

Výskyt patogenní plísně *Batrachochytrium dendrobatidis* v rámci evropsky významných lokalit našich obojživelníků

The presence of pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* within Czech amphibian Sites of Community Importance

JIRÍ VOJAR¹, MILIČ SOLSKÝ¹, VOJTĚCH BALÁŽ^{2,3}, LENKA JEŘÁBKOVÁ⁴

¹Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21, Praha – Suchbát, vojar@fzp.czu.cz, solsky@fzp.czu.cz

²Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42, Brno, vojtech_balaz@hotmail.com

³Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42, Brno

⁴Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Kaplanova 1931/1, Praha 11, 148 00, lenka.jerabkova@nature.cz

Abstract: Chytridiomycosis, a serious amphibian disease caused by the chytrid fungi *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) and *B. salamandrivorans* (*Bsal*), is recognized as a global threat to amphibian biodiversity. Since 2008, surveys conducted on populations of wild amphibians have detected *Bd* infections in most species in the Czech Republic. The Fire-bellied toads (*Bombina bombina* and *B. variegata*), both species of European interest, are taxa that frequently carry the pathogen. The goal of our study was to conduct the first systematic survey of *Bd* occurrence in both *Bombina* species within Sites of Community Importance (SCI). The complete dataset contains 605 samples from 27 localities. We found 78 samples as *Bd* positive (11 %). However, the pathogen was confirmed in most localities (18, i.e. 67 %). In total, 11 species were sampled, and the fungus was detected in 5 taxa – the Alpine newt *Ichthyosaura alpestris*, the Smooth newt *Lissotriton vulgaris*, the Fire-bellied toad *Bombina bombina*, the Yellow-bellied *B. variegata* and the water frog genus *Pelophylax*. Despite the widespread presence of the pathogen, we did not observe any symptom of the disease or related mortality. Because of the potential danger of the pathogen, following preventive measures and hygiene protocols is necessary.

Keywords: Amphibia, amphibian conservation, chytridiomycosis, qPCR, infectious diseases, Natura 2000

Abstrakt: Chytridiomykóza je globálně rozšířené vážné onemocnění obojživelníků způsobené patogenními houbami *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) a *B. salamandrivorans* (*Bsal*). V České republice probíhá sledování prvně jmenované plísně od roku 2008, přičemž doposud byla zjištěna v rámci celé republiky u většiny vzorkovaných druhů včetně evropsky významných, kam náleží i obě naše kuňky rodu *Bombina*. Právě kuňky náleží u nás, ale i v Evropě, mezi citlivé druhy s nejvyšším podílem nakažených jedinců. Cílem naší studie bylo sledování přítomnosti plísně *Bd* na vybraných evropsky významných lokalitách obou druhů našich kuněk. Celkově bylo odebráno 605 vzorků na 27 lokalitách, z nichž 78 (11 %) bylo pozitivních na přítomnost patogenu. Bylo však zjištěno, že patogen je přítomen na většině lokalit (18, tj. 67 %). U 5 z 11 vzorkovaných druhů byla přítomnost plísně potvrzena, šlo o čolka horského (*Ichthyosaura alpestris*), č. obecného (*Lissotriton vulgaris*), kuňku obecnou (*Bombina bombina*), k. žlutobřichou (*B. variegata*) a skokany rodu *Pelophylax*. Přestože je plíseň v našich podmínkách poměrně rozšířená, nebyly v rámci sledovaných lokalit pozorovány příznaky nemoci ani úmrtí s ní prokazatelně spojená. S ohledem na potenciální nebezpečí patogenu je však nezbytné dodržovat příslušná preventivní hygienická opatření.

Klíčová slova: Obojživelníci, ochrana obojživelníků, chytridiomykóza, qPCR, infekční nemoci, Natura 2000.

Úvod

Chytridiomykóza je vážné onemocnění obojživelníků (BERGER et al. 1998), způsobující poškození a ztrátu funkčnosti jejich pokožky (BERGER et al. 1999). Původcem této choroby jsou chytridiomycetní houby – *Batrachochytrium dendrobatidis* (dále jen *Bd*, LONGCORE et al. 1999) a teprve nedávno objevený druh *B. salamandrivorans* (*Bsal*), napadající pouze ocasaté obojživelníky (MARTEL et al. 2013, 2014). Základní informace o této nemoci, resp. o jejím původu *Bd*, byly prezentované před několika lety v časopisu Ochrana přírody (CIVIŠ et al. 2010). Výzkum se ovšem za posledních několik let výrazně posunul, proto je v rámci této kapitoly věnován větší prostor shrnutí aktuálních poznatků stran základní charakteristiky, působení, přenosu i původu patogenu *Bd*, jeho současnému rozšíření a dále dopadům onemocnění na druhy, populace i jedince včetně popisu typických příznaků nemoci. Vzhledem k tomu, že článek shrnuje výsledky projektu věnovanému patogenu *Bd*, je rešeršní část věnována pouze tomuto druhu.

Základní charakteristika, působení a přenos patogenu

Patogen *B. dendrobatidis* náleží do kmenu Chytridiomycota, řádu Rhizophydiales. Obecně jsou chytridiomycetní houby běžně rozšířené – lze je nalézt především ve sladkých vodách a vlhké půdě, kde rozkládají celulózu, chitin a keratin (FISHER et al. 2009). Naprostá většina parazitických druhů je vázána na řasy, vyšší rostliny, mikroskopické organismy či bezobratlé (DASZAK et al. 1999).

Patogen *Bd* se vyskytuje ve dvou základních formách – jako kulovité přisedavé zoosporangium či pohyblivá zoospora (LONGCORE et al. 1999). Ta při kontaktu se substrátem/pokožkou obojživelníka encystuje (tj. vstřebá svůj bičík, vytvoří buněčnou stěnu a rhizoidy, jimiž se přichytí k povrchu substrátu) a během 4–5 dnů se stane zoosporangiem schopným opět produkovat zoospory (JOHNSON & SPEARE 2003; BERGER et al. 2005). Ty mohou žít ve vodě několik týdnů, mají však omezenou pohyblivost (v řádech cm), a proto většina zoospor encystuje a napadá buňky v bezprostředním okolí svého vývoje. Poškozená zrohovatělá kůže nakaženého jedince hůře zajišťuje kožní dýchání i vstřebávání vody. V důsledku rozvratu osmoregulačních funkcí tak dochází k poruchám vedení vzruchů a nakonec k srdeční zástavě nakaženého jedince (VOYLES et al. 2009).

Patogen se tak přirozeně šíří hlavně pomocí blízkého nebo přímého kontaktu s nakaženým jedincem (PIOTROWSKI et al. 2004). Bylo však zjištěno, že zoospory mohou perzistovat na končetinách i křídlech vodních ptáků či v trávicím traktu raků, kteří tak mohou být dalšími přirozenými vektory nemoci (GARMYN et al. 2012; McMAHON et al. 2013; BRANNELLY et al. 2015). Šíření patogenu, často na značné vzdálenosti, významně podporuje i člověk. Děje se tak především v rámci mezinárodního obchodu s obojživelníky určenými na chov, ke konzumaci či pro vědecké účely (např. WELDON et al. 2004; GARNER et al. 2006; FISHER & GARNER 2007; UNE et al. 2008; SCHLOEGEL et al. 2009). Nákaza se může šířit i nedodržováním hygienických pravidel, např. během výzkumu, či dokonce v důsledku aktivit konaných na ochranu obojživelníků, jako jsou záchranné transfery obojživelníků putujících přes komunikace (CIVIŠ et al. 2010).

Rozšíření patogenu a dopady nemoci na obojživelníky

Patogen *Bd* byl doposud zjištěn u více než stovek druhů obojživelníků na území všech kontinentů, vyjma Antarktidy (VAN SLUYS & HERO 2009). Přes 200 druhů žab díky této nemoci již vyhynulo či je vyhynutím bezprostředně ohroženo (SCHEELE et al. 2019; SKERRATT et al. 2007). Mezi nakaženými jsou zástupci všech tří skupin obojživelníků, převážně žáby (OLSON et al. 2013). Patogen se vyskytuje v různých podmínkách prostředí, od nížin po vysokohorské polohy přes 5000 m n. m. v peruánských Andách (SEIMON et al. 2007). Dopady nemoci se výrazně liší nejen mezi druhy (FISHER et al. 2009; KILPATRICK et al. 2010), ale rovněž v různých částech světa. Zatímco Austrálie, Střední a Severní Amerika či jižní Evropa představují oblasti, kde byly zjištěny vážné průběhy nákaz včetně velmi rychlých vyhynutí celých druhů; v subsaharské Africe, dále v Asii, Brazílii a v severní Evropě patogen tak vážné problémy (zatím) nepůsobí (shrnuje v publikacích VAN ROOIJ

et al. 2015; BERGER et al. 2016). Naše dosavadní poznatky doplňují, že jednou z takových rezistentních oblastí může být i střední Evropa včetně České republiky (ČR, BALÁŽ et al. 2014a, b, viz dále).

V Evropě byla plíseň *Bd* zjištěna nejméně u třetiny volně žijících druhů na území téměř 20 států (GARNER et al. 2005; WOOD et al. 2009; BALÁŽ et al. 2014a) včetně ČR. Nejohroženější oblastí je jižní část kontinentu, kde nemoc způsobila masové úhyny ropušek starostlivých (*Alytes obstetricans*; BOSCH et al. 2001), ale i dalších druhů, např. mloků skvrnitých (*Salamandra salamandra*) ve Španělsku (BOSCH & MARTÍNEZ-SOLANO 2006). Podobně jako v globálním měřítku, ani citlivost evropských druhů není konstantní – mezi nejzranitelnější taxony patří čeledi *Alytidae* a *Bombinatoridae*, naopak nízké intenzity nákazy byly zjištěny u skokanů rodu *Rana*. Skokani rodu *Pelophylax* bývají sice často (a někdy i intenzivně) infikováni (BALÁŽ et al. 2014b), patří však mezi odolné druhy, schopné tento patogen šířit do dalších oblastí (BALÁŽ et al. 2014a).

Na našem území je výskyt *Bd* monitorován ve volné přírodě od roku 2008 (CIVIŠ et al. 2010; 2012), v chovech obojživelníků pak od roku 2013 (HAVLÍKOVÁ et al. 2015). Dosud byl patogen zjištěn u nejméně devíti druhů volně žijících obojživelníků, a to na většině testovaných lokalit (BALÁŽ et al. 2014b). Nicméně úmrť jedinců spojená s touto nemocí jsou u nás zjištěna ojediněle (BALÁŽ et al. 2013), mohou však snadno unikat pozornosti. Nejčastěji nakaženými druhy bývají kuňky (*Bombina* spp.) a skokani rodu *Pelophylax* (BALÁŽ et al. 2014a,b). Výzkumem patogenu se zabývá tým odborníků z Fakulty životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze a Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně, ve spolupráci s dalšími subjekty, jako např. Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR či společností NaturaServis, s.r.o.

Symptomy onemocnění

Obojživelníci napadení plísní *Bd* mohou zemřít, být nemocní nebo na první pohled zcela v pořádku (CIVIŠ 2010). Mezi základní symptomy náleží rohovatění pokožky a změny chování nakaženého jedince (BERGER et al. 1998). Typická je strnulost v nepřírozené poloze, sezení se zadními nohama nepřírozně daleko od těla, dále letargie, neochota k úniku a ztráta přirozených reflexů či omezené pohybové schopnosti doprovázené menší úspěšností při lovu potravy (HANLON et al. 2015). Infikovaní, ale bez problémů přežívající pulci vykazují nízkou pohybovou aktivitu. Tím snižují svou nápadnost pro predátory a prodlužují svůj vývoj. Snížená predace tak tohoto patogenu zvyhodňuje (PARRIS et al. 2006), neboť pulci jsou vůči nákaze imunní, na rozdíl od metamorfovaných jedinců. Klinické příznaky u dospělých jsou mnohem výraznější a nemoc může mít i fatální dopady. Obojživelníci s vysokými intenzitami infekce jsou typičtí ohniskovým rohovatěním pokožky (hyperkeratóza). Bylo pozorováno její abnormální odlupování, epidermální hnisání, výrony v kůži, svalech nebo očích a hyperémie (překrvení) břišní části kůže a chodidel včetně prstů (DASZAK et al. 1999).

S ohledem na počet dotčených druhů a často velmi vážný průběh nákazy, je chytridiomycóza považována za doposud nejhorší infekční onemocnění obratlovců (GASCON et al. 2007). V roce 2001 byla tato nemoc umístěna na seznam nemocí divoce žijících zvířat (Wildlife Disease List) Světové organizace pro zdraví zvířat (OIE) jako vůbec první nemoc obojživelníků (JOHNSON & SPEARE 2003).

Cíle

V rámci osmiletého sledování plísně *Bd* bylo u nás provedeno již několik tisíc analýz vzorků odebraných z desítek lokalit, nicméně systematické sledování patogenu *Bd* v rámci evropsky významných lokalit (EVL) doposud realizováno nebylo. Toto umožnil až projekt financovaný z Norských fondů zabývající se monitoringem předmětů ochrany v rámci EVL. Hlavním cílem bylo zjistit, zdali a do jaké míry jsou evropsky významné druhy infikovány patogenem *Bd* a jaké má tato plíseň dopady na jedince i sledované populace. Získané výsledky o presenci/absenci patogenu byly dále použity ke komplexnímu zhodnocení výskytu patogenu u nás a na základě statistických modelů jsme se pokusili předpovědět parametry prostředí, které by mohly výskyt patogenu *Bd* ovlivňovat.

Metodika

Výběr modelových druhů a lokalit

Jakožto modelové druhy byly vybrány obě naše kuňky rodu *Bombina*. Společně se čtyřmi druhy čolků – č. karpatským (*Lissotriton montandoni*), č. velkým (*Triturus cristatus*), č. dunajským (*T. dobrogicus*) a č. dravým (*T. carnifex*) – jsou evropsky významnými druhy. Současně jde o druhy s nejvyšším podílem nakažených jedinců u nás; v případě kuňky žlutobřiché byl zaznamenán i jeden z mála úhynů jedince v důsledku onemocnění chytridiomýkózou (BALÁŽ et al. 2014a). Kromě toho jde o druhy, jež je ve srovnání s výše jmenovanými čolky možné snadněji odchytit, a tudíž provést nezbytný odběr vzorků.

Cílem projektu bylo provést odběry vzorků na zhruba 20 lokalitách (po 10 pro každý druh), pokud možno rovnoměrně v rámci celé České republiky, resp. v rámci areálu rozšíření obou druhů u nás. Dalším kritériem pro výběr vhodných EVL byla přítomnost početných populací a takové podmínky prostředí, které umožní odchyt dostatečného počtu jedinců. Snahou bylo odchytit nejméně 20, ideálně však 30 jedinců na lokalitě, protože pouze v případě dostatečného počtu vzorků lze zjištění eventuální absence patogenu na lokalitě považovat za věrohodné. Výběr lokalit probíhal na základě spolupráce s garantem monitoringu obojživelníků a plazů z AOPK ČR, Lenkou Jefábkovou, i ve spolupráci s místními odborníky.

Celkem bylo v rámci řešení projektu navštíveno 42 lokalit, tedy zhruba jedna třetina z celkového počtu EVL vyhlášených pro oba druhy (92 EVL je vyhlášeno pro k. obecnou a 21 pro k. žlutobřichou). Do projektu byly zahrnuty i čtyři EVL, v rámci kterých sice kuňky nejsou předmětem ochrany, ale vyskytují se zde ve stabilních populacích. Důvodem pro návštěvu více než dvojnásobného množství lokalit oproti původním záměrům byla zejména absence či nedostatečný počet kuněk, ale i jakýchkoliv dalších druhů obojživelníků. Tento stav lze připsat jednak nepříznivému průběhu počasí v létě 2015, kdy probíhaly terénní práce, které bylo extrémně suché a horké, a také nevyhovujícím podmínkám prostředí na řadě EVL, zejména v důsledku absence vhodného managementu lokalit.

Odběr a analýzy vzorků

Samotný odběr vzorků – kožních stěrů – probíhal speciálními vatovými štětičkami Dry-swab™ MW 100. Jde o nedestruktivní metodu, v rámci které se několika tahy štětičkou přejede po břiše, bocích, hřbetu a končetinách vzorkovaného jedince. Po odebrání vzorku byl jedinec okamžitě vrácen na místo odchytu. Získaný stěr byl až do zpracování uchován v originálním obalu výtěrnice, a to v lednici při teplotě 4 °C. Při manipulaci s obojživelníky byla dodržována veškerá hygienická pravidla pro zamezení přenosu nákazy mezi jedinci i populacemi, zejména šlo o používání jednorázových gumových rukavic pro manipulaci s každým jedincem, dále o vysušení, desinfekci či výměnu podběráků i vysokých holínek mezi odběry vzorků na jednotlivých lokalitách.

Patogen, konkrétně jeho presence a prevalence (viz dále), byl detekován na základě přítomnosti jeho DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (qPCR), za použití příslušných primerů a podle postupů dle standardizovaných protokolů (BOYLE et al. 2004; HYATT et al. 2007). Intenzita nákazy byla u pozitivních jedinců vyjadřována pomocí hodnoty GE (genomic equivalent), představující počet zoospor na stěr. Za hraniční hodnotu, odkdy je infekce zpravidla letální, je považováno GE = 10000 (VREDENBURG et al. 2010).

Výsledky a diskuse

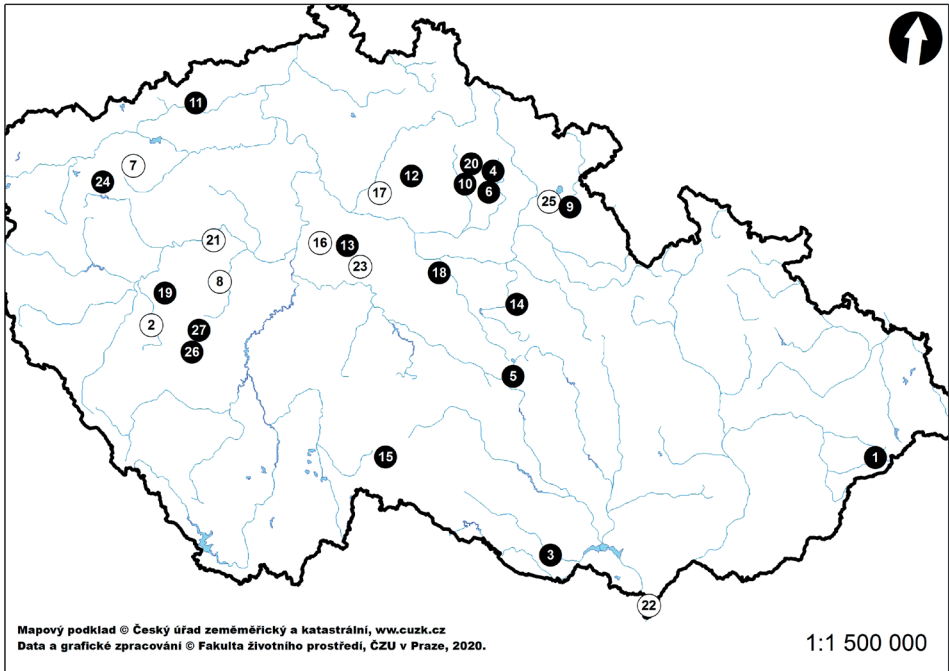
Zhodnocení výskytu patogenu u nás

V průběhu jara a léta 2015 bylo odebráno a následně analyzováno celkem 605 vzorků z 27 lokalit, převážně EVL obou druhů kuněk. Podíl jedinců s prokázanou přítomností patogenu dosahoval v průměru 11 % (tab. 1), nicméně velmi se lišil mezi lokalitami (tab. 2). Tyto údaje odpovídají dosavadním zjištěním z našeho území, kdy podíly nakažených jedinců dosahovaly kolem 10 % (CIVIŠ et al. 2012; BALÁŽ et al. 2014b). Zjištěné intenzity infekce se pohybovaly na nízké úrovni většinou v řádech jednotek GE; nebyly zaznamenány ani žádné viditelné projevy nemoci či úmrtí s ní spojená. Na druhou stranu se potvrdilo, že plíseň *Bd* je u nás plošně rozšířeným druhem, neboť její přítomnost byla zjištěna na dvou třetinách vzorkovaných lokalit (obr. 1). Podobná situace stran výskytu plísně *Bd* je i v dalších zemích střední Evropy – v Rakousku (SZTATECSNY & GLASER 2011), Německu (OHST et al. 2011) či Polsku (SURA et al. 2010). Nálezy patogenu v dalších, dosud neprozkoumaných místech Evropy, jsou tak spíše otázkou intenzity výzkumu, jak se také potvrzuje na základě nových poznatků z východní Evropy (např. VOJAR et al. 2017).

Co se týče srovnání mezi druhy, plíseň *Bd* byla zjištěna u 5 z 11 vzorkovaných druhů. Šlo o čolka horského (*Ichthyosaura alpestris*), č. obecného (*Lissotriton vulgaris*), kuňku obecnou (*Bombina bombina*), k. žlutobříchou (*B. variegata*) a skokany rodu *Pelophylax* (tab. 1 a 2). Nejvyšší podíl jedinců s přítomností plísně byl zjištěn u posledně jmenovaných skokanů (23 %). Mezi kuňkami dosahovala signifikantně vyššího zastoupení nakažených jedinců k. obecná (14 %), zatímco u k. žlutobřiché byla houba potvrzena pouze u 5 % jedinců (Fisherův exaktní test; $p = 0,004$). U čolků byly počty vzorkovaných jedinců tak nízké, že neumožňovaly jejich zhodnocení. Poměrně vysoký podíl infikovaných skokanů rodu *Pelophylax*, a zejména kuněk *B. bombina* (tab. 2), je v souladu s dosavadními zjištěními jak z České republiky (BALÁŽ et al. 2014a), tak z celého evropského kontinentu (např. GARNER et al. 2005; BALÁŽ et al. 2014b; VOJAR et al. 2017). Byla potvrzena úloha skokanů rodu *Pelophylax*, coby potenciálních vektorů nemoci (BALÁŽ et al. 2014a), zejména za situace, kdy sami tito skokani jsou vůči ní imunní (WOODHAMS et al. 2012).

Možnosti prevence a ochrany

Z důvodu respektování pravidla předběžné opatrnosti je nutné dodržovat základní hygienická pravidla týkající se manipulace s obojživelníky, ale i jejich mapování či monitorování. Ta se týkají všech, kdo přicházejí s obojživelníky do styku, bez ohledu na to, zdali se jedná o volně žijící obojživelníky nebo obojživelníky chované v zajetí. Jejich dodržování je nezbytné zejména na místech s prokázaným výskytem patogenu. Hlavní zásadou manipulace s obojživelníky je minimalizace přímého kontaktu s nimi. Pokud k němu dojde, je třeba si ruce umýt a osušit/vydesinfikovat nebo si vzít nový pár gumových rukavic před tím, než se dotkneme dalšího jedince. Doporučuje se rovněž používat nástrojů na jedno použití. Při přesunech z lokality na lokalitu je důležité zabránit možnému šíření patogenů na nová území prostřednictvím obuvi, výzkumných nástrojů apod. Obuv proto musí být úplně vyčištěná a dezinfikovaná, důležité je z obuvi seškrábat veškeré bahno a namočit podrážku do dezinfekčního roztoku. Další vybavení, jako například podběráky, posuvná měřidla atd., musí být před použitím na jiné lokalitě čistě a dezinfikované. Nejšetnější metodou desinfekce je úplné vysušení vybavení na slunci po dobu nejméně tří hodin (WILLIAMS et al. 2002). Dezinfekční roztoky pak nesmějí přijít do styku s žádným obojživelníkem ani nesmějí kontaminovat žádnou vodní nádrž (JOHNSON & SPEARE 2003; CIVIŠ et al. 2010).



Obr. 1. Mapa vzorkovaných lokalit. Černými body jsou označeny lokality s pozitivními nálezy *Bd*, bílými s negativními. Číslo lokalit odpovídá tabulce 2.

Fig. 1. Map of sampled localities. *Bd* positive localities are marked black, *Bd* negative localities are marked white. The locality numbers are stated in table 2.

Tab. 1. Přehled vzorkovaných druhů.

Table 1. Summary of sampled species.

Vzorkované druhy	n vzorků	n lokalit	n pozitivních vzorků	n pozitivních lokalit
<i>Bombina bombina</i> , kuňka obecná (<i>BoBo</i>)	370	17	53 (14 %)	13 (76 %)
<i>Bombina variegata</i> , kuňka žlutobíhčí (<i>BoVa</i>)	111	5	5 (5 %)	2 (40 %)
<i>Pelophylax esculentus</i> complex (<i>PeEscom</i>)	78	9	18 (23 %)	5 (56 %)
<i>Lissotriton vulgaris</i> , čolek obecný (<i>LiVu</i>)	22	7	1 (5 %)	1 (14 %)
<i>Ichthyosaura alpestris</i> , čolek horský (<i>IchAl</i>)	2	2	1 (50 %)	1 (50 %)
<i>Triturus cristatus</i> , čolek velký (<i>TrCr</i>)	3	2	0	0
<i>Rana temporaria</i> , skokan hnědý (<i>RaTe</i>)	5	3	0	0
<i>Rana dalmatina</i> , skokan štlhý (<i>RaDa</i>)	2	2	0	0
<i>Bufo bufo</i> , ropucha obecná (<i>BuBu</i>)	10	1	0	0
<i>Bufo viridis</i> , ropucha zelená (<i>BuVi</i>)	1	1	0	0
<i>Pelobates fuscus</i> , blatnice skvrnitá (<i>PeFu</i>)	1	1	0	0
Souhrn ¹ /Průměr ²	605 ¹		78 ¹ (11 ²)	18 ¹ (37 ²)

Tab. 2. Přehled vzorkovaných lokalit. Tučně zvýrazněné jsou pozitivní vzorky. Uvedené zkratky jednotlivých druhů jsou vysvětleny v tabulce 1. Dále se jedná o tyto druhy: *PeRi*=*Pelophylax ridibundus*, skokan skřehotavý; *PeEs*=*Pelophylax esculentus*, skokan zelený; *PeLe*=*Pelophylax lessonae*, skokan krátkonohý.

Table 2. Summary of sampled localities. Positive samples are in bold. Acronyms used are stated in table 1. Acronyms used for the species are: *PeRi*=*Pelophylax ridibundus*; *PeEs*=*Pelophylax esculentus*; *PeLe*=*Pelophylax lessonae*.

Lokalita	Název EVL	Počet vzorků/pozitivních (%)	Vzorkované druhy (počet vzorků/pozitivních)
1	Beskydy	18/2 (11 %)	BoVa (18/2)
2	Blovice	31/0	BoVa (30), LiVu (1)
3	Božický mokřad	20/5 (25 %)	BoBo (20/5)
4	Byšičky	33/2 (7 %)	BoBo (3), PeRi(30/2)
5	Dívka	1/1 (100 %)	BoBo (1/1)
6	Dobrá Voda (není EVL)	35/8 (23 %)	BoBo (35)
7	Doupovské hory	10/0	BuBu (10)
8	Felbabka	30/0	BoVa (16), LiVu (13), TrCr (1)
9	Halín	11/5 (63 %)	BoBo (8/5), RaTe (3)
10	Hluboký Kovač	30/9 (30 %)	BoBo (30/9)
11	Kopistická výspka	30/3 (10 %)	BoBo (30/3)
12	Ledce (není EVL)	30/1 (3 %)	BoBo (30/1)
13	Lom Na Plachtě	34/4 (12 %)	BoBo (31/4), LiVu(1), TrCr (1+larva)
14	Malá Straka	27/12 (44 %)	BoBo (24/10), PeEscom (3/2)
15	Malý Bukač	14/8 (57 %)	PeEscom (12/7), LiVu (1/1), PeFu (1)
16	Milíčovský les	2/0	BoBo (2)
17	Milovice - Mladá	30/0	BoBo (26), PeRi (4)
18	Nový rybník u Kačiny	30/6 (20 %)	BoBo (30/6)
19	Rokycany – cvičiště	20/3 (12 %)	BoVa (15/3), LiVu (3), PeEs (1), RaDa (1)
20	Rybník Strašidlo	64/6 (9 %)	BoBo (64/6)
21	Skočová – pískovna	36/0	BoVa (32), LiVu (2), IchAl(1), RaDa (1)
22	Soutok - Podluží	15/0	BoBo (15)
23	Šachovec	1/0	RaTe (1)
24	Toto Karo (není EVL)	16/6 (38 %)	PeEscom (16/6)
25	Tuří rybník	4/0	PeRi (1), BoBo (2), PsVi (1)
26	Újezdec	30/4 (11 %)	BoBo (19/3), PeEs(7), PeLe(3/1), LiVu(1)
27	Volts (není EVL)	3/1 (33 %)	RaTe (1), PeRi (1), IchAl (1/1)

Shrnutí

Výzkum patogenu *Bd* probíhá v ČR od roku 2008. V rámci příspěvku jsou zde prezentovány výsledky projektu, jenž se v letech zabýval 2015–2016 sledováním patogenu *Bd* v rámci evropsky významných lokalit kuňky obecné a k. žlutobřiché. Zjištěné výsledky korespondují s dosavadními poznatky z našeho území, kdy většina nakažených jedinců vykazovala nízkou míru infekce. Další pozornost v rámci výzkumu je třeba zaměřit především na citlivé druhy (kuňky) a potenciální vektory patogenu, skokany rodu *Pelophylax*. Co se týče plísně *Bd*, je zcela nezbytné dodržovat opatření zamezující šíření tohoto druhu, jehož působení v budoucnu, zejména s ohledem na probíhající klimatické změny, nelze předpovídat a rozhodně ne podceňovat.

Zcela novou hrozbou pro naše ocasaté obojživelníky je nedávno objevený další druh plísně – patogen *B. salamandrivorans* (*Bsal*, MARTEL et al. 2013), který je schopen zabíjet většinu evropských druhů ocasatých a do Evropy se dostává importem z chovů asijských mloků a čolků (MARTEL et al. 2014). S ohledem na závažnost působení této plísně, Stálý výbor Bernské úmluvy vydal doporučení č. 176 (2015), kde členským zemím mj. ukládá zavést systematický monitoring patogenu, připravit akční plány zajišťující prevenci šíření nemoci a zavést systém její kontroly včetně povinnosti podávání příslušných reportů. Jednání týkající se těchto aktivit již byla s odpovědnými orgány státní správy – MŽP ČR, AOPK ČR a Ústřední veterinární správou – v tomto roce zahájena. Současně byl zahájen intenzivní monitoring patogenu *Bsal* u ocasatých obojživelníků jak ve volné přírodě, tak v jejich chovech. Pozornost je třeba věnovat i osvětě, a to prostřednictvím internetových stránek, přednášek a odborných článků. Zcela zásadní je u tohoto druhu dodržování hygienických pravidel, aby bylo zamezeno příp. šíření nákazy z chovů do volné přírody.

Summary

The monitoring of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) has been carried out in the Czech Republic since 2008. Here, we present the results of two years of monitoring (2015–2016) within Czech Special Areas of Conservation. These areas were established for the protection of the Fire-bellied Toad and the Yellow-bellied Toad. Although the pathogen was found in study sites, most infected animals showed a low rate of infection. Further research should mainly focus on sensitive species (genus *Bombina*) and resistant ones that could serve as vectors of the pathogen (e.g. frogs of the genus *Pelophylax* spp.). To prevent the spread of this fungus, it is essential to establish and maintain appropriate measures.

However, a recently-discovered novel pathogen, *B. salamandrivorans* (*Bsal*, MARTEL et al. 2013), is lethal to most European newts and salamanders. The species has been introduced to Europe from Asia through the trade of pet amphibians (MARTEL et al. 2014). The Standing Committee of the Berne Convention issued Recommendation No. 176 (2015). This recommendation requires EU members to implement systematic pathogen monitoring, prepare action plans to prevent pathogen spread and implement a control system that includes reporting obligations. The responsible state administration authorities - the Ministry of the Environment of the Czech Republic, the Nature Conservation Agency, and the State Veterinary Institute in Prague - together with the fungus monitoring in wild populations and captive collections of amphibians, have already begun negotiations to implement these recommendations. Educating the public, amphibian breeders and conservationists, and enforcing strict hygiene rules are essential to avoid the spread of the pathogen in the Czech Republic.

Poděkování

Autoři by rádi poděkovali svým kolegům za pomoc při sběru dat, jmenovitě pak zejména D. Budské, J. Doležalové, P. Chajmovi, M. Šikolovi, M. Šanderovi, J. Kovářovi. Výzkum realizován v rámci projektu podpořeného Norských fondů č. EHP-CZ02-OV-1-024-2015. Manipulace s jedinci zvláště chráněných druhů probíhala na základě spolupráce s AOPK ČR.

Literatura

- BALÁŽ V., KUBEČKOVÁ M., CIVIŠ P., ROZÍNEK R. & VOJAR J. (2013): Fatal chytridiomycosis and infection loss observed in captive toads infected in the wild. – *Acta Veterinaria Brno* 82: 351–355. doi:10.2754/avb201382040351
- BALÁŽ V., VÖRÖS J., CIVIŠ P., VOJAR J., HETTYEY A., SÓS E., DANKOVICS R., JEHL R., CHRISTIANSEN D. G., CLARE F., FISHER M. C., GARNER T. W. J. & BIELBY J. (2014a): Assessing risk and guidance on monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through identification of taxonomic selectivity of infection. – *Conservation Biology* 28: 213–223. doi:10.1111/cobi.12128
- BALÁŽ V., VOJAR J., CIVIŠ P., ANDERA M. & ROZÍNEK R. (2014b): Chytridiomycosis risk among Central European amphibians based on surveillance data. – *Diseases of Aquatic Organisms* 112: 1–8. doi:10.3354/dao02799
- BERGER L., SPEARE R. & HYATT A. (1999): Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. *Declines and disappearances of Australian frogs*. – Environment Australia, Canberra 1999: 23–33.
- BERGER L., HYATT A. D., SPEARE R. & LONGCORE J. E. (2005): Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. – *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 51–63.
- BERGER L., ROBERTS A. A., VOYLES J., LONGCORE J. E., MURRAY K. A. & SKERRATT L. F. (2016): History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. – *Fungal Ecology* 19: 89–99. doi:10.1016/j.funeco.2015.09.007
- BERGER L., SPEARE R., DASZAK P., GREEN D. E., CUNNINGHAM A. A., GOGGIN C. L., SLOCOMBE R., RAGAN M. A., HYATT A. D., McDONALD K. R., HINES H. B., LIPS K. R., MARANTELLI G. & PARKES H. (1998): Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 9031–9036. doi:10.1073/pnas.95.15.9031
- BRANNELLY L., MCMAHON T., HINTON M., LINGER D. & RICHARDS-ZAWACKI C. (2015): *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural and farmed Louisiana crayfish populations: prevalence and implications. – *Diseases of Aquatic Organisms* 112: 229–235. doi:10.3354/dao02817
- BOSCH J., MARTÍNEZ-SOLANO I. & GARCÍA-PARÍS M. (2001): Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. – *Biological Conservation* 97: 331–337. doi:10.1016/S0006-3207(00)00132-4
- BOSCH J. & MARTÍNEZ-SOLANO I. (2006): Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain. – *Oryx* 40(1): 84–89. doi:10.1017/S0030605306000093
- BOYLE D., BOYLE D., OLSEN V., MORGAN J. & HYATT A. (2004): Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. – *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 141–148. doi:10.3354/dao060141
- CIVIŠ P. (2010): Monitoring chytridiomykózy v České republice. – Ms. [Dipl. pr.; depon. in: Knih. Fak. životního prostředí ČZU, Praha.]
- CIVIŠ P., VOJAR J. & BALÁŽ V. (2010): Chytridiomykóza – hrozba pro naše obojživelníky. – *Ochrana přírody* 65(4): 18–20.
- CIVIŠ P., VOJAR J., LITERÁK I. & BALÁŽ V. (2012): Current state of Bd occurrence in the Czech Republic. – *Herpetological Review* 43(1): 75–78.
- DASZAK P., BERGER L., CUNNINGHAM A. A., HYATT A. D., GREEN D. E. & SPEARE R. (1999): Emerging infectious diseases and amphibian population declines. – *Emerging Infectious Diseases* 5: 735–748. doi:10.3201/eid0506.990601
- FISHER M. C. & GARNER T. W. J. (2007): The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. – *Fungal Biology Reviews* 21(1): 2–9. doi:10.1016/j.fbr.2007.02.002

- FISHER M. C., GARNER T. W. J. & WALKER S. F. (2009): Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. – Annual Review of Microbiology 63: 291–310. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073435
- GARMYN A., VAN ROOIJ P., PASMANS F., HELLEBUYCK T., VAN DEN BROECK W., HAESBROUCK F., MARTELA., STUART S., CHANSON J., COX N., YOUNG B., RODRIGUES A. et al. (2012): Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. – PLoS ONE 7(4): e35038. doi:10.1371/journal.pone.0035038
- GARNER T. W. J., WALKER S., BOSCH J., HYATT A. D., CUNNINGHAM A. A. & FISHER M. C. (2005): Chytrid fungus in Europe. – Emerging Infectious Diseases 11: 1639–1641.
- GARNER T. W. J., PERKINS M. W., GOVINDARAJULU P., SEGIE D., WALKER S., CUNNINGHAM A. A., FISHER M. C., ADAMS M. J., AGRAWAL A. F. et al. (2006): The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. – Biology Letters 2: 455–9. doi:10.1098/rsbl.2006.0494
- GASCON C., COLLINS J., MOORE R., CHURCH D., MCKAY J. & MENDELSON J. (2007): Amphibian conservation action plan: IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit 2005. – World Conservation Union (IUCN), Washington, D.C.
- HANLON S., LYNCH K., KERBY J. & PARRIS M. (2015): *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. – Diseases of Aquatic Organisms 112: 237–242. doi:10.3354/dao02810
- HAVLÍKOVÁ B., VOJAR J. & BALÁŽ V. (2015): First systematic monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in collections of captive amphibians in the Czech Republic. – Amphibia-Reptilia 36(1): 27–35. doi:10.1163/15685381-00002972
- HYATT A. D., BOYLE D. G., OLSEN V., BOYLE D. B., BERGER L., OBENDORF D., DALTON A., KRIGER K., HERO M., HINES H., PHILLOTT R., CAMPBELL R., MARANTELLI G., GLEASON F. & COLLING A. (2007): Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. – Diseases of Aquatic Organisms 73: 175–192. doi:10.3354/dao073175
- JOHNSON M. L. & SPEARE R. (2003): Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. – Emerging Infectious Diseases. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.
- KILPATRICK A. M., BRIGGS C. J. & DASZAK P. (2010): The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. – Trends in Ecology and Evolution 25(2): 109–118. doi:10.1016/j.tree.2009.07.011
- LONGCORE J. E., PESSIER A. P. & NICHOLS D. K. (1999): *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. – Mycologia 91: 219–227. doi:10.2307/3761366
- MARTEL A., SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., BLOOI M., BERT W., DUCATELLE R., FISHER M. C., WOELTJES A., BOSMAN W., CHIERS K., BOSSUYT F. & PASMANS F. (2013): *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110: 15325–15329. doi:10.1073/pnas.1307356110
- MARTEL A., BLOOI M., ADRIAENSEN C., VAN ROOIJ P., BEUKEMA W., FISHER M. C., FARRER R. A., SCHMIDT B. R., TOBLER U., GOKA K., LIPS K. R., MULETZ C., ZAMUDIO K. R., BOSCH J., LÖTTERS S., WOMBWELL E., GARNER T. W. J., CUNNINGHAM A. A., SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., SALVIDIO S., DUCATELLE R., NISHIKAWA K., NGUYEN T. T., KOLBY J. E., VAN BOCXLAER I., BOSSUYT F. & PASMANS F. (2014): Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. – Science 346: 630–631.
- McMAHON T. A., BRANNELLY L. A., CHATFIELD M. W. H., JOHNSON P. T. J., JOSEPH M. B., MCKENZIE V. J., RICHARDS-ZAWACKI C. L., VENESKY M. D. & ROHR J. R. (2013): Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. – Proceedings of the National Academy of Sciences 110: 210–215. doi:10.1073/pnas.1200592110

- OHST T., GRÄSER Y., MUTSCHMANN F. & PLÖTNER J. (2011): Neue Erkenntnisse zur Gefährdung europäischer Amphibien durch den Hautpilz *Batrachochytrium dendrobatidis*. – Zeitschrift für Feldherpetologie 18(1): 1–17.
- OLSON D. H., AANENSEN D. M., RONNENBERG K. L., POWELL C. I., WALKER S. F., BIELBY J., GARNER T. W. J., WEAVER G. & FISHER M. C. (2013): Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. – PLoS ONE 8(2): e56802. doi:10.1371/journal.pone.0056802
- PARRIS M. J., REESE E. & STORFER A. (2006): Antipredator behavior of chytridiomycosis-infected northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. – Canadian Journal of Zoology 84: 58–65. doi:10.1139/z05-175
- PIOTROWSKI J. S., ANNIS S. L. & LONGCORE J. E. (2004): Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. – Mycologia 96: 9–15.
- SEIMON T. A., SEIMON A., DASZAK P., HALLOY S. R. P., SCHLOEGEL L. M., AGUILAR C. A., SOWELL P., HYATT A. D., KONECKY B. & SIMMONS J. E. (2007): Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. – Global Change Biology 13: 288–299. doi:10.1111/j.1365-2486.2006.01278.x
- SCHEELE B. C., PASMANS F., SKERRATT L. F., BERGER L., MARTEL A., BEUKEMA W., ACEVEDO A. A., BURROWES P. A., CARVALHO T., CATENAZZI A., DE LA RIVA I., FISHER M. C. et al. (2019): Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. – Science 363: 1459–1463.
- SCHLOEGEL L. M., PICCO A. M., KILPATRICK A. M., DAVIES A. J., HYATT A. D. & DASZAK P. (2009): Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). – Biological Conservation 142: 1420–1426. doi:10.1016/j.biocon.2009.02.007
- SKERRATT L. F., BERGER L., SPEARE R., CASHINS S., McDONALD K. R., PHILLOTT A. D., HINES H. B. & KENYON N. (2007): Spread of Chytridiomycosis Has Caused the Rapid Global Decline and Extinction of Frogs. – EcoHealth 4: 125–134. doi:10.1007/s10393-007-0093-5
- SURA P., JANULIS E. & PROFUS P. (2010): Chytridiomikoza - smiertelne zagrożenie dla płazów. – Chrońmy Przyrodę Ojczyzną 6(66): 406–421.
- SZTATECSNY M. & GLASER F. (2011): From the eastern lowlands to the western mountains: First records of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild amphibian populations from Austria. – Herpetological Journal 21: 87–90.
- UNE Y., KADEKARU S., TAMUKAI K., GOKA K. & KUROKI T. (2008): First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. – Diseases of Aquatic Organisms 82: 157–160. doi:10.3354/dao02006
- VAN ROOIJ P., MARTEL A., HAESEBROUCK F. & PASMANS F. (2015): Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. – Veterinary Research 46: 137. doi:10.1186/s13567-015-0266-0
- VAN SLUYS M. & HERO J. M. (2009): How does chytrid infection vary among habitats? The case of *Litoria wilcoxii* (Anura, Hylidae) in SE Queensland, Australia. – EcoHealth 6: 576–583. doi:10.1007/s10393-010-0278-1
- VOJAR J., HAVLÍKOVÁ B., SOLSKÝ M., JABLONSKI D., IKOVIĆ V. & BALÁŽ V. (2017): Distribution, prevalence and amphibian hosts of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Balkans. – Salamandra 53(1): 44–49.
- VOYLES J., YOUNG S., BERGER L., CAMPBELL C., VOYLES W. F., DINUDOM A., COOK D., WEBB R., ALFORD R. A., SKERRATT L. F. & SPEARE R. (2009): Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. – Science 326: 582–585. doi:10.1126/science.1176765
- VREDENBURG V. T., KNAPP R. A., TUNSTALL T. S. & BRIGGS C. J. (2010): Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. – Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 9689–9694. doi:10.1073/pnas.0914111107

- WELDON C., DU PREEZ L. H., HYATT A. D., MULLER R. & SPEARE R. (2004): Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. – *Emerging Infectious Diseases* 10: 2100–2105. doi:10.3201/eid1012.030804
- WILLIAMS E. S., YUILL T., ARTOIS M., FISCHER J. & HAIGH S. A. (2002): Emerging infectious diseases in wildlife. – *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties* 21: 139–157. doi:10.20506/rst.21.1.1327
- WOOD L. R., GRIFFITHS R. A. & SCHLEY L. (2009): Amphibian chytridiomycosis in Luxembourg. – *Bulletin de la Société des Naturalistes Luxembourgeois* 110: 109–114.
- WOODHAMS D. C., BIGLER L., MARSCHANG R., DASZAK P., BERGER L., CUNNINGHAM A., HYATT A., GREEN D., SPEARE R., GASCON C., COLLINS J. et al. (2012): Tolerance of fungal infection in European water frogs exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis* after experimental reduction of innate immune defenses. – *BMC Veterinary Research* 8: 197. doi:10.1186/1746-6148-8-197