buď pomocí sedimentace, kdy vajíčka klesají na dno zkumavky, nebo pomocí flotace. Při ní je hrubě přefiltrovaný vzorek koncentrován centrifugací a rozmíchán v tzv. flotačním roztoku o určité hustotě (pro schistosomy 1,35-1,45 g/ml), která je vždy větší než hustota vajíček. Ta pak samovolně nebo během centrifugace stoupají k hladině, kde mohou být sejmuta krycím sklíčkem nebo kličkou (Cringoli *et al.*, 2010; Inpankaew *et al.*, 2014). Flotace je však u schistosom využívána méně často kvůli velikosti a specifické hustotě jejich vajíček. Existují však komerčně dostupné systémy známé pod názvem FLOTAC a mini-FLOTAC, jež jsou dle autorů vhodné i pro použití u schistosom (Cringoli, 2006; Glinz *et al.*, 2010; Barda *et al.*, 2013; Cringoli *et al.*, 2017).

Pro schistomy existují i další metody založené na rozmíchání fixovaných vzorků ve větším objemu vody. Následně jsou zbaeny větších nečistot systémem prefiltrace přes filtrační tkaninu o velikosti ok 500 a 300 μm . Vajíčka jsou pak koncentrována na posledním, velmi jemném filtru (20 μm) na dně aparatury (Bell, 1963; Teesdale & Amin, 1976).

Některé z metod se snaží usnadnit hledání vajíček či cyst parazitů pomocí barvení nebo prosvětlování vzorku před jeho prohlížením. Vajíčka schistosom mohou být barvena např. ninhydrinem (Bell, 1963), u Kato-Katzovy metody slouží jako barvivo malachitová zeleň, avšak nedochází přímo k obarvení vajíček, pouze ke zvýraznění kontrastu okolí (Katz *et al.*, 1971).

Zajímavou variantou zpracování vzorku pro detekci schistosom je metoda Helmintex, která kombinuje filtraci a formol-etherovou sedimentační metodu (pro odstranění nečistot), vajíčka poté koncentruje pomocí paramagnetických částic, které jsou následně společně s vajíčky přitahovány v magnetickém poli ke stěnám zkumavky. Odtud je tento materiál přenesen na sklíčko, barven ninhydrinem a pozorován pod mikroskopem (Teixeira *et al.*, 2007; Favero *et al.*, 2017).

Metody detekce využívající líhnutí miracidii schistosom

Podmínkou pro využití této metody detekce schistosom je možnost získat čerstvý vzorek, který se inkubuje ve vodě, kde přirozeně dochází k líhnutí miracidii. Jejich koncentrace pak probíhá ve vysoké, odstíněné nádobě s dlouhým úzkým hrdlem, na jehož konec je namířen zdroj světla, ke kterému jsou miracidia přirozeně lákána. (Jurberg *et al.*, 2008).

V případě viscerálních druhů schistosom se pro tento typ vyšetření využívá exkrementů, u nasálních schistosom, které kladou vajíčka do nosní sliznice (zejména u ptačích schistosom, případně u dobytka) je vhodnou intravitální alternativou výplach nosní dutiny, při kterém lze získat miracidia, případně i ještě nevyhlá vajíčka. Postmortálně lze tuto metodu aplikovat i na vypitvanou a na kousky natrhanou nosní sliznici. (Summanth *et al.*, 2004; Kolářová *et al.*, 2010; Latchumikanthan *et al.*, 2014).

Pokročilé zobrazovací metody

Pokročilé zobrazovací metody slouží k přímé detekci parazitů nebo jimi způsobených patologií. Nejběžněji používanými metodami, kterými lze u člověka odhalit patologie spojené s infekcí schistosomami, jsou ultrasonografie (USG), výpočetní tomografie („Computed tomography“, CT) a magnetická rezonance („Magnetic resonance imaginig“, MRI). Tyto tři zmíněné metody slouží především k pozorování patologií spojených se schistozomózou. (Masi *et al.*, 2020; Valluru *et al.*, 2020). Oproti tomu konfokální laserová skenovací tomografie (CLSM) je v současné době je využívána především u experimentálních zvířecích (obvykle myších) modelů pro 3D zobrazení parazitů *in situ*. U lidí se pak začíná využívat tuto metodu pro detekci *S. haematobium* v močovém měchýři (Holtfreter *et al.*, 2011; Fritzsche *et al.*, 2012)

Biopsie

Při biopsii dochází k odebrání malého vzorku tkáně z živého organismu. Materiál je pak obvykle histologicky zpracován a analyzován na přítomnost parazitů pod mikroskopem. Tyto vzorky jsou v případě viscerálních druhů schistosom odebrány ze sliznice rektu či jater (Rabello, 1992; Elbaz & Esmat, 2013). Při vyšetření na cercáriovou dermatitidu se pak odebírá vzorek kůže v místě penetrace cercárie (Al-Jubury *et al.*, 2021).

Pitvy obratlovčích hostitelů

Schistomy se v obratlovčím hostiteli nacházejí v různých tkáních v závislosti na druhu, stádiu, fázi migrace i vhodnosti hostitele pro další vývoj (viz Biologie schistosom, str. 2). Při pitevních vyšetřeních je možné zjistit všechna stadia včetně raných schistosomul v kůži, vyvíjejících se schistosomul a dospělců v různých orgánových soustavách i vajíček, zanášených do typických i ektopických lokalizací (File *et al.*, 1998; McManus *et al.*, 2018). Vodítkem k jejich nalezení v hostiteli bývají např. fibrótické změny, zámky imunitní reakce nebo petechiální krváceniny (Andrade, 2009; Correia *et al.*, 2009; Prüter, 2017)

V případě, že je lokalizace hledaného druhu či stadia schistosomy známá, lze vyšetřovat cíleně pouze konkrétní orgánovou soustavu, a to buď prohlížením tkáně natrhané na menší kousky, nebo proplachů narušených tkání a orgánů na sítech. U zvířat experimentálně nakažovaných lidskými schistosomami lze pro získání zejména dospělců využít rovněž perfuzi cévního systému (Ashrafi & Brant, 2020). Pokud však předem není znám hledaný druh schistosomy, je nutné provést celkovou parazitologickou pitvu, při které by nemělo být opomenuto ani cévní zásobení vnitřních orgánů, centrální nervový systém nebo nosní sliznice (Kolářová *et al.*, 2010).

5.1.2 Molekulární metody detekce schistosom v definitivním hostiteli

Molekulární metody detekce parazitů se u definitivních hostitelů využívají pro zjišťování infekce schistosomami z moči (Sandoval *et al.*, 2006) nebo ze stolice (Pontes *et al.*, 2002), případně z krevního séra nebo plazmy (Wichmann *et al.*, 2009). Podobně jako u MH jsou využívány metody amplifikace PCR, RT PCR a LAMP (viz Molekulární metody detekce parazitů v mezihostiteli, str. 10). Objevují se

zde však i další modifikace těchto metod, a to zejména v oblasti vizualizace amplifikovaných produktů (Gomes *et al.*, 2010).

Vzorky pro molekulární detekci získané z obratlovceho hostitele mohou obsahovat přímo parazity, případně fragmenty DNA z jejich uhynulých těl. Tato volná DNA (cfDNA) může být pro účely detekce extrahována buď z krevního séra, plazmy, mozkomíšního moku nebo dalších tělních tekutin (Wichmann *et al.*, 2009; Kato-Hayashi *et al.*, 2013; Härter *et al.*, 2014). Intracelulární DNA v podobě živých parazitů je pak získávána zejména z vajíček vylučovaných spolu s exkrementy nebo močí. Pro zpřístupnění DNA uvnitř vajíček pro analýzu je však nezbytné použít teploty 95 °C nebo v případě viabilních vajíček nechat předem vylíhnout miracidia (Pontes *et al.*, 2002). Pro samotnou extrakci DNA u všech výše popsaných zdrojů se pak používá komerčně dostupných kitů nebo fenol-chloroformové metody (Pontes *et al.*, 2003; Wichmann *et al.*, 2009).

Metody amplifikace DNA při detekci parazitů v obratlovčím hostiteli

Pro amplifikaci extrahované DNA je pro různé druhy schistosom využíváno stejných postupů jako u MH, např. PCR, RT PCR, LAMP (viz Molekulární metody detekce schistosom v mezihostiteli, str. 10) (Sandoval *et al.*, 2006; Cnops *et al.*, 2013; Gandasegui *et al.*, 2016). Specifita vybraných primerů (např. tandemové repetice *DraI* – viz Molekulárně-biologické metody, str. 6) se zde může pohybovat až na úrovni druhů (*S. mansoni*) a to bez zkřížených reakcí s DNA druhy příbuznými. Pro vizualizaci produktů amplifikace jsou vyvíjeny v případě detekce lidských schistosom postupy, jež urychlují, usnadňují a zpřesňují analytický proces oproti klasické gelové elektroforéze. Jedná se tzv. OC PCR (oligochromatickou PCR) a spojení metod PCR a ELISA.

OC PCR

Tato metoda je založena na principech klasické PCR ve spojení s analýzou produktů pomocí oligochromatografie. Oproti klasické PCR se zde využívají primery konjugované s biotinem, jež jsou druhově specifické. Tímto způsobem dochází k biotinylníci výsledných amplikonů. Ty jsou následně pro denaturaci zahřívány v roztoku, v němž dochází k jeho analýze pomocí tzv. „oligochromatography dipstick“. S Biotinem konjugované amplikony jsou imobilizovány na povrchu rychlotestu, přičemž jsou značeny hybridizací s próbami spojenými se zlatem. Pozitivní výsledek reakce se pak projeví na povrchu rychlotestu jako okem viditelná červená značka (Deborggraeve *et al.*, 2006; Akinwale *et al.*, 2008). Tato metoda je zatím ve fázi vývoje pro urychlení detekce *S. mansoni* a *S. haematobium* (Akinwale *et al.*, 2008).

PCR-ELISA

Tato metoda rovněž vychází z klasické PCR, avšak jsou zde opět použity primery konjugované s biotinem (viz OC PCR výše). Analýza amplikonu probíhá v jamkách mikrotitračních destiček, jejichž stěny jsou pokryty streptavidinem. Díky tomu dochází k imobilizaci DNA spojené s biotinem. Následným krokem je přidání fluoresceinem značených sekvenčně specifických prób. Po jejich navázání jsou přidány anti-fluorescein protilátky, jež jsou konjugované s křenovou peroxidázou.

Posledním krokem je přidání chromogenu (TMB), jež je nepřímo peroxidázou změněn na svou barevnou formu. Známkou pozitivní reakce je pak barevná změna roztoku (Gomes *et al.*, 2010).

5.1.3 Imunologické metody detekce schistosom v obratlovčím hostiteli

V parazitologii slouží imunologické metody buď k přímému průkazu parazitů, přesněji jejich antigenů, či k detekci specifických protilátek produkovaných imunitním systémem hostitele v odpovědi na přítomnost parazita.

Detekce protilátek

V případě schistosom vznikají protilátky proti všem 4 stádiím, se kterými se DH setkává (tj. cercárie během infekce, schistosomulum, dospělec a vajíčko v případě infekce hostitele oběma pohlavími). Tvorba protilátek probíhá nejen proti povrchovým antigenům, ale i proti exkrečně-sekrecním produktům parazita. Protilátky proti těmto substancím pak mohou být detekovány v krevní plazmě, séru, či v moči a výkalech. Metody pro detekci lidských schistosom patří stále mezi široce využívané (Weerakoon *et al.*, 2015; Hinz *et al.*, 2017).

Intradermální test

Intradermální test je historicky nejstarší imunologickou metodou využívanou v minulosti při vyšetřování pacientů s podezřením na nákazu schistosomami (Zhu, 2005). Pacientům jsou při něm na vnitřní straně předloktí intradermálně aplikovány antigeny získané homogenizací různých stadií schistosom z laboratorních zvířat. Po aplikaci je po 15-30 min. od aplikace je pozorována imunitní reakce na kůži. Plocha a charakteristika skvrn tvořených na kůži pak slouží jako kritérium pro rozhodnutí o negativním či pozitivním výsledku testu na přítomnost schistosom u pacienta (Pellegrino, 1958).

COPT a CHR

Jednou z prvních široce využívaných metod detekce anti-schistosomích protilátek v hostiteli je tzv. cirkumovální precipitační test („Circumoval precipitin test“, COPT). Sérum, získané z krve pacienta s podezřením na infekci konkrétním druhem schistosom, je při ní inkubováno v přítomnosti lyofilizovaných vajíček téhož druhu získaných z laboratorních zvířat. V přítomnosti protilátek dochází k jejich vazbě na vajíčka a tvorbě pozorovatelných shluků, jež se bez přítomnosti specifických protilátek netvoří (Rodriguez-Molina *et al.*, 1962; Carvalho do Espírito-Santo *et al.*, 2014). Obdobná metoda, ovšem založená na vazbě protilátek proti cercáriím ze séra pacienta na lyofilizované cercárie, se nazývá CHR („Cercarien Hüllen reaction“) (Weerakoon *et al.*, 2015 dle Smit, 1961).

IHA

Při nepřímé hemaglutinaci („Indirect Hemagglutination Assay“, IHA), při níž se senzitivizují zvířecí (např. ovčí) erythrocyty antigeny konkrétního druhu schistosomy. Po inkubaci těchto buněk s hostitelským sérem pak dochází v případě pozitivního nálezu k provázání protilátek a shlukování erythrocytů, v důsledku čehož nedochází k jejich klesání na dno zkumavky. Naopak u negativního vzorku erythrocyty klesnou na dno jamky mikrotitrační destičky. Obdobně lze při detekci tohoto typu využít

místo zvířecích erytrocytů i částice oxidu křemičitého nebo latexové částice, jež jsou méně náročné na manipulaci (Wang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007).

IFA

Metoda IFAT („Imunofluorescence Antibody Test“) využívá fluorescenčně značených protilátek. Tyto detekční protilátky původem např. z koz či jiných pokusných zvířat jsou označeny fluoroforem a specificky se váží na lidské protilátky. Test spočívá v tom, že se lidské sérum inkubuje s histologickými řezy dospělců, s cercáriemi, nebo s vajíčky získanými z laboratorních zvířat. Do roztoku jsou následně přidány detekční protilátky. Po inkubaci je malá část vzorku přesunuta na sklíčko a pozorována pod fluorescenčním mikroskopem. Pokud jsou v séru pacienta přítomny protilátky proti parazitovi, je v mikroskopu znatelný fluorescenční signál na těle parazita v řezu (Sadun *et al.*, 1960; Li *et al.*, 2004; Sorgho *et al.*, 2005).

ELISA

Nejrozšířenější imunologickou metodou je v dnešní době metoda využívající protilátek konjugovaných s enzymy tzv. ELISA („Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay“). Princip této metody je založen na ukotvení rozpustných antigenů parazita na stěnách jamek mikrotitrační destičky. Na tyto antigeny se při inkubaci s vyšetřovaným sérem váží protilátky v něm obsažené a vzniká komplex antigen-protilátka. Pro vizualizaci jsou následně přidány sekundární protilátky, jež byly vytvořeny v laboratorních zvířatech a jsou specifické proti lidským globulinům. Tyto protilátky jsou současně konjugovány s enzymy (např. alkalická fosfatáza, křemová peroxidáza). Po promytí vzorku je přidán roztok s chromogenními sloučeninami. Enzym připojený na protilátce pak katalyzuje chemickou přeměnu substrátu (chromogenu) na barevný produkt, jenž je detekovatelný pomocí spektrofotometrie (Engvall and Perlmann, 1972; McLaren *et al.*, 1978).

Detekce antigenů

Imunologické diagnostiky schistosomózy se stále častěji zaměřují na detekci parazitárních antigenů. Tyto antigeny pocházející ze schistosomulí, dospělců, nebo vajíček se pomocí těchto metod detekují v krvi, moči, nebo sputu. Nejčastěji detekovanými antigeny jsou AWA („Adult Worm Antigen“), SEA („Soluble Egg Antigen“) a tzv. cirkulující antigeny.

CCA a CAA „dipstick“

Mezi dva nejzásadnější cirkulující antigeny pak patří CCA („Circulating Cathodic Antigen“) a CAA („Circulating Anodic Antigen“), pocházející z epiteliální vrstvy zažívacího traktu červa. Oba tyto antigeny se nalézají jak v krvi, tak i ve vylučované moči, kde mohou být detekovány pomocí metody ELISA (viz výše) (Liu *et al.*, 2010) případně také pomocí antigenního rychlotestu („dipstick“) při nákaze *S. haematobium* nebo *S. mansoni*. Při této metodě je využíváno značení pomocí protilátek konjugovaných se zlatem. Pozitivní test je pak vizualizován jako dvě červené značky (podobně jako u OC PCR) (van Dam *et al.*, 2004; Stothard *et al.*, 2006; Weerakoon *et al.*, 2015).

MEIA

Výše popsané metody detekují antigeny ve vzorcích nepročištěných od ostatních antigenů, což může vést ke snížení specifity metody díky zkříženým reakcím. Pro eliminaci toho jevu jsou postupně vyvíjeny metody purifikace těchto antigenů (Yu *et al.*, 2012). Metoda MEIA („Magnetic Microbead-based Enzyme-linked Immunoassay“), využití např. při detekci antigenů *S. japonicum* v lidském séru (Liu *et al.*, 2010), spočívá v tom, že protilátky proti parazitárním antigenům jsou konjugovány s magnetickými částicemi. Po navázání protilátek na antigen je pod zkumavku vložen magnet, jenž komplex antigen-protilátka-magnetická částice přitáhne ke dnu zkumavky. Tento sediment je pak detekován pomocí metody ELISA (viz výše) (Yu *et al.*, 2012; Weerakoon *et al.*, 2015).

5.2 Limity a porovnání metod detekce schistosom v definitivním hostiteli

Detekce založená na zobrazovacích metodách

Kopromikroskopické metody patří celosvětově k nejpoužívanějším metodám při kontrole rozšíření parazitů, a to zejména pro jejich jednoduchost a rychlost provedení, malé náklady na vybavení a vyhovující senzitivita (WHO, 2009) (viz Tabulka 3). Jejich hlavními nevýhodami je však obtížná druhová determinace nalezených stádií a možnost provedení pouze v patentní fázi infekce u DH (Gomes *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2019).

Z metod deklarovaných pro koprologickou diagnostiku schistosom poskytuje Kato-Katzova metoda rychlý, snadný a cenově dostupný přehled o počtu nakažených jedinců na daném území. Pro zvýšení její citlivosti je doporučeno její provedení na jednom vzorku několikrát opakovat. Ovšem ani tak nemusí být natolik senzitivní, aby došlo k potvrzení infekce s malou intenzitou nákazy, jelikož je k vyšetření použita pouze malá část vzorku, ve kterém vajíčka nejsou nijak koncentrována. (Katz *et al.*, 1971; Glinz *et al.*, 2010).

Oproti tomu dochází při metodách, jako je např. formol-etherová nebo FLOTAC ke koncentraci vajíček mimo balast ze zbytků potravy, což výrazně usnadňuje vyhodnocování a zvyšuje senzitivitu. Přesto je však mnohem nižší než u molekulárních a imunologických metod (Sandoval *et al.*, 2006). Praktické provedení těchto metod však vyžaduje oproti Kato-Katzově metodě alespoň elementární vybavení laboratoře v podobě centrifugy (vyjma metody mini-FLOTAC) a flotační či sedimentační roztoky (Cringoli *et al.*, 2010; Cringoli *et al.*, 2017; Glinz *et al.*, 2010; Uga *et al.*, 2010).

Metody líhnutí miracií jsou náročné na čerstvost vzorku kvůli zachování viability vajíček, využívají se proto jen minimálně. V koncentračních nádobách je však možné vyšetřit na miracidia oproti koprologickým metodám velký objem vzorku bez vyšší časové dotace.

Nejkomplexnějším přístupem je při využití mikroskopických metod parazitologická pitva. Při pitevním vyšetření lze detekovat všechna stadia vyskytující se v obratlovčím hostiteli (viz Biologie schistosom, str. 2) včetně patologií jimi způsobené. (Paré & Black, 1999). Při vhodném zpracování lze navíc parazitologický materiál získaný při pitvě dále analyzovat molekulárními metodami pro potvrzení morfologické determinace.

Nespornou výhodou použití biopsií při detekci schistosom je možnost odebrat intravitálně vzorek tkáně i s parazitem pro další vyšetření včetně druhové determinace, a to i v případech, kdy nelze očekávat produkci vajíček např. pro koprologickou diagnostiku (viz Biologie schistosom, str. 2). Stále se však jedná o invazivní zákrok, který je prováděn jen v opodstatněných případech (Rabello, 1992).

Pokročilé zobrazovací metody využívané v humánní medicíně v souvislosti se schistosomami slouží hlavně k neinvazivní diagnostice probíhajících patologických jevů. Vyžadují speciální a velice drahá zařízení, v některých případech je rovněž nezbytné pacientům před vyšetřením aplikovat kontrastní látky (Holtfreter *et al.*, 2011; Fritzsche *et al.*, 2012; Masi *et al.*, 2020).

Molekulární metody

Pro molekulární metody obecně platí, že se jedná o velice přesné determinační nástroje (Sandoval *et al.*, 2006). Zároveň jsou schopny (stejně jako při detekci v MH, viz Limity a porovnání metod detekce schistosom v mezihostiteli, str. 12) detekce parazitů v hostiteli nezávisle na tom, zda produkuje vajíčka. Díky jejich vysoké senzitivitě (Pontes *et al.*, 2002, 2003; Cnops *et al.*, 2013) a využití pro široké spektrum vstupního materiálu (Wichmann *et al.*, 2009; Enk *et al.*, 2010, 2012; Ibranke *et al.*, 2011) jsou jedny z nejrychleji se rozvíjejících diagnostických metod. Jejich nevýhodou jsou však vysoké nároky na speciální vybavení, chemikálie a školený personál (viz Tabulka 4).

Imunologické metody

Metody detekce protilátek tvořených proti schistosomám v obratlovčím hostiteli mohou být účinné při druhové determinaci, jsou schopny zachytit protilátky i v prepatentní fázi infekce hostitele a díky později vyvinutým postupům (ELISA, IFA) se vyznačují i vysokou senzitivitou a specifitou. Základní metody jako COPT a CHR mohou sloužit k diagnostice na velkém počtu pacientů, avšak jsou oproti koprologickým metodám časově velmi náročné (Gomes *et al.*, 2014). Obecně se však ukazuje, že detekce protilátek s sebou nese spoustu problémů, jako např. pozitivní nálezy i léta po prodělaném a vyléčeném onemocnění nebo zkřížené reakce (Weerakoon *et al.*, 2015)

Do popředí se proto nyní dostávají spíše metody detekující parazitární antigeny. Míra specifity záleží na volbě detekovaného antigenu, může být proto velmi rozdílná (Hamilton *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2014). Nejpoužívanější metodou je ELISA, jež je velmi senzitivní, ovšem časově náročná. Oproti tomu metody založené na principu rychlostestů mohou být rychlé, avšak jejich využití v praxi musí být ještě ověřeno (viz Tabulka 4) (Stothard *et al.*, 2006; Adriko *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2014).

Tabulka 3 – Souhrn mikroskopických metod detekce schistosom v obratlovčím hostiteli

Metoda	Způsob odběru; typ vzorku	Výhody	Nevýhody
Kopromikroskopické metod † platí u všech mikroskopických metod *Rozdíl oproti Kato-Katzově metodě			
Kato-Katzova metoda	Intravitálně; čerstvé výkaly	- nízká cena - nízká časová náročnost - široce využíváno - zaznamenání i jiný druhů parazitů - nízké nároky na vybavení	- obtížná druhová determinace† - nízká senzitivita a specifita
Formol-etherová metoda	Intravitálně; fixované výkaly, moč	- nízká cena - zvýšená senzitivita - zaznamenání i jiných druhů parazitů	- využití nebezpečných chemikálií - využití centrifugy - vyšší časová náročnost*
FLOTAC	Intravitálně; fixované výkaly, moč	* rychlé zpracování velkého množství vzorku * vysoká senzitivita	- využití nebezpečných chemikálií - využití centrifugy - nutnost využití speciálních komponent - vyšší časová náročnost
Mini-FLOTAC	Intravitálně; fixované výkaly, moč	- není nutná centrifugace - dobrá senzitivita - nízká časová náročnost - zaznamenání i jiných druhů parazitů	- nutnost speciálních komponent
Filtrační metody	Intravitálně; výkaly, moč	---	- nutnost sestavení filtrační aparatury - nižší senzitivita - vyšší časová náročnost
Helmitex	Intravitálně; fixované výkaly, moč	- vysoká senzitivita - možnost detekce i při nízké koncentraci vajíček	- vysoká časová náročnost - speciální vybavení (magnet, centrifuga atd.)
Líhnutí miracidíí	Intravitálně; čerstvé výkaly	* vyšší senzitivita	- nutnost viabilních vajíček - ovlivnění fyzikálními vlastnostmi vody
Pokročilé zobrazovací metody			
USG, CT, MRI	Intravitálně	- neinvazivnost	- nákladné speciální vybavení - erudice personálu - využití radioaktivního či jiného materiálu pro značení
CLSM	Intravitálně, postmortálně	- 3D zobrazení <i>in situ</i>	- nákladné speciální vybavení - erudice personálu - dosud nezavedený postup
Výplachy nasální dutiny	Intravitálně, postmortálně	- možnost detekce nasálních druhů	- nízká senzitivita
Biopsie	Intravitálně; tkáň	- rychlost provedení	- invazivnost
Pitvy obratlovčích hostitelů	postmortálně	- zaznamenání i jiných druhů parazitů - detekce infekce i v prepatentní fázi	- erudice personálu - časová náročnost - náročnost provedení

Tabulka 4 – Shrnutí molekulární a imunologických metod detekce schistosom v definitivním hostiteli

	Metoda	Způsob odběru; typ vzorku	Výhody	Nevýhody
Molekulární metody	amplifikační metody založené na PCR			<i>*rozdíl oproti Klasické PCR</i>
	PCR	Intravitálně, postmortálně; krev, sérum, plazma, výkaly, moč, mozkomíšní mok	- detekce infekce i v prepatentní fázi - druhová determinace - dobrá senzitivita a specifita	- náročnost na speciální vybavení - vysoké náklady - vysoká časová náročnost - erudice personálu
	RT PCR	dtto. PCR	* nižší časová náročnost * vysoká senzitivita a specifita	dtto. PCR
	OC PCR	dtto. PCR	- malá časová náročnost	dtto. PCR
	PCR-ELISA	dtto. PCR	- vysoká senzitivita - druhová determinace	dtto. PCR
	Ostatní amplifikační metody			
LAMP	intravitálně, postmortálně; sérum, výkaly	- vysoká senzitivita a specifita - detekce i prepatentní fáze infekce - vysoká rychlost oproti PCR - nenáročnost na vybavení - uživatelská přívětivost	- náročnost optimalizace	
Imunologické metody	<i>†platí obecně pro detekci protilátek v DH</i>			
	COPT a CHR	intravitálně; sérum	- využití ve velkém měřítku	- pozitivní výsledek detekce i po ukončené infekci † - vyšší časová náročnost
	IHA	intravitálně; sérum	- rychlost a snadné provedení - využití ve velkém měřítku	- využití zvířecích erytrocytů (pokud není jinak) - snížená specifita
	IFA	intravitálně; sérum	- dobrá senzitivita	- nutnost speciálních protilátek - erudice personálu - nároky na vybavení
	ELISA	intravitálně; moč, sérum, plazma, výkaly	- vysoká specifita a senzitivita	- nutnost speciálních protilátek - zkřížená reaktivita - časová náročnost
	MEIA	intravitálně; sérum	- vysoké procento zachycení vajíček	- využití speciálních komponent
	CCA/CAA dipstick	intravitálně; moč	- rychlé a snadné provedení - nízká cena	- nízká senzitivita - nemožnost opakovaného použití

6 Detekce schistosom ve vnějším prostředí

V životním cyklu schistosom se vyskytují stadia, která přirozeně najdeme ve vnějším prostředí, kde hledají hostitele (viz Biologie schistosom, str. 2). Jde o miracidia určená k infekci mezihostitelského vodního plže a cercárie infekční pro obratlovce. Obě tato stadia se vyskytují ve vodním prostředí, jsou pohyblivá, nepřijímají potravu a v prostředí proto vydrží naživu jen omezenou dobu. Metody detekce těchto stadií nevyžadují odchyt, vyšetřování ani manipulaci se samotnými hostiteli (Théron, 1979; Théron, 1986) s výjimkou sentinelových (Spear *et al.*, 2004).

6.1 Metodika a mechanismy detekce schistosom ve vnějším prostředí

Aktivní, živá, volně žijící stadia (konkrétně cercárie) mohou být v prostředí detekovaná např. pomocí cercáriových pastí (Shiff *et al.*, 1993), či sentinelových obratlovčích hostitelů (Spear *et al.*, 2004).

Při ověřování výskytu schistosom v prostředí je nejčastěji využívána metoda filtrace, při které pozitivní vzorek obsahuje živé, nebo čerstvě uhynulé parazity využitelné pro další mikroskopické nebo molekulární analýzy. Při použití velmi jemného filtru dochází k zachycení i volně rozptýlené environmentální DNA – tzv. eDNA, která může pocházet z uhynulých těl volně žijících stadií, ale i ze stadií parazitických, jejichž DNA se do vody dostala po úhynu hostitele (Bass *et al.*, 2015; Rudko *et al.*, 2018; Sengupta *et al.*, 2019; Alzaylae *et al.*, 2020).

6.1.1 Mikroskopické metody detekce schistosom ve vnějším prostředí

Využití cercáriových pastí

Principem detekce cercárií schistosom pomocí pastí je jejich lákání na vhodné atraktanty stimulující je k přichycení se a penetraci. Jde např. o mastné kyseliny nebo lipidy povrchu kůže, případně kyselinu linolovou a olejovou, nacházející se i v běžně dostupných rostlinných olejích (Ahmed *et al.*, 2002). Vybrané atraktanty jsou nanášeny na podložní sklička s vhodnou matrix v podobě laku na nehty nebo vosku (Shiff *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 2002). Celou aparaturu pastí pak tvoří stojan s řadou těchto sklíček, která jsou na stanovený čas (2-3 h) ponořena do vody 5-45 cm pod hladinu. Po vyjmutí a oschnutí jsou jednotlivá sklíčka kontrolována na přítomnost cercárií pod mikroskopem, případně mohou být ještě obarvena hematoxylinem. Barvení, které není selektivní pro cercárie, však při vysoké turbiditě vody s množstvím planktonu zhoršuje přehlednost vzorku (Shiff *et al.*, 1993).

Využití sentinelového hostitele

V případě lidských schistosom (konkrétně *S. japonicum*) bylo pro zjišťování aktuálního výskytu cercárií využíváno další metody detekce založené na umístění sentinelového hostitele. Myši, umístěné do klecí tak, aby jejich končetiny byly částečně ponořené pod hladinou, byly na prověřované lokalitě ponechány pět hodin; expozice byla opakována dva dny po sobě. Po šesti týdnech byly přeživší myši usmrceny a pitvány na přítomnost dospělých schistosom. Tato historická metoda se však vzhledem k

možnosti nahradit experimentální zvířata jinými metodami již nepoužívá (Spear *et al.*, 2004; Hung & Remais, 2008).

Cerkáriometrie

Metoda detekce cercárií v prostředí pomocí jejich mechanického zachycení na filtru o konkrétní hustotě se obecně nazývá jako cercáriometrie. Pokud je voda na lokalitě odebírána a filtrována zároveň např. pomocí podtlakové pumpy, jedná se o filtraci přímou (Sandt, 1973); v opačném případě o filtraci nepřímou. Vzorek vody určený pro filtraci může být rovněž před převozem do laboratoře fixován např. formalínem, aby nedocházelo k degradaci cercárií (Théron, 1979).

Vzorek vody o objemu 5-10 l je přefiltrován přes soustavu filtrů o velikosti pórů 1000 μm pro odstranění větších částic, např. zbytky rostlinného původu, 500 a 200 μm pro odfiltrování planktonu a konečně 40 μm pro zachycení samotných cercárií. Ideální volba velikosti pórů se však vždy odvíjí od velikosti zachycovaných cercárií a turbidity filtrované vody (Théron, 1979). Autor dále popisuje jako zásadní také volbu materiálu, ze kterého je filtr vyroben, přičemž vyzdvihuje výhody polyamidového filtru, který lze využít i bez připojení na vakuovou pumpu a lze ho použít opakovaně (Théron, 1979).

Koncový polyamidový filtr (40 μm), je následně vložen do Petriho misky na skleněný nanovláknový filtrační disk napuštěný barvivem (např. Light Green SF Yellowish) a přiklopen víčkem bránícímu vyschnutí. Skleněný filtr se stává oporou polyamidovému filtru, zároveň udržuje vlhkost vzorku a při vložení pod mikroskop funguje jako difuzér světla, což činí polyamidový filtr téměř neviditelný a vzorek přehlednější. Posledním krokem je vizuální detekce a určení cercárií pod světelným mikroskopem (Théron, 1979, 1986b) nebo binokulární lupou (Prentice, 1984).

6.1.2 Molekulární metody detekce schistosom ve vnějším prostředí

Molekulární metody pro detekci parazitů ve vodním prostředí (PCR, qPCR, LAMP atp.) umožňují zároveň i jejich druhovou determinaci (viz. Metody determinace schistosom, str. 5 a Molekulární metody detekce schistosom v mezipříteli (str. 10). Materiálem pro ně je DNA parazita získaná při cercáriometrii či při filtraci vody umožňující zachycení přímo fragmentů eDNA parazita. Metody analýzy eDNA jsou pak v poslední době kombinovány s metodou klasického sběru plžů a stimulace vylučování cercárií (viz Stimulace plžů k vylučování cercárií, str. 9), přičemž filtrovaným vzorkem není voda z lokality, ale voda z nádoby s vyšetřovanými plži (Alzaylae *et al.*, 2020).

Molekulární cercáriometrie

Se vzrůstajícími požadavky na zvyšování senzitivity a specifity detekčních metod byla původní metoda cercáriometrie (viz výše) postupně modifikována. Využití základního principu filtrace bylo zachováno, ale k samotné detekci dochází místo mikroskopických metod metodami molekulárními. Pohyb vody přes filtrační aparát je zajištěn buď přirozeně (u tekoucích vod) nebo je voda nasávána pomocí sifonu (u stojatých vod). Tato metodika byla původně navržena pro detekci druhu *S. japonicum*, proto byly vzorky vody sbírány u hladiny. Při sběru pomocí sifonu byl sbírán vzorek o velikosti 16 l,

zatímco při sběru z tekoucích vod byl filtrovaný objem odhadován pouze na základě známé plochy filtru a průtoku vody (Aoki *et al.*, 2003; Worrell *et al.*, 2011).

Pro studie zabývající se detekcí původců cercáriové dermatitidy byla metoda dále upravována do podoby nepřímé filtrace. Při ní se 25l vzorek vody sebrané z hladiny v příbřežím pásmu nejprve přímo na lokalitě přefiltruje přes planktonní síť o velikosti ok 20 μm a zakoncentruje se do objemu 50 ml. Vzorek v této podobě je následně v laboratoři pomocí vývěvy přefiltrován přes velmi jemný filtr (velikost ok 0,45 μm) pro zachycení DNA včetně jejích fragmentů, a následně analyzován molekulárními metodami (Rudko *et al.*, 2018).

Detekce eDNA

Všechny dříve popsané filtrační metody byly nastaveny tak, aby byla na lokalitě zachycena živá, případně čerstvě uhynulá volně žijící stadia schistosom ve vodě. Pro detekci schistosom jsou však nově aplikovány metody původně využívané např. v ekologických či fylogenetických studiích (Bass & Cavalier-Smith, 2004; Bass *et al.*, 2015). Odběr vzorků pro detekci parazitů ve vodním prostředí probíhá ze tří různých stanovišť na jedné lokalitě pomocí tří plastových lahví o objemu 500-600 ml. Tyto lahve jsou při převozu do laboratoře chlazeny a k samotné filtraci dochází pouze několik hodin po odběru vzorku (Hashizume *et al.*, 2017). Pro zachycení eDNA je však potřeba volit mnohem hustší filtry (obvykle skleněné nanovláknové) o velikosti ok 0,7 μm (Sato *et al.*, 2018) nebo dokonce 0,2 μm (Sengupta *et al.*, 2019). Filtr se zachyceným materiálem pro analýzu eDNA může být následně fixován v ethanolu a zamrazen (Sato *et al.*, 2018). Další analýza vzorku na filtru probíhá pomocí molekulárních metod. Při detekci schistosom nejčastěji cílí navrhované primery na krátký úsek sekvence genu pro mitochondriální cytochrom c oxidázu I. Tyto sekvence jsou amplifikovány a detekovány pomocí qPCR, popřípadě může být materiál z filtrů osekvenován pro spolehlivější druhové určení (Sato *et al.*, 2018; Sengupta *et al.*, 2019).

6.2 Limity a porovnání metod detekce schistosom ve vnějším prostředí

Mikroskopické metody

Při využití cercáriových pastí není zapotřebí drahé vybavení nebo chemikálie, jako atraktanty lze využít i běžně dostupné rostlinné oleje (Ahmed *et al.*, 2002). Vzhledem k nízké rozpustnosti atraktantů ve vodě a statickému umístění pastí je při sledování větších ploch nutné použít více pastí. Samotné vyšetřování jednotlivých sklíček je zdlouhavé a komplikuje ho přítomnost rušivých objektů z vody, které znesnadňují hledání cercárií (lze omezit vynecháním barvicího kroku). Nejzásadnější problém však spočívá v tom, že bližší určení cercárií je při této metodě takřka nemožné kvůli deformacím při zpracování i faktu, že zcela chybí informace o tom, který plž cercárie vyloučil. Alternativě by i tato metoda mohla sloužit pro sběr materiálu pro molekulární metody (Shiff *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 2002; Kamel *et al.*, 2021).

Využití sentinelových hostielů pro detekci lidských schistosom (Spear *et al.*, 2004) je časově a logisticky náročné nehledě na etické problémy spojené s využitím pokusných zvířat tam, kde existují

jiné možnosti (Hung & Remais, 2008). K určení pozitivního nálezu je využíváno pitev se zaměřením na přítomnost dospělce. Výsledek pitvy je tak znám až po několika týdnech péče o sentinelová zvířata (Spear *et al.*, 2004; Worrell *et al.*, 2011).

Mikroskopické metody založené na filtraci vody z prověřované lokality jsou výhodné ve svou jednoduchost a tedy i snadné použití v terénu. Filtrační aparát pro cercáriometrii je navíc lehký a snadno přenositelný – při zvolení vhodného filtru a prefiltrační řady sít pro odstranění větších částic není potřeba ani podtlakové pumpy. Významný problém pro filtraci vody však představuje množství pevných částic rozptýlených ve vodním sloupci. Théron (1979) sice uvádí funkčnost odběrové aparatury bez pumpy až do turbidity vody 200 JTU („Jackson turbidity unit“, Jacksonovy jednotky kalnosti). Čitelnost vzorku při hodnocení pod mikroskopem však bývá množstvím zachycených částic výrazně negativně ovlivněna. Filtrace při vysokém zákalu rovněž způsobuje ucpání filtru a znemožňuje tak filtraci předem stanoveného objemu vody. Filtrace navíc probíhá pomaleji, což může umožnit cercáriím protlačit se skrz oka filtru a uniknout detekci (Prentice, 1984).

Účinnost všech metod založených na filtraci je ovlivňována mnoha faktory, které je třeba při plánování odběrů vody brát v úvahu. Denzita cercárií ve vodě je např. nejvyšší těsně po optimální době pro jejich vyloučení, a do této doby je třeba cílit i plánovaný odběr vody (Théron *et al.*, 1986). Svoji roli hraje i zda je vzorek vody odebrán z povrchu či z hloubky, případně z návětrného či opačného břehu nádrže. Cercáriometrickou analýzu je vždy snazší provádět v tekoucích vodách. Cercárie jsou totiž odplavovány proudem stejným směrem, jejich drift v konkrétním časovém úseku je tedy snadno definovatelný (cercárie/litr/hodina). Ve stojatých vodách může dojít k náhodnému rozprostření cercárií po nádrži, detekce a kvantifikace je proto ztížená. V porovnání s klasickými metodami sběru plžů však mohou mít filtrační postupy i určité výhody: Dokážou odhalit lokality s nízkými denzitami cercárií, a to i bez hledání plžů (Théron *et al.*, 1979) Jako všechny mikroskopické metody jsou i ty filtrační velmi limitované, co se týče určování druhové příslušnosti, jež probíhá pouze na základě morfologických znaků (Théron, 1986a; Aoki *et al.*, 2003). Vzhledem k tomu, že při cercáriometrii obvykle není znám mezihostitel, nelze schistosomy určovat ani na základě mezihostitelské specifity. Nicméně metoda umožňuje využití cercárií zachycených na filtru i pro následnou molekulární determinaci.

Molekulární metody

Největší výhodou molekulárních metod je možnost vysoce citlivé detekce a přesné druhové determinaceschistosom. I zde je však jedním z limitujících kroků úspěšná filtrace (viz cercáriometrie), která je tím složitější, čím hustší je použitý filtr. Přímá filtrace pro analýzu eDNA tak často ani neumožňuje filtraci předem stanoveného objemu vody kvůli ucpávání filtru.

Další nevýhodou spojovanou s metodami analýzy eDNA je chybějící mikroskopická kontrola zachyceného parazita, což znesnadňuje interpretaci výsledků. Parazitární eDNA bude totiž zachycena vždy, pokud se na lokalitě vyskytne daný parazit v jakémkoli stadiu vývoje. To však nutně nemusí znamenat, že je lokalita riziková, co se týká uzavření životního cyklu, nebo nebezpečí pro

člověka. Může jít např. o situace, kdy se na lokalitě bez vhodného MH vyskytují pouze miracidia schistosom z DH. Paraziti pak na lokalitě nejsou schopni dalšího vývoje a tedy ani vzniku stádií infekčních pro obratlovce. Výstupy eDNA analýz je tedy potřeba uvážlivě interpretovat pouze jako přítomnost či nepřítomnost parazitární eDNA, které však nutně neznamená rizikovost analyzované lokality z hlediska lidského zdraví (Sengupta *et al.*, 2019).

Zmíněný nedostatek by mohl být částečně řešen souběžnou analýzou vzorku eDNA nejen na přítomnost konkrétních parazitů, ale i jejich mezipřenositelů. Fakt, že eDNA zůstává uchovávána v prostředí po dlouhou dobu bez přítomnosti hledaného organismu (Levy-Booth *et al.*, 2007) a z toho vyplývající falešné pozitivita vzorku, je místem pro budoucí optimalizaci metody.

Tabulka 5 – Souhrnutí mikroskopických a molekulárních metod detekce schistosom v prostředí

	metoda	Způsob odběru; typ vzorku	výhody	nevýhody
Mikroskopie	†platí u všech metod zachycujících cercárie			
	Cerkáriometrie	filtrace; cercárie	- nízké náklady - mobilní aparatura - rychlost oděru vzorku oproti sběru plůžů†	- výsledek ovlivněn dobou sběru a distribucí cercárií na lokalitě† - ucpávání filtru při vysoké turbiditě vody
	Odchyt pomocí pastí	pasti; cercárie	- nízké náklady - možná detekce i při vyšší turbiditě vody než u cercáriometrie	- omezený dosah, nízká senzitivita - náročná druhová optimalizace - nízké procento zachycení cercárií
	Využití sentinelového hostitele	napadení hostitele; cercárie	- možná detekce i při vysoké turbiditě vody - dlouhé čekání na výsledek	- etická stránka - časová náročnost - komplikovaná logistika - omezená škála detekovatelných druhů
Molekulární metody	Molekulární cercáriometrie	filtrace; cercárie	- přesná druhová determinace - vyšší senzitivita než mikroskopická cercáriometrie	- ucpávání filtru při vysoké turbiditě vody - výsledek ovlivněn dobou sběru a distribucí cercárií na lokalitě - vyšší časová náročnost spojená s molekulární analýzou† - přítomnost PCR inhibitorů ve vodě z lokality - zachycení i neinfekčních stádií, falešná pozitivita
	Detekce eDNA	filtrace; eDNA	- vysoká senzitivita a specifita - přesná druhová determinace - rychle se rozvíjející metoda	- ucpávání filtru při vysoké turbiditě vody - nutnost optimalizace - zachycení i neinfekčních stádií, falešná pozitivita - náročná interpretace výsledků analýzy

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout a porovnat detekční a diagnostické metody využívané při sledování výskytu motolic čeledi Schistosomatidae v mezihostiteli, obratlovčím hostiteli a ve vnějším prostředí. Předkládaný text je přehledem známých metod, diskutuje jejich výhody, nevýhody a limity usnadňující relevantní výběr vhodných metodických nástrojů při plánování budoucí vlastní experimentální práce. Důležitá kritéria hodnocení jednotlivých metod byla následující: senzitivita (schopnost zachytit schistosomy i při nízké prevalenci nebo intenzitě infekce), specifita, možnost druhové determinace, časová a finanční náročnost i procesivita (počet zpracovaných vzorků za čas).

Nejstarší, nicméně stále využívané detekční, diagnostické a rovněž úzce související determinační postupy jsou ty využívající mikroskopické metody. Nevýhody v podobě nízké senzitivity a obtížné druhové determinace jsou vyváženy jednoduchostí provedení a nízkými náklady. Významné zvýšení senzitivity, procesivity a zpřesnění druhové determinace přinesly rozvíjející se molekulárně-biologické či imunologické metody. Obě jsou však nákladnější než metody mikroskopické. Z velké části je jejich využití vázáno spíše na vědecká pracoviště, ačkoli některé se již dostávají mezi postupy rutinně využívané diagnostickými laboratořemi. S rozvojem nových metod se do budoucna počítá i s dalším zefektivněním monitoringu výskytu schistosom, a to jak lidských působících schistosomózu, tak ptačích, které u lidí vyvolávají cercáriovou dermatitidu.

V současné době je největší pozornost upírána k metodám detekce schistosom v prostředí, zejména pak k zachycení eDNA ve vodním prostředí, které umožňují potvrdit přítomnost parazitů na prověřované lokalitě i bez sběru a vyšetřování hostitelů. Tyto metody jsou zatím aplikovány zejména při detekci lidských schistosom – jejich optimalizace pro ptačí druhy způsobující cercáriovou dermatitidu bude spolu s porovnáním efektivity oproti postupům tradičně využívaným v podmínkách ČR náplní navazující diplomové práce.

8 Seznam citované literatury

- Abath, F. g. c., Melo, F. I., Werkhauser, R. p., Montenegro, L., Montenegro, R. a Schindler, H. c. (2002)** ‘Single-Tube Nested PCR Using Immobilized Internal Primers’, *BioTechniques*, 33(6), s. 1210–1214.
- Abath, F. G., Gomes, A. L. do V., Melo, F. L., Barbosa, C. S. a Werkhauser, R. P. (2006)** ‘Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection’, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, s. 145–148.
- Abbasi, I., King, C. H., Muchiri, E. M. a Hamburger, J. (2010)** ‘Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: identification of infected snails from early prepatency’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), s. 427–432.
- Adriko, M., Standley, C. J., Tinkitina, B., Tukahebwa, E. M., Fenwick, A., Fleming, F. M., Sousa-Figueiredo, J. C., Stothard, J. R. a Kabatereine, N. B. (2014)** ‘Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda’, *Acta Tropica*, 136, s. 50–57.
- Ahmed, A. A. M., Babiker, A., Eltash, L. A. a Shiff, C. (2002)** ‘Development of a modified baited trap for detection of schistosome cercariae using natural oils rich in polyunsaturated fatty acids in Sudan’, *Acta Tropica*, 82(3), s. 363–368.
- Akinwale, O. P., Laurent, T., Mertens, P., Leclipteux, T., Rollinson, D., Kane, R., Emery, A., Ajayi, M. B., Akande, D. O. a Fesobi, T. W. (2008)** ‘Detection of schistosomes polymerase chain reaction amplified DNA by oligochromatographic dipstick’, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(2), s. 167–170.
- Alba, A., Hernández, H. M., Marcet, R., Gil, A. L., Vázquez, A. A., Figueredo, M., Sánchez, J., Garay, H. E. a Sarracent, J. (2014)** ‘Exploring the antigenic features of *Fasciola hepatica* rediae (Trematoda: Digenea) through the evaluation of different antigenic candidates for further monoclonal antibody generation’, *Parasitology Research*, 113(9), s. 3185–3193.
- Alberts, B. (ed.) (2008)** *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science.
- Aldhoun, J. A., Faltýnková, A., Karvonen, A. a Horák, P. (2009)** ‘Schistosomes in the North: A unique finding from a prosobranch snail using molecular tools’, *Parasitology International*, 58(3), s. 314–317.
- Al-Jubury, A., Bygum, A., SusannaTracz, E., Koch, C. N. a Buchmann, K. (2021)** ‘Cercarial Dermatitis at Public Bathing Sites (Region Zealand, Denmark): A Case Series and Literature Review’, *Case Reports in Dermatology*, s. 360–365.
- Allen, A. V. a Ridley, D. S. (1970)** ‘Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites’, *Journal of Clinical Pathology*, 23(6), s. 545–546.
- Alzaylae, H., Collins, R. A., Shechonge, A., Ngatunga, B. P., Morgan, E. R. a Genner, M. J. (2020)** ‘Environmental DNA-based xenomonitoring for determining *Schistosoma* presence in tropical freshwaters’, *Parasites & Vectors*, 13(1), p. 63.
- Andrade, Z. A. (2009)** ‘Schistosomiasis and liver fibrosis’, *Parasite Immunology*, 31(11), s. 656–663.
- Aoki, Y., Sato, K., Muhoho, N. D., Noda, S. a Kimura, E. (2003)** ‘Cercariometry for detection of transmission sites for schistosomiasis’, *Parasitology International*, 52(4), s. 403–408.
- Ashrafi, K. a Brant, S. (2020)** ‘An efficient method for collecting the full-length adults, fragments, and eggs of *Trichobilharzia* spp. from the liver of definitive hosts’, *Parasitology Research*, 119(3), s. 1167–1172.
- Bakuza, J. S., Gillespie, R., Nkwengulila, G., Adam, A., Kilbride, E. a Mable, B. K. (2017)** ‘Assessing *S. mansoni* prevalence in *Biomphalaria* snails in the Gombe ecosystem of western Tanzania: the importance of DNA sequence data for clarifying species identification’, *Parasites & Vectors*, 10(1), p. 584.
- Barda, B. D., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo, F., Sadutshang, T., Cringoli, G., Clementi, M. a Albonico, M. (2013)** ‘Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field’, *PLoS neglected tropical diseases*, 7(8), p. e2344.
- Bass, D. a Cavalier-Smith, T. (2004)** ‘Phylum-specific environmental DNA analysis reveals remarkably high global biodiversity of Cercozoa (Protozoa)’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), s. 2393–2404.
- Bass, D., Stentiford, G. D., Littlewood, D. T. J. a Hartikainen, H. (2015)** ‘Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology’, *Trends in Parasitology*, 31(10), s. 499–513.

- Bell, D. R. (1963)** 'A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces: with special reference to therapeutic trials', *Bulletin of the World Health Organization*, 29, s. 525–530.
- Bilharz, T. (1856)** '*Distomum haematobium*, und sein Verhältniss zu gewissen pathologischen Veränderungen der menschlichen Harnorgane', *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 6(4), s. 49–52.
- Born-Torrijos, A., Poulin, R., Raga, J. a Holzer, A. (2014)** 'Estimating trematode prevalence in snail hosts using a single-step duplex PCR: how badly does cercarial shedding underestimate infection rates?', *Parasites & Vectors*, 7(1), s. 243.
- Cai, P., Weerakoon, K. G., Mu, Y., Olveda, R. M., Ross, A. G., Olveda, D. U. a McManus, D. P. (2019)** 'Comparison of Kato Katz, antibody-based ELISA and droplet digital PCR diagnosis of schistosomiasis japonica: Lessons learnt from a setting of low infection intensity', *PLoS neglected tropical diseases*, 13(3), p. e0007228.
- Candido, R. R. F., Morassutti, A. L., Graeff-Teixeira, C., St. Pierre, T. G. a Jones, M. K. (2018)** 'Exploring Structural and Physical Properties of Schistosome Eggs: Potential Pathways for Novel Diagnostics?', in *Advances in Parasitology*. Elsevier, s. 209–237.
- Caron, Y., Rondelaud, D. a Losson, B. (2008)** 'The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp', *Parasitology Research*, 103(4), s. 735–744.
- Carvalho do Espírito-Santo, M. C., Pinto, P. L., Gargioni, C., Alvarado-Mora, M. V., Pagliusi Castilho, V. L., Pinho, J. R. R., de Albuquerque Luna, E. J. a Borges Grysczek, R. C. (2014)** 'Detection of *Schistosoma mansoni* antibodies in a low-endemicity area using indirect immunofluorescence and circumoval precipitin test', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(6), s. 1146–1152.
- CDC - DPDx - Cercarial Dermatitis (2019)**. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/dpdx/cercarialdermatitis/index.html> (citováno dne: 19.7. 2021).
- CDC - Schistosomiasis - Biology (2019)**. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html> (citováno dne: 13.7.2021).
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. a Caskey, C. T. (1988)** 'Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification', *Nucleic Acids Research*, 16(23), s. 11141–11156.
- Choubisa, S. L., Sheikh, Z. a Jaroli, V. J. (2012)** 'Histopathological effects of larval trematodes on the digestive gland of freshwater snail species, *Vivipara bengalensis* and *Lymnaea acuminata*', *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 36(2), s. 283–286.
- Chu, K. Y. a Dawood, I. K. (1970)** 'Cercarial Production from *Biomphalaria alexandrina* Infected with *Schistosoma mansoni*', *Bulletin of the World Health Organization*, 42(4), s. 569–574.
- Cipriani, P., Mattiucci, S., Paoletti, M., Scialanca, F. a Nascetti, G. (2011)** 'Molecular evidence of *Trichobilharzia franki* Müller and Kimmig, 1994 (Digenea: Schistosomatidae) in *Radix auricularia* from Central Italy', *Parasitology Research*, 109(3), s. 935–940.
- Claugher, D. (1960)** 'The Transport and Laboratory Culture of Snail Intermediate Hosts of *Schistosoma Haematobium*', *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 54(3), s. 333–337.
- Cnops, L., Soentjens, P., Clerinx, J. a Esbroeck, M. V. (2013)** 'A *Schistosoma haematobium*-Specific Real-Time PCR for Diagnosis of Urogenital Schistosomiasis in Serum Samples of International Travelers and Migrants', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(8), p. e2413.
- Coelho, P. M. Z., Jurberg, A. D., Oliveira, Á. A. a Katz, N. (2009)** 'Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5), s. 720–723.
- Correia M. C., Domingues A. L. C., Lacerda H. R., Santo E. M., Machado C. G.F. (2009)**, 'Platelet function and the von Willebrand factor antigen in the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(10), s. 1053–1058
- Cort, W. W. (1922)** 'A Study of the Escape of Cercariae from Their Snail Hosts', *The Journal of Parasitology*, 8(4), s. 177–184.
- Coustau, C. (2009)** 'Arche de Noé immunologique - Immunité des mollusques vecteurs de parasites humains', *médecine/sciences*, 25(4), s. 399–403.
- Cringoli, G. (2006)** 'FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique', *Parassitologia*, 48(3), s. 381–384.

- Cringoli, G., Maurelli, M. P., Levecke, B., Bosco, A., Vercruyse, J., Utzinger, J. a Rinaldi, L. (2017) 'The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals', *Nature Protocols*, 12(9), s. 1723–1732.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M. P. a Utzinger, J. (2010) 'FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans', *Nature Protocols*, 5(3), s. 503–515.
- van Dam, G. J., Wichers, J. H., Ferreira, T. M. F., Ghati, D., van Amerongen, A. a Deelder, A. M. (2004) 'Diagnosis of Schistosomiasis by Reagent Strip Test for Detection of Circulating Cathodic Antigen', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), s. 5458–5461.
- De, N. V., La, T., Minh, P. N., Dao, P. T. B. a Duyet, L. V. (2019) 'Detection of four patients who were infected by *Schistosoma haematobium* in Vietnam', *Infection and Drug Resistance*, 12, s. 439–445.
- Deborggraeve, S., Claes, F., Laurent, T., Mertens, P., Leclipteux, T., Dujardin, J. C., Herdewijn, P. a Büscher, P. (2006) 'Molecular Dipstick Test for Diagnosis of Sleeping Sickness', *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), s. 2884–2889.
- Doanh, P. N., Tu, L. A., Van Hien, H., Van Duc, N., Horii, Y., Blair, D. a Nawa, Y. (2018) 'First intermediate hosts of *Paragonimus* spp. in Vietnam and identification of intramolluscan stages of different *Paragonimus* species', *Parasites & Vectors*, 11(1), p. 328.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P. a Rondelaud, D. (2005) '*Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France', *Parasitology Research*, 95(4), s. 278–282.
- Dvořák, J., Vaňáčková, Š., Hampl, V., Flegr, J. a Horák, P. (2002) 'Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences', *Parasitology*, 124(3), s. 307–313.
- Elbaz, T. a Esmat, G. (2013) 'Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review', *Journal of Advanced Research*, 4(5), s. 445–452.
- Engvall, E. a Perlmann, P. (1972) 'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes', *The Journal of Immunology*, 109(1), s. 129–135.
- Enk, M. J., Oliveira E Silva, G. a Rodrigues, N. B. (2010) 'A salting out and resin procedure for extracting *Schistosoma mansoni* DNA from human urine samples', *BMC research notes*, 3, p. 115.
- Enk, M. J., Oliveira e Silva, G. a Rodrigues, N. B. (2012) 'Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area', *PloS One*, 7(6), p. e38947.
- Fagundes Teixeira, C., Neuhauss, E., Ben, R., Romanzini, J. a Graeff-Teixeira, C. (2007) 'Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field', *PLoS neglected tropical diseases*, 1(2), p. e73.
- Faltýnková, A., Našincová, V. a Kablášková, L. (2007) 'Larval trematodes (Digenea) of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.), (Gastropoda, Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification', *Parasite*, 14(1), s. 39–51.
- Farley, J. (1971) 'A Review of the Family Schistosomatidae: excluding the Genus *Schistosoma* from Mammals', *Journal of Helminthology*, 45(4), s. 289–320.
- Favero, V., Frasca Candido, R. R., De Marco Verissimo, C., Jones, M. K., St Pierre, T. G., Lindholz, C. G., Da Silva, V. D., Morassutti, A. L. a Graeff-Teixeira, C. (2017) 'Optimization of the Helminx method for schistosomiasis diagnosis', *Experimental Parasitology*, 177, s. 28–34.
- Fernández-Soto, P., Gandasegui Arahuetes, J., Sánchez Hernández, A., López Abán, J., Vicente Santiago, B. a Muro, A. (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), p. e3126.
- File, S., Francheschini, A. B. a Fernandez-santiago, A. (1998) 'Short Report: A Case of Ectopic Schistosomiasis in Puerto Rico with Some Observations on the Biology of the Parasite', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(5), s. 671–672.
- Frandsen, F. a Christensen, N. Ø. (1984) 'An introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance', *Acta tropica*, 41(2), s. 181–202.

- Fritzsche, C., Stachs, O., Holtfreter, M. C., Nohr-Luczak, C., Guthoff, R. F. a Reisinger, E. C. (2012)** ‘Confocal laser scanning microscopy, a new in vivo diagnostic tool for schistosomiasis’, *PloS One*, 7(4), s. e34869.
- Fuss, A., Mazigo, H. D. a Mueller, A. (2020)** ‘Malacological survey to identify transmission sites for intestinal schistosomiasis on Ijinga Island, Mwanza, north-western Tanzania’, *Acta Tropica*, 203, p. 105289.
- Gan, S. D. a Patel, K. R. (2013)** ‘Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay’, *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), s. 1–3.
- Gandasegui, J., Fernández-Soto, P., Hernández-Goenaga, J., López-Abán, J., Vicente, B. a Muro, A. (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), p. e0005225.
- Glinz, D., Silué, K. D., Knopp, S., Lohourignon, L. K., Yao, K. P., Steinmann, P., Rinaldi, L., Cringoli, G., N’Goran, E. K. a Utzinger, J. (2010)** ‘Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths’, *PLoS neglected tropical diseases*, 4(7), p. e754.
- Gomes, L. I., Dos Santos Marques, L. H., Enk, M. J., de Oliveira, M. C., Coelho, P. M. Z. a Rabello, A. (2010)** ‘Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of schistosoma infection in feces’, *PLoS neglected tropical diseases*, 4(4), p. e664.
- Gomes, L. I., Enk, M. J. a Rabello, A. (2014)** ‘Diagnosing schistosomiasis: where are we?’, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, s. 3–11.
- Haas, W. (1994)** ‘Physiological analyses of host-finding behaviour in trematode cercariae: adaptations for transmission success’, *Parasitology*, 109(S1), s. S15–S29.
- Hamburger, J., Abbasi, I., Kariuki, C., Wanjala, A., Mzungu, E., Mungai, P., Muchiri, E. a King, C. H. (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), s. 344–351.
- Hamburger, J., Abbasi, I., Ramzy, R. M., Jourdane, J. a Ruppel, A. (2001)** ‘Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65, s.907–911’.
- Hamburger, J., Hoffman, O., Kariuki, H. C., Muchiri, E. M., Ouma, J. H., Koech, D. K., Sturrock, R. F. a King, C. H. (2004)** ‘Large-scale, polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snail infection.’, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71(6), s. 765–773.
- Hamburger, J., Weil, M., Anton, M. a Turetzky, T. (1989)** ‘*Schistosoma mansoni* antigens recognized in *Biomphalaria glabrata* hemolymph by monoclonal antibodies’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(6), s. 605–612.
- Hamburger, J., Weil, M., Turetzky, T., Ouma, J. H., Koech, D. K., Klumpp, R., Siongok, T. K. a Sturrock, R. F. (1989)** ‘Identification of snails infected with schistosomes by ELISA employing monoclonal antibodies: *Schistosoma mansoni* in laboratory snails (*Biomphalaria glabrata*) and in field snails (*Biomphalaria pfeifferi*) from Kenya’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(6), s. 613–619.
- Hamilton, J. V., Klinkert, M. a Doenhoff, M. J. (1999)** ‘Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods’, *Parasitology*, 117(7), s. 41–57.
- Hanelt, B., Adema, C. M., Mansour, M. H. a Loker, E. S. (1997)** ‘Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* Using Nested PCR’, *The Journal of Parasitology*, 83(3), s. 387–394.
- Härter, G., Frickmann, H., Zenk, S., Wichmann, D., Ammann, B., Kern, P., Fleischer, B., Tannich, E. a Poppert, S. (2014)** ‘Diagnosis of neuroschistosomiasis by antibody specificity index and semi-quantitative real-time PCR from cerebrospinal fluid and serum’, *Journal of Medical Microbiology*, 63(2), s. 309–312.
- 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.

- Hinz, R., Schwarz, N. G., Hahn, A. a Frickmann, H. (2017)** ‘Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review’, *Molecular and Cellular Probes*, 31, s. 2–21.
- Holtfreter, M. C., Stachs, O., Reichard, M., Loebermann, M., Guthoff, R. F. a Reisinger, E. C. (2011)** ‘Confocal Laser Scanning Microscopy for Detection of *Schistosoma mansoni* Eggs in the Gut of Mice’, *PLOS ONE*, 6(4), p. e18799.
- Horák, P., Kolářová, L. a Adema, C., M. (2002)** ‘Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*’, in *Advances in Parasitology*. Elsevier, s. 155–233.
- Hung, Y. W. a Remais, J. (2008)** ‘Quantitative detection of *Schistosoma japonicum* cercariae in water by real-time PCR’, *PLoS neglected tropical diseases*, 2(11), s. e337.
- Ibironke, O. A., Phillips, A. E., Garba, A., Lamine, S. M. a Shiff, C. (2011)** ‘Diagnosis of *Schistosoma haematobium* by detection of specific DNA fragments from filtered urine samples’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(6), s. 998–1001.
- Inpankaew, T., Schär, F., Khieu, V., Muth, S., Dalsgaard, A., Marti, H., Traub, R. J. a Odermatt, P. (2014)** ‘Simple fecal flotation is a superior alternative to quadruple Kato Katz smear examination for the detection of hookworm eggs in human stool’, *PLoS neglected tropical diseases*, 8(12), p. e3313.
- Islam, K. S. (1986)** ‘The morphology and life-cycle of *Trichobilharzia arcuata* n. sp. (Schistosomatidae: Bilharziellinae) a nasal schistosome of water whistle ducks (*Dendrocygna arcuata*) in Australia’, *Systematic Parasitology*, 8(2), s. 117–128.
- Jannotti-Passos, L. K., Magalhães, K. G., Carvalho, O. S. a Vidigal, T. H. D. A. (2006)** ‘Multiplex PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae)’, *The Journal of Parasitology*, 92(2), s. 401–403.
- Jannotti-Passos, L., Vidigal, T. H. D. A., Dias-Neto, E., Pena, S., Simpson, A., Dutra, W., Souza, C. a Carvalho-Parra, J. (1997)** ‘PCR Amplification of the Mitochondrial DNA Minisatellite Region to Detect *Schistosoma mansoni* Infection in *Biomphalaria glabrata* Snails’, *The Journal of parasitology*, 83, s. 395–9.
- Joof, E., a rus, P. S., Sowunmi, K., Onyango, V. M. a Wade, C. M. (2020)** ‘Comparing PCR techniques against conventional cercarial shedding methods for detecting *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria* snails’, *Acta Tropica*, 212, p. 105716.
- Jurberg, A. D., Gonçalves, T., Costa, T. A., de Mattos, A. C. A., Pascarelli, B. M., de Manso, P. P. A., Ribeiro-Alves, M., Pelajo-Machado, M., Peralta, J. M., Coelho, P. M. Z. a Lenzi, H. L. (2009)** ‘The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system’, *Development Genes and Evolution*, 219(5), s. 219–234.
- Jurberg, A. D., Oliveira, A. A. de, Lenzi, H. L. a Coelho, P. M. Z. (2008)** ‘A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis’, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), s. 112–114.
- Kaewkes, S., Kaewkes, W., Boonmars, T. a Sripa, B. (2012)** ‘Effect of light intensity on *Opisthorchis viverrini* cercarial shedding levels from *Bithynia* snails — A preliminary study’, *Parasitology International*, 61(1), s. 46–48.
- Kamel, B., Laidemitt, M. R., Lu, L., Babbitt, C., Weinbaum, O. L., Mkoji, G. M. a Loker, E. S. (2021)** ‘Detecting and identifying *Schistosoma* infections in snails and aquatic habitats: A systematic review’, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(3), p. e0009175.
- Kane, R. A., Stothard, J. R., Rollinson, D., Leclipteux, T., Evraerts, J., Standley, C. J., Allan, F., Betson, M., Kaba, R., Mertens, P. a Laurent, T. (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), s. 241–249.
- Kato-Hayashi, N., Yasuda, M., Yuasa, J., Isaka, S., Haruki, K., Ohmae, H., Osada, Y., Kanazawa, T. a Chigusa, Y. (2013)** ‘Use of Cell-Free Circulating Schistosome DNA in Serum, Urine, Semen, and Saliva To Monitor a Case of Refractory Imported Schistosomiasis Hematobia’, *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), s. 3435–3438.
- Katz, N., Chaves, A. a Pellegrino, J. (1971)** ‘A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*’, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14, s. 397–400.

- Kolářová, L., Horák, P. a Skírnisson, K. (2010)** ‘Methodical approaches in the identification of areas with a potential risk of infection by bird schistosomes causing cercarial dermatitis’, *Journal of Helminthology*, 84(3), s. 327–335.
- Komiya, Y. a Kobayashi, A. (1966)** ‘Evaluation of Kato’s Thick Smear Technic with a Cellophane Cover for Helminth Eggs in Feces’, *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 19(1), s. 59–64.
- Latchumikanthan, A., Pothiappan, P., Ilayabharathi, D., Das, S. S., Kumar, D. a Ilangovan, C. (2014)** ‘Occurrence of *Schistosoma nasale* infection in bullocks of Puducherry’, *Journal of Parasitic Diseases*, 38(2), s. 238–240.
- Li, Y.-L., Herter, U. a Ruppel, A. (2004)** ‘Acute, chronic and late-stage infections with *Schistosoma japonicum*: reactivity of patient sera in indirect immunofluorescence tests’, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 98(1), s. 49–57.
- Liu, Z., Zhang, L., Yang, H., Zhu, Y., Jin, W., Song, Q. a Yang, X. (2010)** ‘Magnetic microbead-based enzyme-linked immunoassay for detection of *Schistosoma japonicum* antibody in human serum’, *Analytical Biochemistry*, 404(2), s. 127–134.
- Loker, E. S., Bayne, C. J., Buckley, P. M. a Kruse, K. T. (1982)** ‘Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*’, *The Journal of Parasitology*, 68(1), s. 84–94.
- Mandahl-Barth, G. (1962)** ‘Key to the identification of east and central African freshwater snails of medical and veterinary importance’, *Bulletin of the World Health Organization*, 27, s. 135–150.
- Masi, B., Perles-Barbacaru, T.-A., Bernard, M. a Viola, A. (2020)** ‘Clinical and Preclinical Imaging of Hepatosplenic Schistosomiasis’, *Trends in Parasitology*, 36(2), s. 206–226.
- McLaren, M., Draper, C. C., Roberts, J. M., Minter-Goedbloed, E., Ligthart, G. S., Teesdale, C. H., Amin, M. A., Omer, A. H. S., Bartlett, A. a Voller, A. (1978)** ‘Studies on the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) test for *Schistosoma mansoni* infections’, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 72(3), s. 243–253.
- McManus, D. P., Dunne, D. W., Sacko, M., Utzinger, J., Vennervald, B. J. a Zhou, X.-N. (2018)** ‘Schistosomiasis’, *Nature Reviews. Disease Primers*, 4(1), p. 13
- Melo, F. L., Gomes, A. L. do V., Barbosa, C. S., Werkhauser, R. P. a Abath, F. G. C. (2006)** ‘Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis’, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(11), s. 1049–1055.
- Mesquita, S. G., Rodrigues-Luiz, G. F., Reis-Cunha, J. L., Cardoso, M. S., De Mendonça, C. L. F., Bueno, L. L., Fujiwara, R. T., Pinto, H. A., Caldeira, R. L. a Bartholomeu, D. C. (2020)** ‘A multiplex PCR protocol for rapid differential identification of four families of trematodes with medical and veterinary importance transmitted by *Biomphalaria* Preston, 1910 snails’, *Acta Tropica*, 211, p. 105655.
- Müller, V. a Kimmig, P. (1994)** ‘[*Trichobilharzia franki* n. sp.--the cause of swimmer’s dermatitis in southwest German dredged lakes]’, *Applied Parasitology*, 35(1), s. 12–31.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. a Erlich, H. (1986)** ‘Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction’, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(0), s. 263–273.
- Nelwan, M. L. (2019)** ‘Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control’, *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 91, s. 5–9.
- Neuhaus, W. (1952)** ‘Biologie und Entwicklung von *Trichobilharzia Szidati* n. sp. (Trematoda, Schistosomatidae), einem Erreger von Dermatitis beim Menschen’, *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 15(3).
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. a Kanda, H. (2015)** ‘Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects’, *Journal of Microbiology*, 53(1), s. 1–5.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. a Hase, T. (2000)** ‘Loop-mediated isothermal amplification of DNA’, *Nucleic Acids Research*, 28(12), s. e63.
- WHO (2009)** ‘Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas: report of a WHO informal consultation, Salvador, Bahia, Brazil, 18-19 August 2008’. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70127> (citováno den: 2. 8. 2021).
- Paré, J. A. a Black, S. R. (1999)** ‘Schistosomiasis in a Collection of Captive Chilean Flamingos (*Phoenicopterus chilensis*)’, *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 13(3), s. 187–191.

- Pellegrino, J. (1958)** ‘The intradermal test in the diagnosis of bilharziasis’, *Bulletin of the World Health Organization*, 18(5–6), s. 945–961.
- Podhorský, M., Hůzová, Z., Mikeš, L. a Horák, P. (2009)** ‘Cercarial dimensions and surface structures as a tool for species determination of *Trichobilharzia* spp.’, *Acta Parasitologica*, 54(1), s. 28–36.
- Pontes, L. A., Dias-Neto, E. a Rabello, A. (2002)** ‘Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces.’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(2), s. 157–162.
- Pontes, L. A., Oliveira, M. C., Katz, N., Dias-Neto, E. a Rabello, A. (2003)** ‘Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(6), s. 652–656.
- Prentice, M. A. (1984)** ‘A field-evolved differential filtration method for recovery of schistosome cercariae’, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 78(2), s. 117–127.
- Prüter, H. (2017)** ‘Having bird schistosomes in mind—the first detection of *Bilharziella polonica* (Kowalewski 1895) in the bird neural system’, *Parasitol Res*, s. 6.
- Rabello, A. L. (1992)** ‘Parasitological diagnosis of schistosomiasis mansoni: fecal examination and rectal biopsy’, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 Suppl 4, s. 325–331.
- Ridley, D. S. a Hawgood, B. C. (1956)** ‘The Value of Formol-Ether Concentration of Faecal Cysts and Ova’, *Journal of Clinical Pathology*, 9(1), s. 74–76.
- Rodriguez-Molina, R., González, J. O. a de Sala, A. R. (1962)** ‘The Circumoval Precipitin Test in *Schistosoma Mansoni*: A Study of 300 Patients’, *JAMA*, 182(10), s. 1001–1004.
- Rudko, S. P., Reimink, R. L., Froelich, K., Gordy, M. A., Blankespoor, C. L. a Hanington, P. C. (2018)** ‘Use of qPCR-Based Cercariometry to Assess Swimmer’s Itch in Recreational Lakes’, *EcoHealth*, 15(4), s. 827–839.
- Rudolfová, J., Littlewood, D. T. J., Sitko, J. a Horák, P. (2007)** ‘Bird schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland’, *Folia Parasitologica*, 54(2), s. 88–93.
- Sadun, E. H., Williams, J. S. a erson, R. I. (1960)** ‘Fluorescent Antibody Technic for Sero-diagnosis of Schistosomiasis in Humans.’, *Experimental Biology and Medicine*, 105(2), s. 289–291.
- Sandoval, N., Siles-Lucas, M., Pérez-Arellano, J. L., Carranza, C., Puente, S., López-Abán, J. a Muro, A. (2006)** ‘A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples’, *Parasitology*, 133(Pt 5), s. 581–587.
- Sandt, D. G. (1973)** ‘Direct filtration for recovery of *Schistosoma mansoni* cercariae in the field’, *Bulletin of the World Health Organization*, 48(1), s. 27–34.
- Sanpool, O., Intapan, P. M., Thanchomnang, T., Sri-Aroon, P., Lulitanond, V., Sadaow, L. a Maleewong, W. (2012)** ‘Development of a real-time PCR assay with fluorophore-labelled hybridization probes for detection of *Schistosoma mekongi* in infected snails and rat feces’, *Parasitology*, 139(10), s. 1266–1272.
- Sato, M. O., Rafalimanantsoa, A., Ramarokoto, C., Rahetilahy, A. M., Ravoniarimbina, P., Kawai, S., Minamoto, T., Sato, M., Kirinoki, M., Rasolofo, V., Calan, M. D. a Chigusa, Y. (2018)** ‘Usefulness of environmental DNA for detecting *Schistosoma mansoni* occurrence sites in Madagascar’, *International Journal of Infectious Diseases*, 76, s. 130–136.
- Schols, R., Carolus, H., Hammoud, C., Mulero, S., Mudavanhu, A. a Huyse, T. (2019)** ‘A rapid diagnostic multiplex PCR approach for xenomonitoring of human and animal schistosomiasis in a “One Health” context’, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 113(11), s. 722–729.
- Selbach, C., Soldánová, M., Feld, C. K., Kostadinova, A. a Sures, B. (2020)** ‘Hidden parasite diversity in a European freshwater system’, *Scientific Reports*, 10(1), p. 2694.
- Sengupta, M. E., Hellström, M., Kariuki, H. C., Olsen, A., Thomsen, P. F., Mejer, H., Willerslev, E., Mwanje, M. T., Madsen, H., Kristensen, T. K., Stensgaard, A.-S. a Vennervald, B. J. (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), s. 8931–8940.
- Sharif, M., Daryani, A. a Karimi, S. A. (2010)** ‘A faunistic survey of cercariae isolated from lymnaeid snails in central areas of Mazandaran, Iran’, *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 13(4), s. 158–163.
- 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.

- Smit, G. J. (1961)** ‘The “Cercarien Hullen Reaktion” and the cercaricidal reaction’, *Tropical and Geographical Medicine*, 13, s. 374–377.
- Snyder, S. D. a Loker, E. S. (2000)** ‘Evolutionary relationships among the Schistosomatidae (platyhelminthes: digenea) and an asian origin for schistosoma’, *The Journal of Parasitology*, 86(2), s. 7.
- Soldánová, M., Selbach, C. a Sures, B. (2016)** ‘The Early Worm Catches the Bird? Productivity and Patterns of *Trichobilharzia szidati* Cercarial Emission from *Lymnaea stagnalis*’, *PLoS ONE*, 11(2), s. e0149678.
- Soldánová, M., Selbach, C., Sures, B., Kostadinova, A. a Pérez-Del-Olmo, A. (2010)** ‘Larval trematode communities in *Radix auricularia* and *Lymnaea stagnalis* in a reservoir system of the Ruhr River’, *Parasites & Vectors*, 3, s. 56.
- Sorgho, H., Bahgat, M., Poda, J.-N., Song, W., Kirsten, C., Doenhoff, M. J., Zongo, I., Ouédraogo, J.-B. a Ruppel, A. (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), s. 169–180.
- Spear, R., Zhong, B., Mao, Y., Hubbard, A., Birkner, M., Remais, J. a Qiu, D. (2004)** ‘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, s. 554–7.
- Speich, B., Utzinger, J., Marti, H., Ame, S. M., Ali, S. M., Albonico, M. a Keiser, J. (2014)** ‘Comparison of the Kato-Katz method and ether-concentration technique for the diagnosis of soil-transmitted helminth infections in the framework of a randomised controlled trial’, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(5), s. 815–822.
- Stothard, J. R., Kabatereine, N. B., Tukahebwa, E. M., Kazibwe, F., Rollinson, D., Mathieson, W., Webster, J. P. a Fenwick, A. (2006)** ‘Use of circulating cathodic antigen (CCA) dipsticks for detection of intestinal and urinary schistosomiasis’, *Acta Tropica*, 97(2), s. 219–228.
- Summanth, S., D’Souza, P. E. a Jagannath, M. S. (2004)** ‘A study of nasal and visceral schistosomiasis in cattle slaughtered at an abattoir in Bangalore South India: -EN- -FR- -ES-’, *Revue Scientifique et Technique de l’OIE*, 23(3), s. 937–942.
- Teesdale, C. H. a Amin, M. A. (1976)** ‘Comparison of the Bell technique, a modified Kato thick smear technique, and a digestion method for the field diagnosis of schistosomiasis mansoni’, *Journal of Helminthology*, 50(1), s. 17–20.
- Thanchomngam, T., Intapan, P., Sri-Aroon, P., Lulitanond, V., Janwan, P., Sanpool, O. a Maleewong, W. (2011)** ‘Molecular detection of *Schistosoma japonicum* in infected snails and mouse faeces using a real-time PCR assay with FRET hybridisation probes’, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(7), s. 831–836.
- 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.
- Théron, A. (1986)** ‘Cercariometry and the epidemiology of schistosomiasis’, *Parasitology Today*, 2(3), s. 61–63.
- Théron, A. (2015)** ‘Chapter Four - Chronobiology of Trematode Cercarial Emergence: from Data Recovery to Epidemiological, Ecological and Evolutionary Implications’, in Rollinson, D. and Stothard, J. R. , *Advances in Parasitology*. Academic Press, s. 123–164.
- Uga, S., Tanaka, K. a Iwamoto, N. (2010)** ‘Evaluation and modification of the formalin-ether sedimentation technique’, *Tropical biomedicine*, 27, s. 177–84.
- Valluru, B., Zhou, Z., Sah, D., Du, W., Ali, M. O., Adam, A. A., Zhang, L. a Wang, J. J. (2020)** ‘Analysis of CT characteristics in the diagnosis of *Schistosoma japonicum* associated appendicitis with clinical and pathological correlation: a diagnostic accuracy study’, *Japanese Journal of Radiology*, 38(2), s. 178–191.
- Wang, C. R., Chen, J., Zhao, J. P., Chen, A. H., Zhai, Y. Q., Li, L. a Zhu, X. Q. (2009)** ‘*Orientobilharzia* species: Neglected parasitic zoonotic agents’, *Acta Tropica*, 109(3), s. 171–175.
- Wang, H., Zhang, Y., Yan, B., Liu, L., Wang, S., Shen, G. a Yu, R. (2006)** ‘Rapid, Simple, and Sensitive Immunoagglutination Assay with SiO₂ Particles and Quartz Crystal Microbalance for Quantifying *Schistosoma japonicum* Antibodies’, *Clinical Chemistry*, 52(11), s. 2065–2071.
- Weerakoon, K. G. A. D., Gobert, G. N., Cai, P. a McManus, D. P. (2015)** ‘Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis’, *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), s. 939–967.

- Wichmann, D., Panning, M., Quack, T., Kramme, S., Burchard, G.-D., Grevelding, C. a Drosten, C. (2009)** ‘Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma’, *PLoS neglected tropical diseases*, 3(4), s. e422.
- Wolmarans, C. T., de Kock, K. N., Strauss, H. D. a Bornman, M. (2002)** ‘Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions’, *Journal of Helminthology*, 76(3), s. 273–277.
- Worrell, C., Xiao, N., Vidal, J. E., Chen, L., Zhong, B. a Remais, J. (2011)** ‘Field detection of *Schistosoma japonicum* cercariae in environmental water samples by quantitative PCR’, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), s. 2192–2195.
- Xu, J., Rong, R., Zhang, H. Q., Shi, C. J., Zhu, X. Q. a Xia, C. M. (2010)** ‘Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)’, *International Journal for Parasitology*, 40(3), s. 327–331.
- Yu, J. M., de Vlas, S. J., Jiang, Q. W. a Gryseels, B. (2007)** ‘Comparison of the Kato-Katz technique, hatching test and indirect hemagglutination assay (IHA) for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in China’, *Parasitology International*, 56(1), s. 45–49.
- Yu, Q., Yang, H., Feng, Y., Yang, X. a Zhu, Y. (2012)** ‘Magnetic affinity enzyme-linked immunoassay based on recombinant 26kDa glutathione-S-transferase for serological diagnosis of schistosomiasis japonica’, *Acta Tropica*, 124(3), s. 199–202.
- Zhou, Y.-B., Yang, M.-X., Wang, Q.-Z., Zhao, G.-M., Wei, J.-G., Peng, W.-X. a Jiang, Q.-W. (2007)** ‘Field comparison of immunodiagnostic and parasitological techniques for the detection of *Schistosomiasis japonica* in the People’s Republic of China’, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76, s. 1138–43.
- Zhu, Y.-C. (2005)** ‘Immunodiagnosis and its role in schistosomiasis control in China: a review’, *Acta Tropica*, 96(2), s. 130–136.