

# Metabarcoding jako nástroj studia diverzity původců helmintóz hospodářských zvířat

Certifikovaná metodika



Český svaz chovatelů  
masného skotu



QK1910204 „Monitoring původců helmintóz v chovech masného skotu a analýza anthelmintické rezistence a genetické diverzity“

Certifikovaná metodika

## **Metabarcoding jako nástroj studia diverzity původců helmintóz hospodářských zvířat**

### **Dedikace:**

Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného projektu QK1910204 „Monitoring původců helmintóz v chovech masného skotu a analýza anthelmintické rezistence a genetické diverzity“ v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025, ZEMĚ

### **Autoři:**

Mgr. Barbora Pafčo, Ph.D.

Prof. MVDr. David Modrý, Ph.D.

### **Oponenti:**

MVDr. Adam Novobilský, PhD, Výzkumný ústav veterinárního lékařství

MVDr. Petr Šatrán, Ph.D., Státní veterinární správa

## Obsah

Cíl metodiky .....	4
Úvod .....	5
Vlastní popis metodiky .....	7
Materiál a přístroje.....	7
Odběr vzorků biologického materiálu .....	7
Vzorky trusu zvířat a jejich uchování.....	7
Příprava sedimentu .....	8
Příprava vzorku fixovaného v 96% etanolu .....	8
Izolace DNA .....	8
Příprava HTS knihovny.....	8
Kontroly PCR.....	10
Příprava reakční směsi a amplifikace .....	11
Vizualizace a kvantifikace cílové DNA pomocí elektroforézy .....	13
Kvantifikace jednotlivých vzorků pomocí Qubit fluorometru .....	13
Přečištění vzorku/poolu/finální knihovny .....	14
Finální úprava knihovny, sekvenace.....	14
Bioinformatické zpracování sekvenačních dat .....	14
Statistické vyhodnocení dat .....	15
Srovnání novosti postupů.....	15
Popis uplatnění metodiky.....	15
Ekonomické aspekty.....	16
Seznam použité související literatury .....	16
Seznam publikací předcházející metodice.....	18
Jména oponentů.....	18

## Cíl metodiky

Parazitózy mají závažný ekonomický dopad pro chovatele hospodářských zvířat. Infekce helminty jsou dokonce považovány za jednu z hlavních příčin snížené produkce a souvisejících finančních ztrát v živočišné výrobě (Ploeger, 1990; Canton et al., 2020). Mezi celosvětově nejvýznamnější parazitózy patří rovněž strongylidní hlístice. Například v Austrálii jsou ekonomické ztráty způsobené právě těmito hlísticemi odhadovány na miliardu dolarů, další desítky miliard jsou vynaloženy na jejich léčbu (McLeod, 1995 Rashid et al., 2019). Dlouhodobé používání anthelmintik však vede k nárůstu anthelmintických rezistencí, které terapii komplikují a zvyšují ekonomické ztráty (Canton et al., 2020), proto je v posledních letech kladen důraz na potřebu alternativních strategií kontroly. Diverzitě a významu strongylidních hlístic, a především nástupu anthelmintické rezistence je věnována značná pozornost rovněž v EU, a to například v Belgii, Německu, Švédsku nebo Velké Británii, kde parazitózy skotu, zejména na pastvinách, představují rostoucí problém ekonomiky chovů ve smyslu snížení doживosti a poklesu hmotnostních přírůstků (Charlier et al. 2010, McArthur et al. 2011, aj.).

Mění se ráz a ekologie krajiny spolu s globálním oteplováním mění dynamiku populace mnoha helmintů, což má vliv na jejich vývoj a přežití mimo hostitele, čímž se modifikuje prostorová a sezónní epidemiologie helmintických infekcí (Skuce et al., 2013; Cable, 2017). Rovněž intenzivnější přeshraniční pohyb zvířat, který je patrný v posledních letech, tvoří pozadí dynamických změn spektra, hojnosti a významu parazitů u skotu. Efektivní sledování parazitárních infekcí a zejména jejich druhového složení signifikantně zefektivní boj s parazitárními infekcemi a omezí zavlečení nových infekcí do naivních oblastí.

Analýzy diverzity strongylidních hlístic komplikuje jejich existence v komplexních společenstvech, ve kterých v rámci hostitele hlístice žijí; jednoho hostitele parazituje škála rodů/druhů strongylidních hlístic. U skotu byla popsána častá koexistence deseti druhů strongylidních hlístic. Jednotlivé hlístice se liší jak lokalitami v rámci svého hostitele, tak svým vlivem na hostitele či schopností odolávat účinkům antiparazitik. Klasické metody detekce hlístic neumožňují přesnou identifikaci, selhávají při řešení infekcí větším množstvím druhů a neodhalí genetickou variabilitu. Diagnostika se přesouvá k detekci DNA, avšak kritickou slabinou metod vycházejících ze Sangerova sekvenování je limitovaný počet druhů, kteří mohou být detekováni ve směsných infekcích. Přelomovou technikou je vysokokapacitní sekvenování (High-throughput sequencing, HTS) umožňující osekvenovat a efektivně popsat spektrum strongylidních hlístic a určit relativní abundanci jednotlivých druhů (Avramenko et al., 2015; Pařčo et al., 2018).

Cílem předkládané metodiky je vytvoření nástroje analýz genetické diverzity strongylidních hlístic za použití vysokokapacitního sekvenování, určená jak k využití u hospodářských zvířat, tak u celé škály dalších hostitelů strongylidními hlístic. Cílem metodiky je také vytvoření nástroje k monitoringu efektivity anthelmintické terapie, kdy opakovaný screening vzorků několik týdnů po ukončení léčby umožní posoudit eliminaci helmintů nebo části jejich spektra z hostitelského organismu. Výsledným cílem metodiky je tak omezení ekonomického dopadu helmintóz cestou aktivního managementu zdraví u zvířat a omezením šíření anthelmintické rezistence v chovech. Naším cílem bylo předložit metodiku využívající přípravy HTS knihoven s běžným vybavením molekulárně-diagnostické laboratoře a její využití tak není vázáno na vstupní investice. S rozvojem vysokokapacitního sekvenování došlo rovněž k rozšíření center, kde je možné sekvenování provádět, ať už komerčně, či ve spolupráci s různými vědeckými institucemi, jako je CEITEC MU či BIOCEV.

## Úvod

Ekonomika chovu masného skotu je zatížena škálou externích vlivů včetně infekčních nemocí. Helmintózy skotu představují celosvětově významná onemocnění s negativním dopadem na zdraví zvířat a na produkci mléka a masa a následně na ekonomické parametry (Beesley et al., 2017; Canton et al., 2020). Zatímco řada parazitů v Evropě postupně ztrácí význam, nákazy gastrointestinálními strongylidními hlísticemi představují pro chovatele rostoucí problém z důvodu obtížně udržitelné kontroly parazitů. Nesprávné přístupy k odčervování a aktuální růst rezistentních populací gastrointestinálních strongylidních hlístic u hospodářských zvířat patří mezi klíčové problémy v rámci EU (Charlier et al. 2010, McArthur et al. 2011, aj.). Na rozdíl od řady virových a bakteriálních nákaz není výskyt parazitóz centrálně sledován. Jedná se přitom o velmi dynamickou problematiku odrážející změny v managementu chovů, aktuální trendy v preventivním a terapeutickém podávání anthelmintik i importy zvířat ze zahraničí. Zejména v otázkách výskytu rezistencí k anthelmintikům a v odhadu současné nakažové situace jsou aktuální data více než žádoucí, s vysokým nárokem na jejich reprezentativnost.

Strongylidní hlístice parazitující u skotu patří nejčastěji do čeledi Trichostrongylidae a jedná se o ko-infekce způsobené několika různými druhy, ale často i rody (Chroust, 2000). Mezi nejčastější zástupce rodů trichostrongylidních hlístic u skotu patří *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* a *Nematodirus* (Wall, 2015). Trichostrongylidní hlístice jsou parazity trávicího traktu, nacházejí se v žaludku a tenkém nebo tlustém střevě hostitele, u skotu jsou lokalizovány zejména ve slezu a tenkém střevě. Dospělí červy spolu kopulují a samice následně produkují oplozená vajíčka, která odcházejí z hostitele spolu s trusem. Z vajíček se ve vnějším prostředí líhnou larvy, které se během několika týdnů mění na larvy infekční, za vlhka migrují po travinách, jsou spaseny a následně infikují svého hostitele. Na pastvinách mohou přežívat několik měsíců a některé druhy dokonce i celé zimní období. Jiné druhy mohou zimu přežívat ve formě hypobiotických stádií zanořených ve sliznici trávicího traktu a až na jaře dospívají a produkují vajíčka. Trichostrongylidní hlístice se živí krví či tkáňovými tekutinami, způsobují anémie, poškozují sliznici trávicího traktu a následně způsobují infekce a intoxikaci organismu a vedou k vážným poruchám trávení (Wall, 2015). Přítomnost trichostrongylidních hlístic se projevuje zažívacími problémy, mezi které patří nechutenství, průjem, žíznivost, ztráta váhy, ale také chudokrevností, celkovou vyčerpaností až úhynem infikovaných zvířat. Mezi ostatní strongylidní hlístice parazitující u skotu patří *Bunostomum* živící se krví hostitele a způsobující těžké poškození sliznice zažívacího traktu. Larvy mohou aktivně infikovat svého hostitele rovněž přes neporušenou kůži. Posledním zástupcem je *Oesophagostomum*, jehož larvy se zanořují hluboko do sliznice a vytvářejí typické uzlíčky; dospělí červi sliznici těžce poškozují a způsobují vážné záněty a krvácení sliznic (Chroust, 2000).

Infekce strongylidními hlísticemi jsou diagnostikovány pomocí základních koproscopických metod, na které navazuje mikroskopické vyšetření (Foreyt, 2002). Pro základní diagnostiku se používají nejčastěji přímo vzorky trusu, ve kterých se nacházejí typická strongylidní vajíčka. Tato vajíčka jsou však morfologicky nerozlišitelná, a proto základní metody neumožňují jejich zařazení na nižší taxonomickou úroveň. Z vajíček je v laboratorních podmínkách možné pomocí koprokultur vykultivovat larvy, na základě jejichž morfologie lze hlístice určit na úroveň rodu. Nejčastěji se však k přesné identifikaci využívají genetické metody na základě PCR (RFLP, SSCP, DGGE, RAPD, AFLP) využívající různých genetických markerů, dominují sekvence rDNA, zejména ITS (interní transkribovaný spacer) úsek, umožňující identifikaci na úroveň druhů strongylidních hlístic. Kritickou slabinou metod vycházejících ze Sangerova sekvenování je limitovaný počet druhů, který může být zachycen (Gasser, 2006).

Základním problémem genetických analýz spektra strongylidních hlístic parazitujících v trávicím traktu přežvýkavců jsou polyinfekce různými druhy/rody a genotypy strongylidních hlístic, které se vyznačují jinou ekologií, odlišným působením na hostitele, případně rozdílným stupněm rozvoje rezistence k anthelmintikům. Aplikace DNA diagnostiky je při plošném vyšetření možná dvěma způsoby: analýza DNA z předem vykultivovaných a jednotlivě vybraných larev, které již nesou základní morfologické charakteristiky, výsledné sekvence se rovněž dají použít jako referenční, avšak tímto postupem nelze popsat celou komunitu strongylidních hlístic. Druhým přístupem je metabarcoding za použití pokročilých sekvenčních metod, jakými je vysokokapacitní sekvenování (High-throughput sequencing, HTS). HTS je vysoce efektivní metoda popisu genetické diverzity, která byla použita v posledních deseti letech zejména pro popis bakteriálního profilu či též mikrobiomu za použití genu 16S ribosomální RNA (Peng et al., 2013; Gomez et al., 2015). V posledních několika letech je tato metoda dále využívána pro popis eukaryotních komunit – volně žijících protist a volně žijících či rostliny a parazitujících hlístic (Sapkota & Nicolaisen, 2015). Metoda HTS může být efektivně použita pro určení spektra strongylidních hlístic a poměrného zastoupení jednotlivých druhů/genotypů u různých hostitelů (Avramenko et al., 2015; Pařčo et al., 2018).

Zejména díky faktu, že strongylidní hlístice tvoří komplexní společenstva, kdy se u skotu vyskytuje často koexistence deseti i více druhů hlístic a běžné diagnostické metody jsou pro určení diverzity jednoduše nepoužitelné, aktuální data o přesném složení strongylidních komunit skotu na území ČR a i v rámci Evropy chybí, a to i přes to, že v řadě chovů se klinické potíže vyskytují. Strongylidní hlístice patří mezi vůbec nejčastější parazitární infekce na území ČR vyskytující se ve všech regionech (Modrý et al., 2019). Ojedinelé studie poukazují na přítomnost strongylidních hlístic s dominancí *Ostertagia ostertagi* a *Cooperia oncophora* (Chroust 1982; 2006). Právě *O. ostertagi* je nejpatogennější a působí gastroenteritidy, *C. oncophora* pak vykazuje vysokou míru rezistence k anthelmintikům. Termínem anthelmintická rezistence označujeme schopnost helmintů odolávat účinkům antiparazitika, přenášená geneticky na potomstvo. Rezistentní linie se šíří mezi jedinci, mezi stády i mezi zeměmi v rámci importů zvířat. Anthelmintické rezistence jsou známé u ovcí, koz a koní, v posledních letech rychle narůstají u skotu (Sutherland & Leathwick, 2011). V ČR byla anthelmintická rezistence popsána u koní a ovcí (Chroust 2000; Bodecek et al., 2018; Vadlejš et al., 2021), na Slovensku u ovcí (Dolinská et al. 2014). Aktuální data o anthelmintické rezistenci u skotu v ČR zásadně chybí, avšak v recentní studii SVÚ Jihlava (2015-2016) byl na řadě farem zaznamenán výskyt gastrointestinálních strongylidních hlístic, ve čtvrtině chovů byly intenzity infekcí strongylidními hlísticemi vysoké navzdory odčervování, což je indikací pro možnou rezistenci.

Metodika vysokokapacitní sekvenování je velice efektivní, se schopností popsat a kvantifikovat společenstva strongylidních hlístic a zároveň má potenciál pro posouzení anthelmintických rezistencí detekovaných haplotypů. Zavedením metodiky metabarcodingu za použití HTS se zlepší povědomí o strongylidních hlístic a jejich přesném druhovém složení na daném území. Znalost strongylidních hlístic pomůže k efektivnímu boji proti těmto parazitům, cíleným terapiím a předcházením vzniků anthelmintických rezistencí. Použití metabarcodingu pomocí HTS má rovněž smysl při exportu zvířat, protože se díky výsledkům této progresivní metody a následným opatřením může zabránit zavlečení parazitů do nových oblastí. Metodika může být rovněž použita kromě komerčních chovů pro ochranu volně žijících či re-introdukovaných živočichů. S nepůvodními druhy přežvýkavců (nejen skotu) mohou být do původních společenstev zavlečené nové druhy parazitů, jako to aktuálně pozorujeme u strongylidní hlístice *Ashworthius sidemi* (Skorpikova et al., 2020). Zavlečené hlístice mohou způsobovat značné problémy u naivních volně žijících živočichů a následně i těch hospodářských a přesná identifikace a následná patření jsou klíčová pro eliminaci možných škod. Metodika HTS vhodná pro pochopení zákonitosti hostitelské specifity jednotlivých druhů resp. genotypů strongylů a v

neposlední řadě je nástrojem k pochopení dynamiky společenstev helmintů jak v závislosti na sezóně, tak na prováděných anthelmintických opatřeních.

## Vlastní popis metodiky

### Materiál a přístroje

- odběrové zkumavky s 96% etanolem, popřípadě igelitové sáčky, odběrové špachtle a následná fixace do etanolu v laboratoři či mražení při -20 °C
- 50 ml kónické zkumavky
- hmoždíř, sítko/gáza
- centrifuga na 50 ml zkumavky
- zkumavky typu eppendorf 2 a 1,5 ml
- sterilní špičky a veškerý potřebný materiál pro izolace vzorků (viz manuál izolačního kitu)
- pipety
- centrifuga na 1,5 ml zkumavky
- 0,2 ml tenkostěnné PCR zkumavky, případně 8-mi zkumavkové PCR-stripy s jednotlivými víčky či PCR destičky s fólií
- centrifuga na 0,2 ml zkumavky/stripy/destičky
- PCR cycler s vyhříváním víkem
- aparatura pro horizontální gelovou elektroforézu
- Qubit fluorometr
- Agencourt AmpureXP beads, magnetický stojánek
- lednice (+4°C), mrazák (-20°C)

### Odběr vzorků biologického materiálu

#### Vzorky trusu zvířat a jejich uchování

Pro diagnostické účely je odebírán vzorek trusu zvířete, a to buď přímo z rekta, výhodou je přesná identifikace zvířete, či z pastviny, kdy se jedná obvykle o blíže neidentifikované vzorky/jedince. Typ odběru musí odpovídat položeným otázkám, z nichž vyplývá, zda je nutné znát diverzitu helmintů u konkrétního zvířete či stačí informace o složení helmintů obecně ve stádě.

Vzorek se odebere buď do plastového sáčku či jiného odběrového kontejneru/vzorkovnice, dále je ideální jej uchovávat při +4 °C a zpracovat bezprostředně po doručení do laboratoře nebo skladovat při -20 °C do izolace DNA (je třeba minimalizovat počet cyklů zmražení/rozmražení). Další možností je vzorek ihned umístit do 96% etanolu, avšak koncentrace etanolu ve finálním fixovaného materiálu nesmí klesnout pod 70 %, proto je nutné dohlížet na správný poměr objemu etanolu (většina) a vzorku (menší část, maximálně 1/3 objemu).

Dalším krokem je izolace celkové DNA. Ta se buď izoluje z části zmraženého trusu, z části vzorku fixovaného v 96% etanolu či z připraveného sedimentu. Příprava sedimentu ze vzorku trusu stejně jako odpaření etanolu z fixovaných vzorků vyžaduje iniciální kroky, čerství trus či část zmraženého vzorku trusu po rozmrazení mohou být přímo použity pro izolaci DNA.

### Příprava sedimentu

Výhodou připraveného sedimentu je, že se jedná o koncentrační metodu, tudíž se zvyšuje šance zachytu všech i ve vzorku relativně vzácnějších zástupců.

Cca 5 g čerstvého či rozmraženého trusu rozmělníme v hmoždíři, přesejeme přes sítko či gázu a zachytíme v 50 ml kónické zkumavce a centrifugujeme 3 min. na 2000 rpm. Oddělený supernatant slijeme a sediment přímo použijeme pro izolaci DNA či ho zmrazíme a použijeme později. Alternativně nemusíme zkumavku centrifugovat, ale vyčkáme na přirozenou sedimentaci partikulí, slijeme supernatant, vzorek dolijeme vodou, opět necháme sedimentovat a tyto kroky opakujeme, dokud není supernatant čirý. Tento postup je však časově náročný.

### Příprava vzorku fixovaného v 96% etanolu

Z fixovaného vzorku odebereme část pro izolaci DNA do 2 ml zkumavky typu eppendorf. Zkumavku umístíme do inkubátoru, nastavíme teplotu na 37 °C a přes noc necháme etanol odpařit. Následně může být vzorek použit pro izolaci DNA.

### Izolace DNA

Izolaci celkové DNA ze vzorku trusu čerstvého, rozmraženého, po odpaření etanolu či předem připraveného sedimentu lze provádět komerčně dostupnými kity jak manuálně, tak automaticky. Při izolaci je potřeba dodržet návod výrobce konkrétního kitu. Pro přípravu HTS knihoven se výhradně doporučují powersoil izolační kity, které si dokážou lépe poradit s inhibitory nacházejícími se ve vzorcích trusu.

Doporučený kit:

#### **DNeasy PowerSoil Kit, Qiagen, Germany**

Lze však použít kterýkoli powersoil kit či kity pro izolaci trusu/stolice (Stool DNA Isolation Kit). V prvním kroku izolace je však nutné zařadit mechanismus rozbití vajíček strongylidních hlístic čili alternativu k PowerBead Tubes používaných při izolaci za použití Qiagen DNeasy PowerSoil Kit. Kvalitu extrakce je dále nutné ověřit na ideálně paralelní izolaci a následné detekci strongylidních hlístic na 20 pozitivních a 10 negativních vzorcích.

### Příprava HTS knihovny

Pro přípravu HTS knihovny bude použita dvou-kroková PCR metoda. Pro detekci strongylidních hlístic byl vybrán úsek ITS-2 (second internal transcribed spacer) jaderné ribozomální DNA. Jedná se o dostatečně konzervovaný úsek umožňující amplifikaci širokého spektra strongylidních hlístic, ale zároveň dostatečně variabilní, aby umožnil zařazení do příslušného druhu/haplotypu. Amplifikovaný úsek je dostatečně krátký, aby mohl být použit pro sekvenování pomocí Illumina Miseq platformy (2x250/300 bp).



Pro druhé kolo PCR je nutné vybrat vhodný design sekvenačních primerů po domluvě se sekvenačním centrem. Nejčastěji se používá Nextera či TruSeq Indexing design. Tato metodika využívá Nextera



Primer Design (Obrázek 1).

Obrázek 1: Nextera primer design.

Sekvence primerů pro první kolo PCR

Název	Sekvence 5' → 3'	Reference
Strongyl_ITS-2_F	acg tct ggt tca ggg ttg	Pafčo et al., 2018
Strongyl_ITS-2_R	atg ctt aag ttc agc ggg ta	

Primery v prvním kole PCR amplifikují cílený produkt, musí však obsahovat adapter pro sekvenační primery použitý ve druhém PCR kole (Obrázek 1). Pro zvýšení komplexity je rovněž mezi sekvenačním adaptorem a forward primerem přidána jedna extra báze.

Design primerů pro první kolo:

Adapter pro sekvenační primery+(extra bp)+specifický ITS-2 primer

Sekvence 5' → 3'adapteru sekvenačního primeru pro Nextera primer design:

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

Design finálních primerů pro první kolo PCR:

Strongyl\_ITS-2\_F\_complete

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTACGCTCTGGTTCAGGGTTG

Strongyl\_ITS-2\_R\_complete

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATGCTTAAGTTCAGCGGGTA

## Kontroly PCR

Pro každou připravovanou HTS knihovnu je zařazeno několik negativních kontrol. Jejich množství není striktně dané a záleží na rozhodnutí výzkumníka. První kontrola se může zařadit už při izolaci DNA. Při zachování všech standardních postupů však ke kontaminacím helminty během izolací DNA nedochází. K sadě vzorků DNA přidáme minimálně dvě negativní kontroly – PCR vodu a DNA vyzolovanou z negativního vzorku trusu. Kontroly slouží ke kontrole čistoty použitých reagensů, pracovního postupu a chimér vzniklých při amplifikaci a následné sekvenaci.

Pro zvýšení kontroly a správnosti výsledků je každý vzorek připravován v duplikátu (replikátu) za použití jiné kombinace indexů (barkódů). Do výsledné analýzy vstupují pouze sekvence zastoupené v obou duplikátech. Tímto opět dochází k eliminaci chimérických sekvencí bez biologického významu.

Pro každou připravovanou HTS knihovnu se používá pozitivní kontrola obsahující sekvenačně potvrzenou DNA strongylidních hlístic či uměle syntetizovaný templát obsahující známou sekvenci strongylidních hlístic (Pafčo et al., 2018).

## Příprava reakční směsi a amplifikace

1. Reakční směs se připravuje vždy čerstvá v boxu dekontaminovaném UV zářením po dobu 10 minut.
2. Dle množství vzorků v HTS knihovně se připravují reakce v 96- či 384-jamkové PCR destičce. Knihovny se připravují ručně, ideálně za použití dávkovacích a multikanálových pipet či za použití automatického robota.
3. Roztoky, reagensie i vzorky/kontroly necháme rozmrazit při +4 °C, poté jemným poklepem na zkumavku promícháme (nevortexujeme) a centrifugujeme při maximálních otáčkách pět sekund.
4. Dle počtu analyzovaných vzorků (počet vzorků + nadměrek, který se odvíjí od počtu vzorků) připravíme mastermix napipetováním jednotlivých komponent v pořadí a poměru uvedeném níže, vortexujeme 5 s, při maximálních otáčkách centrifugujeme 5 s a rozdělíme do destičky, kterou zalepíme fólií a opět krátce centrifugujeme.

	Mastremix objem na 1 reakci v $\mu$ l	
PCR H <sub>2</sub> O	2,5	
Primer Strongyl ITS-2_F_complete 10 $\mu$ M	0,25	
Primer Strongyl ITS-2_R_complete 10 $\mu$ M	0,25	
KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (Roche)*	5	
<b>Objem mastermixu na 1 reakci</b>	<b>8</b>	
vzorek		2 $\mu$ l

<b>Celkový objem</b>		<b>10 <math>\mu</math>l</b>
----------------------	--	-----------------------------

5.

\*Doporučená polymeráza, může být však nahrazena jinou předem otestovanou **proofreading** polymerázou

5. Do jednotlivých jamek přidáme odpovídající množství jednotlivých vzorků, pozitivní kontroly a negativních kontrol (v tomto pořadí). Destičku následně zalepíme a před amplifikací centrifugujeme při maximálních otáčkách 5 s.
6. Amplifikace probíhá dle níže uvedeného teplotního profilu v termocykleru s vhodným nástavcem pro PCR destičky a s vyhříváním víkem (105 °C).

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95 °C	3'	
Denaturace	95 °C	15''	
Annealing	55,5 °C	15''	x 30
Elongace	72 °C	15''	
Finální elongace	72 °C	1'	
	12 °C	$\infty$	

Po skončení amplifikace a vychlazení termocykleru na 12 °C lze vzorky vyjmout a pokračovat dle bodu 7., případně je v tomto bodě možné postup přerušit a pokračovat následující den a PCR destičku skladovat v -20 °C.

7. Vzorky mezi prvním a druhým kolem musí být 20x ředěné PCR vodou: do každé jamky nové destičky napipetujeme 36  $\mu$ l H<sub>2</sub>O a přidáme 1,5  $\mu$ l PCR produktu z prvního kola buď ručně či pomocí automatického robota. Destičku zalepíme fólií a centrifugujeme při maximálních otáčkách 5 s.
8. Mastermix pro druhé kolo PCR připravíme analogicky bodu 4. (značené primery se přidávají však zvlášť) dle níže uvedeného rozpisu:

	Mastermix objem na 1 reakci v $\mu$ l	
PCR H <sub>2</sub> O	4	

KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (Roche)*	10	
<b>Objem mastermixu na 1 reakci</b>	<b>14</b>	
Nextera kombinace značených primerů		4 µl
Nařaděná reakce prvního kola (viz bod 7.)		2 µl
<b>Celkový objem</b>		<b>20 µl</b>

9.

\*Doporučená polymeráza, může být však nahrazena jinou předem otestovanou **proofreading** polymerázou

9. Do jednotlivých jamek přidáme sekvenační primery označené barkódy – dle domluvy se sekvenačním centrem.
10. Do jednotlivých jamek přidáme nařaděné reakce prvního kola (viz bod 7.).
11. Destičku zalepíme folií, před amplifikací centrifugujeme při maximálních otáčkách 5 s.
12. Amplifikace probíhá dle níže uvedeného teplotního profilu v termocykleru s vhodným nástavcem pro PCR destičky a s vyhříváním víkem (105 °C).

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	3'	
Denaturace	95°C	15''	
Annealing	55°C	30''	x 16
Elongace	72°C	30''	
Finální elongace	72°C	3'	
	12°C	∞	

Po skončení amplifikace a vychlazení termocykleru na 12 °C lze vzorky vyjmout a pokračovat ve vizualizaci PCR produktu, případně je v tomto bodě možné postup přerušit a destičku skladovat v -20 °C a pokračovat následující den.

Dalším krokem je kvantifikace vzorků a jejich následné spojení ve finální knihovnu. Vhodná metoda kvantifikace se odvíjí zejména od množství vzorků zařazených ve finální HTS knihovně. Buď můžou být vzorky vizualizovány pomocí elektroforézy a vizualizované produkty kvantifikovány dle příslušného softwaru (při velkém množství vzorků) či kvantifikován každý jednotlivý vzorek pomocí Qubit fluorometru (malé množství vzorků). Od toho se dále odvíjí postup spojování ve finální knihovnu.

#### Vizualizace a kvantifikace cílové DNA pomocí elektroforézy

Produkty amplifikace jsou separovány a vizualizovány na 2% agarózovém gelu v 10× TBE pufru (či 1× TAE pufru) v aparatuře určené pro horizontální elektroforézu:

1. Odpovídající množství agarózy (2,0 g/100 ml) v kvalitě pro molekulární biologii rozvaříme v 10× TBE pufru (či 1× TAE pufru) v mikrovlnné troubě a po vychladnutí doplníme destilovanou vodou na původní objem.
2. Po vychladnutí na cca 50 °C přidáme 5 µl/100 ml MIDORIGreen Advance (Nippon Genetics, Germany) a po důkladném promíchání nalijeme do formičky, vložíme hřeben odpovídající počtu a objemu analyzovaných vzorků a necháme zchladnout a ztuhnout (cca 30 minut).
3. Gel vložíme do aparatury a přelijeme 10× TBE puftrem (či 1× TAE puftrem) tak, aby hladina dosahovala 1-2 mm nad gel, vyjmeme hřeben.
4. Do jednotlivých jamek pipetujeme 5 µl od každého vzorku smíchaného s 1 µl loading Dye multikanálovou pipetou. Do krajních pozic pipetujeme velikostní standard adekvátní délce PCR produktu - 100 bp DNA Ladder (např. New England Biolabs, USA/ThermoFisher Scientific, USA).
5. Zavřeme aparaturu a necháme proběhnout elektroforézu při 80–150 V (odvíjí se od velikosti gelu – množství vzorků) mezi elektrodami po dobu nutnou k dostatečné separaci produktů.
6. Po skončení elektroforézy jsou produkty vizualizovány prosvícením gelu na UV transluminátoru, obrazový výsledek zdokumentován a uložen do databáze pro dodatečné vyhodnocení. Ideálně je použit transluminátor s možností kvantifikace produktu.
7. Pomocí kvantifikačního softwaru kvantifikujeme každý band zachycený na gelu.
8. Jednotlivé vzorky na základě intenzity bandů seskupíme dohromady – rozdělíme do několika kategorií/poolů dle podobnosti koncentrace jednotlivých vzorků.
9. Koncentraci každého poolu změříme pomocí Qubit fluorometru (před tímto krokem vzniklé pooly ideálně jednotlivě přečistíme pomocí Agencourt AmpureXP beads; viz návod níže).
10. Seskupíme všechny pooly dohromady dle jejich koncentrace a množství vzorků v jednotlivých poolech, vytvoříme finální knihovnu.

#### Kvantifikace jednotlivých vzorků pomocí Qubit fluorometru

1. Změříme koncentraci každého vzorku dle instrukcí pro použití Qubit fluorometru (před tímto krokem vzorky ideálně každý jednotlivě přečistíme za pomoci Agencourt AmpureXP beads; viz návod níže).
2. Všechny vzorky naředíme PCR vodou na stejnou koncentraci.

3. Seskupíme všechny nařaděné vzorky dohromady ve stejném objemu a vytvoříme tak jeden směsný vzorek – finální knihovnu.

#### Přečištění vzorku/poolu/finální knihovny

1. Vzorek dobře zvertexujeme a centrifugujeme 5 s při maximálních otáčkách.
2. Přidáme Agencourt AmpureXP beads – množství dle délky produktu, viz návod.
3. Mixujeme pipetou a necháme stát 5 min.
4. Přesuneme na magnetický stojánek a počkáme, až se všechny kuličky přichytí na magnet a zbylá tekutina zůstane čirá.
5. Zkumavku necháme na stojánku a odsajeme tekutinu.
6. Promyjeme kuličky na magnetu pomocí 200 µl 80% etanolu (pelet neporušujeme, pouze ho opláchneme na povrchu), etanol odpipetujeme.
7. Krok 6 opakujeme.
8. Několik minut necháme odpařit zbytek etanolu.
9. Zkumavku sundáme ze stojánku, pelet omyjeme pomocí 30 µl low TE pufru, necháme 5 min odstát.
10. Vrátime zkumavku na stojánek, počkáme dokud se kuličky neusadí na magnetu a tekutina je čirá.
11. Necháme zkumavku na magnetu a odsajeme knihovnu, kterou přeneseme do čisté low binding zkumavky.

#### Finální úprava knihovny, sekvenace

Knihovna je připravena a předána v tomto stavu do sekvenačního centra. V sekvenačním centru je změřena finální koncentrace DNA knihovny a zkontrolována délka produktů například pomocí TapeStation System (Agilent), který umožní rovněž kontrolu délky knihovny.

V případě nálezu přítomnosti dalších produktů, které svou délkou neodpovídají cílové délce produktu, může být provedena selekce délky produktu pomocí systému Pippin Prep (Sage Science, USA), který je velice přesný.

Finální knihovna je kvantifikována pomocí Kapa Library Quantification Kit (Kapa Biosystems), nařaděna na potřebnou koncentraci a následně osekvenována pomocí MiSeq Reagent Kitu v2 (2 × 250 bp pair end reads) či v3 (2 × 300 bp pair end reads) s ohledem na délku výsledných sekvencí, nejčastěji pomocí Illumina MiSeq platformy či ostatních platforem s ohledem na množství vstupních vzorků a nároku na finální pokrytí.

#### Bioinformatické zpracování sekvenačních dat

Data jsou zaslána ze sekvenačního centra ve formě Fastq souborů. Je mnoho cest a programů, které mohou být použity pro zpracování HTS dat, například QUIIME, Mortur atd. Níže naleznete stručně

popsanou jednu z možných alternativ, kdy pracujeme v terminálu našeho počítače či za využití metacentra a následně v programu R.

1. Fastq soubory demultiplexujeme pomocí programu skewer (Jiang et al., 2014).
2. Paired-end zasemblujeme pomocí programu pear (Zhang et al., 2014).
3. Eliminujeme sekvence s vyšší sekvenační chybovostí než 1 za použití programu dada2 (Callahan et al., 2016).
4. Data dále čistíme a filtrujeme za použití programu dada2 (Callahan et al., 2016).
5. Najdeme a odstraníme chimerické sekvence za použití dada2 algoritmů.
6. Duplikáty pro stejný vzorek spojíme a použijeme pouze sekvence přítomné v obou duplikátech.
7. Za použití algoritmu megaBLAST vůči nt/nr NCBI databázi provedeme taxonomické přiřazení ITS-2 haplotypů. Pro zařazení haplotypů může být rovněž vytvořena vlastní referenční knihovna sekvencí (například sekvence získané z jednotlivých morfologicky určených larev vykultivovaných pomocí koprokultur či dospělých červů).

### Statistické vyhodnocení dat

Data jsou následně statisticky vyhodnocena. Opět je možné použít velkou škálu programů pro zpracování HTS dat z nichž některé je možné používat online ve webovém prohlížeči. Nejčastěji jsou však data zpracována v programu R. Zpracování dat se odvíjí od otázek experimentu či vědecké studie. Nejčastěji se však porovnávají parametry alfa a beta diverzity.

### Srovnání novosti postupů

V současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zabývající se detekcí a přesným popisem diverzity strongylidních hlístic. Rutinní metody jsou založené na mikroskopii či základních genetických testech na které navazuje Sangerovo sekvenování. Žádná z běžně používaných metod však neumožňuje popis celkové komunity strongylidních hlístic, které se vyskytují u přežvýkavců v ko-infekcích několika druhů/rody. Naopak metabarcoding za využití velkokapacitního sekvenování umožňuje přesný popis celé komunity strongylidních hlístic u velkého množství studovaných vzorků.

Zásadní novost postupu je přesný popis metodiky od sběru vzorků, jejich přípravy pro vhodnou izolaci celkové DNA přes přípravu HTS knihovny až po základní zpracování HTS dat. Výše popsané metodika umožňuje rovněž zpracování velkého množství vzorků, což je důležité pro plošná hodnocení. Předložená metodika byla ověřena na širokém spektru hostitelských druhů a rovněž na vzorcích trusu skotu na území ČR.

### Popis uplatnění certifikované metodiky

Jak u domácích, tak u volně žijících kopytníků patří společenstva helmintů mezi klíčové komponenty bioty gastrointestinálního traktu. Zatímco některé druhy helmintů mají jen minimální dopad na zdraví zvířat, řada dalších patří mezi závažné patogeny podílející se nejen na snížení fitness/užitkovosti, ale i na přímé mortalitě zvířat.

Ambicí certifikované metodiky je vyplnění zásadní mezery v metodologii diagnostiky gastrointestinálních nematodů a v analýze jejich společenstev. Metodika je uplatňována při studiu mezidruhových přenosů helmintů a nalezne uplatnění v diferenciální analýze společenstev helmintů

před a po aplikaci anthelmintik. Detailní informace o složení společenstev strongylidních hlístic pomáhají odhalit výskyt resp. podíl patogenních druhů a indikaci k terapii. Zejména v kombinaci s metodami testování anthelmintické rezistence metodika založená na HTS může pomoci identifikovat rezistentní linie helmintů do druhu a odhadnout jejich možný dopad na zdraví, resp. ekonomické výnosy chovu.

Díky faktu, že metodika je založena na obecných genetických markerech, její aplikace přináší mimořádné výhody všude tam, kde hrozí riziko zavlečení nových patogenů do stáda, stejně jako v situacích, kdy je třeba monitorovat parazitofaunu kopytníků překračujících státní hranice.

## Ekonomické aspekty

Parazitózy mají závažný ekonomický dopad pro chovatele hospodářských zvířat. Infekce helminty jsou dokonce považovány za jednu z hlavních příčin snížené produkce a souvisejících finančních ztrát v živočišné výrobě. Vyšetření stád masného skotu v ČR v letech 2019-2021 prokázala všudypřítomný výskyt strongylidních infekcí.

Metodika vychází ze zavedených rutinních laboratorních postupů (izolace DNA, PCR) a dostupných servisních služeb (High Throughput Sequencing). Na cílových pracovištích by tak neměla vyžadovat významnější investice a je realizovatelná při pokrytí materiálových nákladů a služeb souvisejících se sekvenováním a bioinformatickým zpracováním dat. Ekonomický přínos sledování helmintóz nelze odhadnout bez znalosti plošné situace v ČR. Právě v analýzách dopadu parazitóz na ekonomiku živočišné produkce ČR zaostává za zeměmi s propracovaným systémem analýzy ztrát. Například v Austrálii jsou ekonomické ztráty způsobené právě těmito hlísticemi odhadovány na miliardu dolarů, další desítky miliard jsou vynaloženy na jejich léčbu (McLeod, 1995 Rashid et al., 2019).

## Seznam použité související literatury

- Avramenko, R.W., Redman, E.M., Lewis, R., Yazwinski, T.A., Wasmuth, J.D., Gilleard, J.S. 2015. Exploring the gastrointestinal "Nemabiome": deep amplicon sequencing to quantify the species composition of parasitic nematode communities. *PLoS One*. 10, e0143559.
- Beesley, N.J., Caminade, C., Charlier, J., Flynn, R.J., Hodgkinson, J.E., Martinez-Moreno, A., Martinez-Valladares, M., Perez, J., Rinaldi, L., Williams, D.J.L. 2018. *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound. Emerg. Dis.* 1, 199–216.
- Bodecek, S., Svetlikova, J., Hargitaiova, K., Kecerova, Z., Mrackova, M. 2018. Monitoring the avermectin and pyrantel resistance status of nematode parasites of horses in the Czech Republic. *Vet. Med.* 63, 299–305.
- Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A.R., Morgan, E.R., Murray, K., Pascoe, E.L., Sait, S.M., Wilson, A.J., Booth, M. 2017. Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 372, 20160088.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 13, 581–583.



- Canton, C., Ceballos, L., Domínguez, M.P., Fiel, C., Lirón, J.P., Moreno, L., Canton, L., Bernat, G., Lanusse, C., Alvarez, L.I. 2020. Impact on beef cattle productivity of infection with anthelmintic-resistant nematodes. *N Z Vet J.* 68, 187–192.
- Charlier, J., Demeler, J., Höglund, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Dorny, P., Vercruyse, J. 2010. *Ostertagia ostertagi* in first-season grazing cattle in Belgium, Germany and Sweden: general levels of infection and related management practices. *Vet Parasitol.* 171, 91–98.
- Chroust, K. 1982. Ostertagióza skotu. *Veterinářství*, 32: 119–120.
- Chroust, K. Problematika parazitóz u masných plemen skotu. Teslík a kol. Praha; Masný skot, 2000: 164–173.
- Chroust, K. 2006. Parazitózy masných plemen skotu v marginálních oblastech a jejich tlumení. *Veterinářství*, 56: 430–437.
- Dolinská, M., Ivanišínová, O., Königová, A., Várady, M. 2014. Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in Slovakia detected by in-vitro methods. *BMC Vet Res.* 10, 233.
- Foreyt, W.J., 2002. *Veterinary Parasitology Reference Manual*, 5th Edition. Wiley-Blackwell, USA.
- Gasser, R.B. 2006. Molecular tools - advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol.* 136, 69–89.
- Gomez, A., Petrzalková, K., Yeoman, C.J., Vlcková, K., Mrázek, J., Koppová, I., Carbonero, F., Ulanov, A., Modrý, D., Todd, A., Torralba, M., Nelson, K.E., Gaskins, H.R., Wilson, B., Stumpf, R.M., White, B.A., Leigh, S.R. 2015. Gut microbiome composition and metabolomic profiles of wild western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) reflect host ecology. *Mol Ecol.* 24, 2551–2565.
- Jiang, H., Lei, R., Ding, S.W., Zhu, S. 2014. Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC Bioinformatics.* 15, 182.
- McArthur, C.L., Bartley, D.J., Shaw, D.J., Matthews, J.B. 2011. Assessment of ivermectin efficacy against gastrointestinal nematodes in cattle on four Scottish farms. *Vet Rec.* 169, 658.
- McLeod, R.S. 1995. Costs of major parasites to the Australian livestock industries. *Int J Parasitol.* 25, 1363–1367.
- Modrý D., Pšenková I., Václavěk P., Ježková J., Malát K. Moderní přístupy v omezení ekonomického dopadu helmintóz v chovech masného skotu. Kde jsme a kudy dál. 2019. *Veterinářství* 69(12):867-871
- Pafčo, B., Čížková, D., Kreisinger, J., Hasegawa, H., Vallo, P., Shutt, K., Todd, A., Petrzalková, K.J., Modrý, D. 2018. Metabarcoding analysis of strongylid nematode diversity in two sympatric primate species. *Sci. Rep.* 8, 5933.
- Peng, X., Yu, K.Q., Deng, G.H., Jiang, Y.X., Wang, Y., Zhang, G.X., Zhou, H.W. 2013. Comparison of direct boiling method with commercial kits for extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNA tags. *J Microbiol Methods.* 95, 455–462.
- Ploeger, H.W., Borgsteede, F.H., Eysker, M., van den Brink, R. 1990. Effect of nematode infections on growth performance of calves after stabling on commercial dairy farms. *Vet Parasitol.* 36, 71–81.

- Rashid, M., Rashid, M.I., Akbar, H., Ahmad, L., Hassan, M.A., Ashraf, K., Saeed, K., Gharbi, M. 2019. A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle. *Parasitology*. 146, 129–141.
- Sapkota, R., Nicolaisen, M. 2015. High-throughput sequencing of nematode communities from total soil DNA extractions. *BMC Ecol*. 15, 3.
- Skorpikova, L., Reslova, N., Magdalek, J., Vadlejch, J., Kasny, M. 2020. The use of high resolution melting analysis of ITS-1 for rapid differentiation of parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Ashworthius sidemi*. *Sci Rep*. 10, 15984.
- Skuce, P.J., Morgan, E.R., van Dijk, J., Mitchell, M. 2013. Animal health aspects of adaptation to climate change: beating the heat and parasites in a warming Europe. *Animal*. 7, 333–345.
- Sutherland, I.A., Leathwick, D.M. 2011. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends Parasitol*. 27, 76–81.
- Vadlejch, J., Kyriánová, I.A., Várady, M., Charlier, J.. Resistance of strongylid nematodes to anthelmintic drugs and driving factors at Czech goat farms. *BMC Vet Res*. 17, 106.
- Wall, R. 2015. *Veterinary Parasitology*, 4th Edition. Wiley-Blackwell, USA.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A. 2014. PEAR: A fast and accurate Illumina paired-end read mergeR. *Bioinformatics*. 30, 614–620.

## Seznam publikací předcházející metodice

- Avramenko, R.W., Redman, E.M., Lewis, R., Yazwinski, T.A., Wasmuth, J.D., Gilleard, J.S. 2015. Exploring the gastrointestinal "Nemabiome": deep amplicon sequencing to quantify the species composition of parasitic nematode communities. *PLoS One*. 10, e0143559.
- Modrý D., Pšenková I., Václavěk P., Ježková J., Malát K. Moderní přístupy v omezení ekonomického dopadu helmintóz v chovech masného skotu. Kde jsme a kudy dál. 2019. *Veterinářství* 69(12):867-871
- Pafčo, B., Čížková, D., Kreisinger, J., Hasegawa, H., Vallo, P., Shutt, K., Todd, A., Petrželková, K.J., Modrý, D. 2018. Metabarcoding analysis of strongylid nematode diversity in two sympatric primate species. *Sci. Rep*. 8, 5933.

## Jména oponentů a názvy jejich organizací.

- MVDr. Adam Novobilský, PhD, Výzkumný ústav veterinárního lékařství
- MVDr. Petr Šatrán, Ph.D., Státní veterinární správa