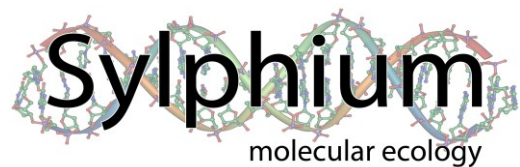


# Protocol detectie zwemmersjeuk m.b.v. eDNA



## Colofon

Titel	Protocol detectie zwemmersjeuk m.b.v. eDNA
Auteurs	dr. T.E Wallaart en dr. J.A. Warmink
Datum	31 augustus 2016
Pagina's	7
Status	Versie 2.1

© Sylphium Molecular Ecology

Sylphium Molecular Ecology (Handelsnaam van Eelco Wallaart bv) is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede schade welke voortvloeit uit toepassingen van dit protocol.

## Introductie

Het aantonen van de veroorzaker van zwemmersjeuk m.b.v. eDNA technologie kan op twee manieren worden uitgevoerd. De eerste manier betreft een methode van monstername waarmee antwoord wordt verkregen of *Trichobilharzia* cercariën (zwemmersjeuk veroorzakende larven van de parasiet) in een plas voorkomen. Deze manier van monstername wordt in dit protocol **aanwezigheidsbepaling** genoemd. Bij de tweede manier worden de monsters zodanige genomen dat er uitspraken kunnen worden gedaan over de locatie(s) waar *Trichobilharzia* cercariën in een plas voorkomt en welke delen vrij zijn van cercariën. Deze manier van monstername wordt in dit protocol **zone-sampling** genoemd en kan vooral interessant zijn voor grote recreatieplassen waarin verschillende gebieden / zones zijn te onderscheiden.

## Veiligheid

Om infectie met *Trichobilharzia* tijdens de monstername te voorkomen dienen de volgende veiligheidsmaatregelen in acht te worden genomen.

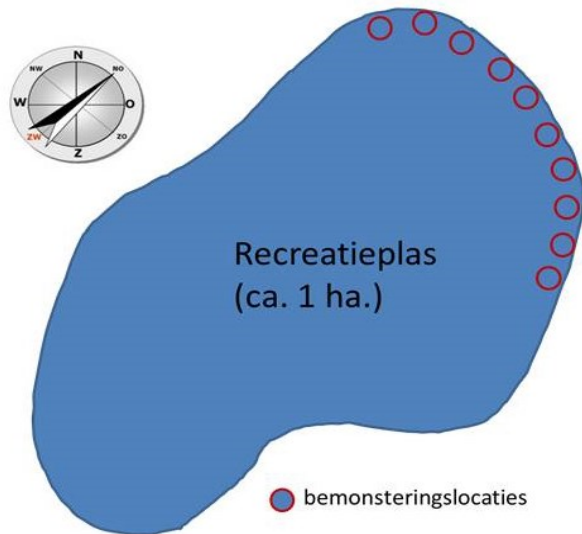
1. Vermijd contact van de huid met het zwemwater door waterdichte handschoenen te dragen tijdens het nemen van watermonsters en de handelingen met de filters.
2. Draag laarzen of een waadbreek.
3. Laat u niet verrassen door dieptes en/of zachte bodemdelen waar een gevaar voor wegzakken of vastzuigen bestaat.
4. Gebruik uw gezond verstand.

## Monstername

Om te weten te komen of er in een recreatieplas *Trichobilharzia* cercariën voorkomen is het belangrijk dat de trefkans bij het bemonsteren zo groot mogelijk is. Hierbij moet rekening worden gehouden met de locatie, tijdstip en de manier van bemonstering.

## Locatie en moment van bemonsteren

Voor het bepalen van de juiste bemonsteringslocatie is de windrichting belangrijk. Cercariën worden onder invloed van wind en stroming van het water verplaatst naar de oeverzone waar de wind aanlandig is (Zie fig. 1). Monsters moeten dus aan de zijde van de plas waar de wind aanlandig is (loefzijde) genomen worden. *Trichobilharzia* cercariën worden actief onder invloed van licht en warmte. De grootste trefkans zal behaald worden op een zonnige warme ochtend (bij voorkeur voor 10:00 uur), wanneer de cercariën massaal vrijkomen uit hun gastheer. Bemonsteren in de ochtend heeft eveneens als voordeel dat menging van het oppervlakte water met de diepere lagen door waterrecreatie nog niet heeft plaatsgevonden.



**Figuur. 1: Voorbeeld recreatieplas met bemonsteringslocaties en windrichting. De bemonstering vindt plaats aan de zijde van het water waar de wind aanlandig is. Tien monsters worden samengevoegd op één filter (aantal monsters per meer afhankelijk van grootte van het meer, zie tekst). Sylphium molecular ecology kan dit filter vervolgens analyseren op de aanwezigheid van *Trichobilharzia* DNA.**

### **Manier van bemonstering**

Om de kans op het aantreffen van *Trichobilharzia* cercariën zo groot mogelijk te maken worden de monsters op 10 verschillende plaatsen in de oeverzone aan de loefzijde van de recreatieplas genomen en gepoold (zie fig.1). De monsters worden met een één liter maatbeker genomen en over een door Sylphium geleverde filtereenheid (fig. 2) gefiltreerd. Omdat de *Trichobilharzia* cercariën vrijwel uitsluitend in de bovenste centimeters van de waterlaag voorkomen is het belangrijk dat de monsternamen in dit deel plaatsvindt. Neem een monster van ca. één liter door aan het wateroppervlak voorzichtig water in de maatbeker te laten stromen (niet onderdompelen). Giet de maatbeker vervolgens leeg in de filtereenheid. Herhaal deze handeling 9 maal, telkens op een andere plaats. Probeer de plaatsen van monsternamen gelijkmatig over de oeverzone te verdelen, bijvoorbeeld door steeds om de 5 of 10 meter langs de waterlijn (oever) een monster te nemen. Voorkom dat er plantendelen of andere grove partikels op het filter belanden. Maatbeker en filtereenheid hoeven tussen het nemen van deze 10 monsters niet schoongemaakt te worden. Aan het einde van de monsternamen sessie (bepaling) is er dus 10 liter water over het filter gegaan en wordt het filter uit de filtereenheid gehaald door de onderkant los te draaien. Rol of vouw het filter op en doe deze vervolgens in de meegeleverde 15 ml buis met conserveringsvloeistof (96% Ethanol).



figuur 2: De filtereenheid. Het filter wordt in de dop geplaatst en de dop wordt vervolgens op de filtereenheid geschroefd.

### **Verzending**

Vul het veldformulier (bijlage 1) volledig in vergeet hierbij vooral niet het buisnummer en het nummer van de filtereenheid op het formulier te vermelden. Doe de buis samen met het veldformulier vervolgens in de meegeleverde retourenveloppe. Deze retourenveloppe kan per reguliere post verzonden worden naar:

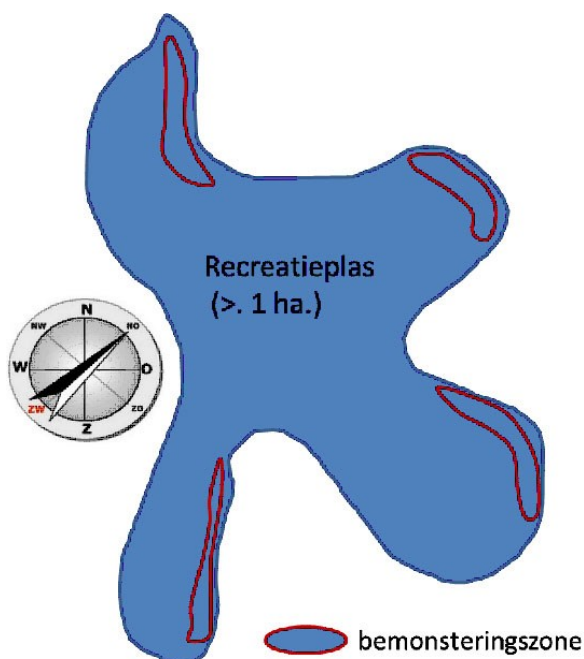
**Sylpium Molecular Ecology**  
**Postbus 11107**  
**9700CC Groningen.**

### **Aanwezigheidsbepaling**

Om enkel antwoord te krijgen op de vraag of er in een recreatieplas *Trichobilharzia* cercariën voorkomen kan de monstername worden uitgevoerd op de wijze zoals hierboven beschreven. Voor recreatieplassen met een oppervlak  $\leq$  één ha, kan meestal worden volstaan met een enkele bepaling (bestaande uit 10 gepoolde één liter monsters, zoals hierboven beschreven en in figuur 1). Voor grotere recreatieplassen wordt vooral gekeken naar de lengte van de oeverzone waar de wind aanlandig is. Is de oeverzone langer dan 100 meter dan wordt de vuistregel toegepast om per 100 meter recreatiestrand een afzonderlijke bepaling (bestaande uit 10 gepoolde één liter monsters die om de 10 meter worden genomen) uit te voeren.

## Zone sampling

Om te kunnen bepalen of besmetting met *Trichobilharzia* cercariën (alleen) in bepaalde delen van een recreatieplas voorkomt moet de monstername in zones worden uitgevoerd. Deze manier van monstername is alleen van toepassing op recreatieplassen met duidelijk te onderscheiden delen of gebieden (zones). Per gebied van een dergelijke recreatieplas wordt een aanwezigheidsbepaling uitgevoerd zoals hierboven beschreven. Hierbij dient het gebruikte materiaal (maatbeker, filtereenheid, laarzen en waterdichte handschoenen) tussen deze aanwezigheidsbepalingen goed gereinigd of vervangen te worden. Het filter van elke bepaling wordt in een afzonderlijke 15 ml buis met conserveringsvloeistof (96% Ethanol) gedaan. Op het veldformulier wordt duidelijk aangegeven welk deel van de recreatieplas het betreft. Bij voorkeur worden de GPS coördinaten van het bemonsterde gebied op het veldformulier weergegeven.



**Figuur 2:** Voorbeeld bemonstering van een grotere recreatieplas met aanwijsbare zones. Door bij de bemonstering rekening te houden met de windrichting kan bepaald worden waar in de plas (zone) de besmette slakken zich bevinden.

## Reiniging materiaal

Detectie van *Trichobilharzia* middels eDNA is een zeer gevoelig technologie. Minieme verontreinigingen met DNA van een vorige monstername kunnen vals-positieve resultaten opleveren. Dit kan worden voorkomen door de maatbeker en de filtereenheid na de monstername te wassen met bleekwater (verkrijgbaar in de supermarkt). Hierbij wordt gebruik gemaakt van een waterbak met daarin een 10 maal verdunde bleek oplossing waarin het materiaal gewassen wordt en minimaal tien minuten in blijft liggen. Vervolgens wordt het materiaal goed afgespoeld met (leiding)water. Het materiaal is nu weer bruikbaar voor de volgende monstername. Bij het plaatsen van een nieuw filter moet controleert worden of het filter nog goed zit na het aandraaien van de schroefring.

In sommige gevallen kan het voorkomen dat het filter na het aandraaien niet goed aansluit. Het filter natmaken met kraanwater voor het aandraaien van de schroefring kan helpen.

## **Bijlage 1: Veldformulier**

Naam monsternemer:

Naam organisatie:

Datum:

Buis nr.

Filtereenheid nr.

Locatie:

(Eventueel GPS coördinaten:)