

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



Výzkum patogenů *Batrachochytrium dendrobatidis* a *B. salamandrivorans* u obojživelníků v České republice a na Balkánském poloostrově

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce: Ing. Barbora Havlíková

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

2018

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a pouze s použitím literatury uvedené v seznamu zdrojů. Veškeré použité zdroje jsou řádně citovány.

V Praze dne

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala všem, kteří se podíleli na tvorbě mé dizertační práce.

Za neocenitelnou pomoc upřímně děkuji Jiřímu Vojarovi, který mi po celou dobu studia poskytoval konstruktivní rady, inspiraci, přiměřenou kritiku a především přátelský přístup. Za pomoc při zpracování vzorků, práci v laboratoři a celkové zasvěcení do problematiky kvantitativní real-time PCR (qPCR) analýzy bych ráda poděkovala Vojtechu Balážovi. Miliči Solskému děkuji za pomoc v terénu, za skvělou přípravu a organizaci terénních prací. Obrovský dík patří celému „žabařskému“ týmu, který se podílel na sběru dat; jmenovitě děkuji Jarce Lipšové, Petru Chajmovi, Petru Civišovi, Danče Budské, Kamile Šimůnkové, Janě Doležalové, Martinu Šikolovi, Miroslavu Sládečkovi, Magdě Jílkové. Všem spoluautorům (Jiří Vojar, Vojtech Baláž, Milič Solský, Daniel Jablonski, Vuk Ikovič, David Lastra González, Juan Gallego Zamorano, Cristina González Sevilleja, Laura Torrent) velmi děkuji za spolupráci na publikacích.

Dále bych ráda poděkovala zaměstnancům zoologických zahrad v Brně, Hluboké nad Vltavou, Hradci Králové, Jihlavě, Plzni, Praze, Ústí nad Labem a Zlíně za ochotu a pomoc při vzorkování. Velký dík patří rovněž zaměstnancům ze stanice přírodovědců na Smíchově – Pavlu Révayovi a Janu Hříbalovi. Děkuji i všem soukromým chovatelům, zejména panu Radku Sejkorovi, za ochotu při poskytování zvířat ke vzorkování a dlouhodobou spolupráci. Dále děkuji všem prodejcům obojživelníků, kteří se zapojili do tohoto výzkumu.

Svému bývalému šefovi Honzovi Pokornému vděčím a děkuji za to, že mě maximálně podporoval a nenechal mě to vzdát.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za psychickou podporu a trpělivost po celou dobu mého studia a především za to, že mi věřili. Babičkám a dědečkům děkuji za hlídání a svému synovi Kryštofovi za to, že neprotestoval.

Tento výzkum vznikl ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně a za podpory Interní grantové soutěže FŽP ČZU v Praze, granty č. 20124233, 20134261 a 20144269.

Abstrakt

Obojživelníci po celém světě čelí náhlým poklesům populací a vymírání celých druhů následkem infekčního onemocnění zvaného chytridiomykóza. Kožní onemocnění způsobené chytridiomycétními houbami *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) a *B. salamandrivorans* (*Bsal*) ovlivňují vitální funkce kůže obojživelníků. Následky onemocnění závisí na citlivosti hostitele, intenzitě infekce a environmentálních faktorech. Šíření obou patogenů je pravděpodobně způsobeno mezinárodním obchodem s obojživelníky. Jelikož v České republice roste popularita a zájem o chov obojživelníků, roste i riziko zavlečení patogenů do chovů a odtud do volné přírody. V našem výzkumu jsme se zaměřili na sledování *Bd* u obojživelníků chovaných v zajetí; v zoologických zahradách, herpetologických stanicích, u soukromých chovatelů a prodejců napříč Českou republikou. U nakažených jedinců byla navržena léčba s ohledem na ekologii jednotlivých druhů a doporučena hygienická opatření zabráňující dalšímu šíření patogenu. Přestože je výskyt patogenu *Bd* v Evropě velmi dobře zmapován, její jihovýchodní část a Balkánský poloostrov zůstávaly opomíjeny. Balkánský poloostrov je druhově velmi rozmanitý a zejména Černá Hora patří mezi významná místa evropské i světové biodiverzity. Proto se náš další výzkum soustředil na mapování patogenu *Bd* v Albánii, Makedonii a zejména v Černé Hoře. V souvislosti s devastujícími dopady nově se objevujícího patogenu *Bsal* jsme se dále zabývali jeho sledováním u ocasatých obojživelníků v České republice. Do studie byly zahrnuty druhy z volné přírody (např. mlok skvrnitý, *Salamandra salamandra*, patogenem nejohroženější druh) a ze zájmových chovů (např. *Ambystoma* spp., *Cynops* spp.) z Prahy a okolí.

Abstract

Amphibians around the world face the threat of sudden population decline and extinction of entire species caused by the disease named chytridiomycosis. The skin disease caused by chytrid fungi *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) and *B. salamandrivorans* (*Bsal*) affects the vital function of amphibian skin. Consequences of the disease depend on the host's susceptibility, the infection intensity and the environmental factors. The spreading of both pathogens is probably caused by the international amphibian trade. As the popularity and interest in amphibians as pets in the Czech Republic is growing, the risk of introduction of pathogens into a captive breeding is increasing and subsequently into the wild. In our study we focused on monitoring of the *Bd* in captive breeding of amphibians; zoological gardens, herpetological station, private breeders, pet shop sellers across the Czech Republic. Infected individuals were treated with regards of its ecology and we recommended hygiene measures to prevent further spread of the pathogen. Although the presence of the pathogen *Bd* in Europe is very well known, its south-eastern part and the Balkan Peninsula remained neglected. Species diversity in the Balkans is very high, and especially Montenegro belongs to European and world's biodiversity hotspots. Therefore, our further research was focused on mapping of *Bd* in Albania, Macedonia, and especially in Montenegro. Related with the devastating effects of emerging pathogen *Bsal*, we investigated of monitoring of *Bsal* in caudate amphibians in the Czech Republic. Our study included species in wild (e.g. fire salamander, *Salamandra salamandra*, the most threatened species by this pathogen), and captive populations (e.g. *Ambystoma* spp., *Cynops* spp.) from Prague and its surroundings.

Obsah

1. Úvod	8
1.1 Shrnutí současné situace ohrožení obojživelníků	8
1.2 Patogen <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	11
1.3 Patogen <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	22
2. Cíle disertační práce	29
2.1 Sledování patogenu <i>Bd</i> v ČR – chovy	29
2.2 Sledování patogenu <i>Bd</i> na Balkánském poloostrově – volně žijící populace	29
2.3 Sledování patogenu <i>Bsal</i> v ČR – volně žijící populace a chovy	29
3. Metodika	30
3.1 Sběr dat	30
3.2 Analýza vzorků	32
3.3 Statistické zpracování dat	33
4. Výsledky	34
4.1 Potvrzení výskytu patogenu <i>Bd</i> v umělých chovech ČR	34
4.2 První rozsáhlý průzkum patogenu <i>Bd</i> na Balkánském poloostrově	36
4.3 Výzkum nového patogenu <i>Bsal</i> ve volné přírodě a v chovech v rámci ČR	36
5. Závěr	38
6. Použitá literatura	42
7. Publikační výstupy	58

Seznam publikací

I. Vědecké časopisy s IF

- I. a **Havlíková B.**, Baláž V., Vojar J. (2015): First systematic monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in collections of captive amphibians in the Czech Republic. *Amphibia-Reptilia* 36: 27–35.
- I. b Vojar J., **Havlíková B.**, Solský M., Jablonski D., Ikovič V., Baláž V. (2017): Distribution, prevalence and amphibian hosts of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Balkans. *Salamandra* 53(1): 44–49.
- I. c Baláž V., Solský M., González D., L., **Havlíková B.**, Zamorano J., G., González Sevilleja C., Torrent L., & Vojar J. (2018): First survey of the pathogenic fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in wild and captive amphibians in the Czech Republic. *Salamandra* (in press).

II. Odborné časopisy

Havlíková B. (2014): Černá budoucnost pro obojživelníky? *Teramagazín, elektronický časopis o teraristice* 1/2014 (29–33), ISSN 1805–870, www.teramagazin.cz, [http://teramagazin.cz/soubory/archiv/2014/TERAmagazin_1_2014.pdf]

III. Sborníky abstraktů z konferencí

- III.a Havlíková B. (2012): Chytridiomykóza u obojživelníků chovaných v zajetí. Sborník abstraktů 4. ročníku konference Kostecké inspirování 2012, Kostelec nad Černými lesy, 29.–30. listopadu 2012.
- III.b Havlíková B., Vojar J., Baláž V. (2013): Monitoring původce chytridiomykózy u obojživelníků chovaných v zajetí. Sborník abstraktů z 5. ročníku konference Kostecké inspirování 2013, Kostelec nad Černými lesy, 21.–22. listopadu 2013.
- III.c Baláž V., Civiš P., Vojar J., Šandera M., Matějů J., Havlíková B., Rozínek R., Garner T. (2013): Summary of *Batrachochytrium dendrobatidis* research in the Czech Republic in wild and captive amphibians during the last five years. Sborník abstraktů ze 17. kongresu Evropské herpetologické společnosti. Maďarsko, Veszprém, 22.–27. srpna 2013.
- III.d Baláž V., Solský M., Jablonski D., Havlíková B., Vojar J. (2015): Původce chytridiomykózy obojživelníků potvrzen už i na Balkáně, je se čeho obávat? Sborník abstraktů z konference Zoologické dny Brno 2015, 12.–13. února 2015.

- III.e Baláž V., Solský M., Jelínková A., Havlíková B., Rozínek R., Vojar J. (2016): Výzkum trojice nejzávažnějších patogenů obojživelníků v České republice. Sborník abstraktů z konference Zoologické dny České Budějovice 2016, 11.–12. února 2016.

IV. Edukační materiály

- IV.a Havlíková B. (2013): Chytridiomykóza obojživelníků. Edukační leták distribuovaný na burzách a výstavách se zvířaty, v zoologických zahradách, prodejnách se zvířaty, na konferencích.
- IV.b Havlíková B., Lipšová J. (2013): Chytridiomykóza obojživelníků chovaných v zajetí. Edukační poster. Výstava obojživelníků v lidské péči 2013, Stanice přírodovědců na Smíchově.

1. Úvod

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na patogeny obojživelníků, které je velmi vážně ohrožují. Význam obojživelníků v přírodě i pro člověka je nezanedbatelný, a proto je třeba je chránit. Obojživelníci představují důležitou součást ekosystému, významně ovlivňují různé ekologické procesy včetně toku energií a trofické interakce (fungují jako predátoři i kořist, Gray et al. 2015). Pulci mnoha druhů jsou důležitými herbivory, filtrátory vody a bioindikátory (Mendelson et al. 2005). V lidské společnosti mají rovněž nezastupitelné místo. Jelikož jejich potrava zahrnuje převážně hmyz, mohou např. regulovat populace komárů přenášejících malárii a snižovat populace hmyzu škodícího v zemědělství (Cohen 2001, Mendelson et al. 2005). Vzhledem k citlivosti vůči toxickým látkám se larvy i dospělci používají k toxikologickým testům kvality prostředí (Burkhart et al. 2000). V některých rozvojových zemích jsou žáby důležitým zdrojem živočišných bílkovin pro tamní obyvatele (Cohen 2001), např. venkovské komunity Kambodži (Neang 2010). V rozvinutých zemích jsou žabí stehýnka významnou komoditou pro luxusní trhy (Schloegel et al. 2010). Neméně důležitý je jejich význam z hlediska vědy, výzkumu a farmacie. Kůže obojživelníků obsahuje bioaktivní molekuly (peptidy, proteiny, steroidy, alkaloidy, opiáty), které mají silné terapeutické účinky; antibakteriální, antivirové, fungicidní, protinádorové, antimalarické, antidiabetické a další (Gomez et al. 2007). Nejen z těchto důvodů je celosvětový úbytek obojživelníků více než alarmující.

1.1 Shrnutí současné situace ohrožení obojživelníků

Obojživelníci patří k nejvíce ohroženým skupinám obratlovců (Pounds 2001, Stuart et al. 2004), jejichž populační poklesy jsou zaznamenány již od roku 1970 (Stuart et al. 2004, Mendelson et al. 2005). V posledních desetiletích dochází k náhlému poklesu populací volně žijících obojživelníků, k jejich masovým úhynům i k úplnému vymizení některých druhů (Mendelson et al. 2005, Rachowicz et al. 2006). Podle IUCN se více než 2000 druhů obojživelníků řadí mezi zranitelné nebo kriticky ohrožené (IUCN 2016). K úbytku obojživelníků dochází v důsledku mnoha faktorů, které mohou působit synergicky (Alford et al. 2001, Keisecker et al. 2001). Dle Collinse a Crumpa (2009) existuje šest hlavních příčin globálního poklesu a vymírání populací obojživelníků: (1) komerční využití; (2) introdukce exotických druhů (kteří loví, konkurují a vytlačují původní druhy); (3) změny v krajině a její fragmentace (ztráty biotopů); (4) kontaminace prostředí; (5)

klimatické změny a (6) infekční onemocnění. Ztráty biotopů, které představují pro obojživelníky největší hrozbu (Baillie et al. 2004), jsou výsledkem několika spolupůsobících faktorů. Patří mezi ně zejména destrukce přirozeného prostředí, fragmentace krajiny, nevhodné zásahy a znečišťování prostředí, urbanizace a rozvoj dopravní infrastruktury (Davidson et al. 2003, Dodd & Smith 2003). Obojživelníci, kteří jsou vystaveni nevyhovujícím podmínkám prostředí a dalším stresorům, pak mohou být náchylnější k infekčním onemocněním (Beebee & Griffiths 2005). Jedním z nejvýznamnějších je chytridiomykóza. Jedná se o kožní onemocnění způsobené chytridiomycetní houbou *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*, Berger et al. 1998, Longcore et al. 1999). Chytridiomykóza byla identifikována jako jedno z hlavních infekčních onemocnění, které vedlo k výrazným ztrátám obojživelníků Střední Ameriky (ztráta až 40 % lokálních druhů, Lips et al. 2006), Severní Ameriky (Rachowicz et al. 2006), Austrálie (Berger et al. 1998) a Jižní Evropy (Bosch et al. 2001). Z celkových 7803 druhů obojživelníků (údaj k 8. 2. 2018, AmphibiaWeb 2018) byla plíseň způsobující chytridiomykózu detekována u více než 520 druhů, přičemž u více než 200 druhů již došlo k vyhynutí nebo je vyhynutím přímo ohroženo (Stuart et al. 2004, Skerratt et al. 2007, Olson et al. 2013). Z hlediska počtu zasažených druhů obojživelníků je plíseň *Bd* považována za nejhorší globálně rozšířený patogen (Amphibian Conservation Summit 2005) a chytridiomykóza za nejhorší infekční onemocnění (Gascon et al. 2007). Ukázkovým příkladem je neotropický rod *Atelopus*, u něhož patogen *Bd* zapříčinil vyhynutí minimálně 30 druhů z 97 (IUCN 2016). Vzhledem k obrovskému vlivu patogenu na volně žijící populace označila Světová organizace pro zdraví zvířat (the World Organization for Animal Health, OIE) *Bd* společně s ranavirem za původce infekčních onemocnění podléhajících mezinárodnímu hlášení (OIE 2009). Členské země OIE by měly monitorovat *Bd* a vykazovat údaje o jejím případném výskytu (Schloegel et al. 2010). Patogen *Bd* způsobuje chytridiomykózu u širokého spektra druhů obojživelníků napříč třemi řády; žáby (Anura), ocasatí (Urodela) a červoři (Gymnophiona), (Fisher et al. 2012).

Donedávna byl patogen *Bd* považován za jedinou plíseň způsobující chytridiomykózu obojživelníků. V roce 2013 však byla objevena druhá vysoce patogenní plíseň, popsána jako *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*, Martel et al. 2013), která způsobila masové úhyny populací mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) v Belgii a

Holandsku (Martel et al. 2013, Spitzen-van der Sluijs et al. 2013). Proto byla i tato plíseň přidána na seznam patogenů podléhajících hlášení (OIE 2017).

Šíření patogenu *Bd* a *Bsal* je ovlivněno lidskou činností (Peel et al. 2012, Martel et al. 2014), zejména mezinárodním obchodem s obojživelníky ke konzumaci, k vědeckým a chovatelským účelům (Mazzoni et al. 2003, Weldon et al. 2004, Garner et al. 2006, Cunningham et al. 2015). Se stoupající popularitou chovu obojživelníků v České republice (ČR) roste i riziko přenosu a šíření této nákazy. Vzhledem k předpokladu, že existuje vazba mezi přítomností *Bd* a *Bsal* u volně žijících obojživelníků a obojživelníků chovaných v zajetí (Walker et al. 2008, Schloegel et al. 2010, Martel et al. 2014), je nezbytné monitorovat oba původce chytridiomykózy jak v přírodě, tak v chovech, jelikož ty mohou být zdrojem nákazy pro volně žijící populace.

Předkládaná práce představuje tři studie zabývající se problematikou chytridiomykózy:

1) První je věnovaná sledování patogenu *Bd* u obojživelníků chovaných v zajetí; mapuje infekci v zoologických zahradách, herpetologických stanicích, u soukromých chovatelů a prodejců napříč ČR. U nakažených jedinců byla navržena léčba s ohledem na ekologii jednotlivých druhů a doporučena hygienická opatření zabráňující dalšímu šíření patogenu (Havlíková et al. 2015).

2) Druhá studie se zabývá mapováním rozšíření patogenu *Bd* v dosud neprozkoumaných částech Balkánského poloostrova. Pilotní studie byla provedena v Albánii, Černé Hoře a Makedonii v roce 2013. Následující rok bylo provedeno systematické mapování patogenu v Černé Hoře (Vojar et al. 2017).

3) Třetí práce se zaměřuje na sledování patogenu *Bsal* u ocasatých obojživelníků v ČR. Do studie byly zahrnuty druhy z volné přírody (např. mlok skvrnitý, patogenem nejohroženější druh) a druhy ze zájmových chovů (např. *Ambystoma* spp., *Cynops* spp.) z Prahy a okolí (Baláž et al., in press).

1.2 *Batrachochytrium dendrobatidis*

Taxonomické zařazení *Batrachochytrium dendrobatidis*

Kmen: Chytridiomycota

Třída: Chytridiomycetes

Řád: Rhizophydiales

Rod: *Batrachochytrium*

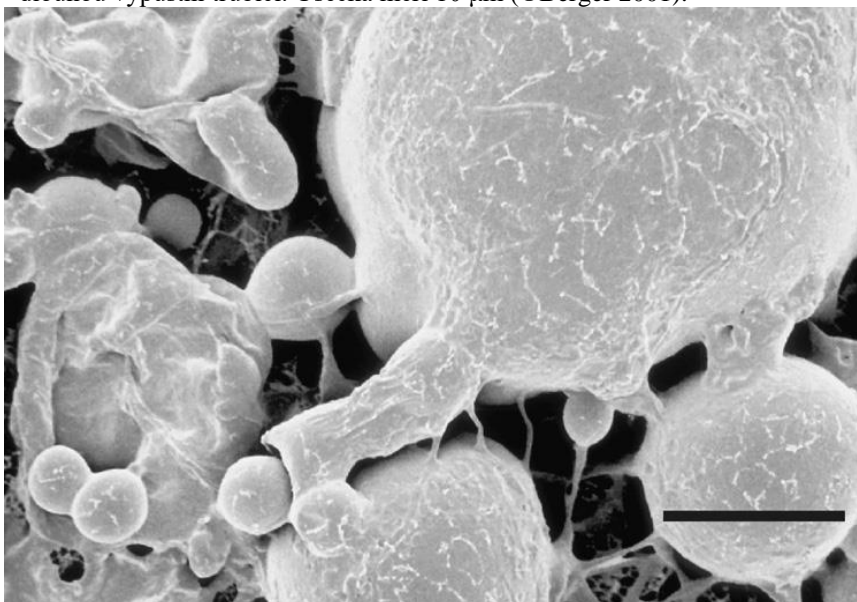
(Berger et al. 1999, Longcore et al. 1999, Williams et al. 2002).

Fyziologie patogenu *Bd*

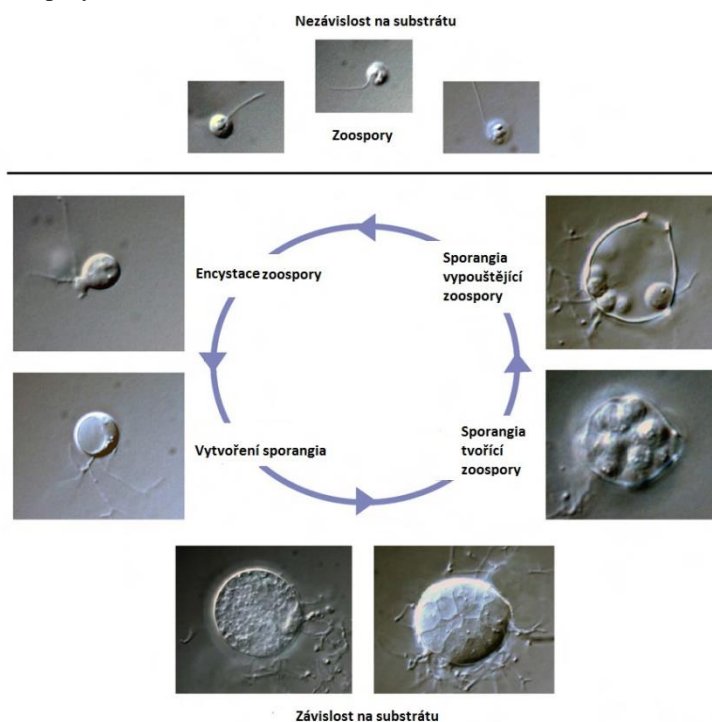
Patogen *Bd* se vyskytuje ve vodním prostředí ve dvou životních stádiích; jako pohyblivá zoospóra (2 μm) a přisedlé zoosporangium (10–40 μm), (Longcore et al. 1999, Berger et al. 2005). Bičíkatá zoospóra při kontaktu se substrátem přisedá pomocí rhizoidů, encystuje a během 4–5 dnů se vyvine v reprodukční stélku s jedním zoosporangiem, které uvolňuje nové zoospory pomocí výpustní trubice do okolí, viz obr. 1 a obr. 2 (Williams et al. 2002, Piotrowski et al. 2004, Kilpatrick et al. 2010). Uvolněné zoospory jsou schopné překonat vzdálenosti do 2 cm a infikují keratinizované buňky kůže dospělců i pulců (Pessier et al. 1999, Williams et al. 2002). Vzhledem k omezenému pohybu zoospor se patogen šíří především přímým kontaktem, např. při rozmnožování obojživelníků (Piotrowski et al. 2004) nebo kontaminovanou vodou obsahující zoospory (Daszak et al. 2000, Morgan et al. 2007, Collins & Crump 2009). Patogen *Bd* může zůstat ve vodě bez hostitele a být infekční více než 12 týdnů (Johnson & Speare 2005). Dle studie, v níž se testovala voda po transportu *Xenopus laevis* na přítomnost patogenu *Bd*, se hodnoty GE (GE = genetický ekvivalent jedné zoospory *Bd*) pohybovaly v rozmezí 3390 až 16887 zoospor na litr vody (Kolby et al. 2014). Plíseň *Bd* může rovněž růst na uhynulých obojživelnících (Longcore et al. 1999), přežít ve vlhkém sterilním říčním písku (Johnson & Speare 2005), na sterilních hadích kůžích (Piotrowski et al. 2004), na mrtvých řasách a exo-skeletonu členovců (Johnson & Speare 2003). V dalších studiích byla dokonce prokázána schopnost *Bd* využívat alternativní přenašeče a hostitele; vodní ptáky (Garmyn et al. 2012) a sladkovodní korýše (McMahon et al. 2012). Teplotní optimum *Bd* je mezi 17 a 25 °Celsia, při 28 °C se zastavuje růst a při teplotách nad 29 °C po dobu jednoho týdne *Bd* hyne (Longcore et al. 1999, Piotrowski et al. 2004). Při teplotách nad 28 °C nebo pod 10 °C přestává *Bd* růst, nebo roste velmi pomalu a infekce tak není letální.

Plíseň *Bd* je schopná přežít při 4 °C a přezimovat v hostiteli, a to i v mírných klimatických podmínkách (Piotrowski et al. 2004).

Obr. 1. Zoosporangium *Batrachochytrium dendrobatidis*, obrázek pořízený rastrovacím mikroskopem. Zoosporangium na agaru uvolňující zoospory dlouhou výpustní trubicí. Úsečka měří 10 µm (©Berger 2001).



Obr. 2. Životní cyklus *Bd*. V části životního cyklu nezávislého na substrátu jsou bičíkaté zoospory volně pohyblivé. V části životního cyklu závislého na substrátu (např. po infikování hostitele) zoospory encystují a vytváří reprodukční stélku s jediným sporangiem, které produkuje a vypouští nové zoospory (©Rosenblum et al. 2008).



Působení patogenu *Bd* a projevy onemocnění

Přítomnost patogenu *Bd* v kůži obojživelníka je možné detekovat ze svrchní vrstvy pokožky *stratum corneum* a *stratum granulosum*, kde napadá keratinizované vrstvy kůže (Berger et al. 1998), čímž narušuje její normální funkci. Dochází k nadměrnému rohovatění napadené kůže a k odlupování zrohovatělé vrstvy, což způsobuje zhoršení schopnosti kožního dýchání a vstřebávání vody (Berger et al. 1999, Daszak et al. 1999). Následkem osmotické nerovnováhy způsobené ztrátou solí dochází k poruchám vedení vzruchů, k zastavení srdečních kontrakcí, k omezení proudění krve až k úplnému kolapsu krevního oběhu a smrti (Voyles et al. 2009, Campbell et al. 2012). Smrt může být rovněž důsledkem absorpce toxických látek vylučovaných houbou (Berger et al. 1998). Nespecifickými projevy chytridiomykózy jsou strnulost v nepřírozené poloze, letargie, nechutenství, ztráta přirozených reflexů a motoriky (Berger et al. 1998, Daszak et al. 1999, Pessier et al. 1999, Boyle et al. 2003). U pulců, kteří nemají vyvinutou keratinizovanou vrstvu kůže, napadá *Bd* pouze tkáň ústního otvoru obsahující keratin (Fellers et al. 2001, Rachowicz & Vredenburg 2004, Blaustein et al. 2005), a pulci tak mohou sloužit jako rezervoár infekce (Briggs et al. 2010). V průběhu metamorfózy se pak *Bd* rozšíří z ústního disku na kůži a může být pro juvenilní stádium obojživelníka fatální (Rachowicz et al. 2006).



Obr. 3. Vlevo je zdravý jedinec *Pelophylax lessonae*. Vpravo je jedinec nakažený chytridiomykózou se změnami na kůži a v typické pozici s nohama od těla (©Woodhams et al. 2011).

Obrana vůči patogenu *Bd*

Rezistence vůči patogenu *Bd* může být ovlivněna antimikrobiálními vlastnostmi sekretů žláz, antimikrobiálními vlastnostmi kožní mikroflóry, funkcí imunitního systému nebo jejich kombinací (Harris et al. 2006, Woodhams et al. 2006, Woodhams et al. 2007a). Velké

parotidální žlázy produkují fungicidní sekrety, které mohou inhibovat *Bd*. Jejich účinnost se však druhově liší; např. u rosnice siné (*Litoria caerulea*) zoosporangia prorůstala přímo serózními žlázami, což indikuje neúčinnost sekretu proti *Bd* (Berger et al. 2005). Kůže obojživelníků může rovněž hostit fungicidní bakterie, např. *Janthinobacterium lividum*, které produkují metabolity a indol-3-carboxaldehyd inhibující růst chytridních hub (Brucker et al. 2008). Aplikace bakterie *J. lividum* na kůži obojživelníka jako způsob probiotické léčby může být efektivní, jelikož se bakterie sama množí a může poskytnout dlouhodobou ochranu před patogenem (Haas & Degafo 2005). Přidáním nebo rozmnožením bakterií se zvětší mikrobiální komunita, která je pak schopna produkovat dostatečnou koncentraci antifungálních metabolitů, a poskytnout tak obojživelníkovi rezistenci vůči chytridiomykóze (Brucker et al. 2008, Harris et al. 2009). Některé druhy obojživelníků jsou hostitely fungicidních bakterií díky jejich chování, fyziologii a vlivům prostředí (Carnaval et al. 2006).

Odolnost vůči patogenu *Bd* je druhově specifická; obojživelníci, jejichž populace kdysi poklesly v důsledku chytridiomykózy, mohou být v současnosti vůči této nemoci rezistentní (Davidson et al. 2003, Retallick et al. 2004). Některé invazivní druhy, jako např. skokan volský (*Lithobates catesbeianus*; dříve *Rana catesbeiana*) a ropucha obrovská (*Rhinella marina*; dříve *Bufo marinus*), jsou poměrně odolné vůči chytridiomykóze, a stávají se tak přenašeči tohoto patogenu (Daszak et al. 2004, Fisher & Garner 2007, Schloegel et al. 2010). Dalším známým vektorem *Bd* je bezblanka koki (*Eleutherodactylus coqui*), která se šíří do míst mimo její původní výskyt (Beard & O'Neill 2005). Akvatické druhy ocasatých, africká drápatka (*Xenopus laevis*) a skokani (*Lithobates pipiens* a *L. berlandieri*) mohou být dalšími možnými přenašeči této nemoci (Davidson et al. 2003, Woodhams et al. 2007b).

Vliv environmentálních podmínek na výskyt *Bd*

Výskyt *Bd* může být ovlivněn environmentálními faktory, zejména teplotou, sezónností, nadmořskou výškou a intenzitou UV-B záření (Blaustein & Kiesecker 2002, Berger et al. 2004). Teplota hraje významnou roli v ekologii tohoto patogenu. Jak již bylo řečeno, plíseň *Bd* je schopna přežít a dokonce pomalu růst při teplotách kolem 4 °C (Piotrowski et al. 2004), nejlépe prosperuje při teplotách okolo 23 °C a hyne při teplotách nad 29 °C (Longcore et al. 1999). V závislosti na sezónních změnách teplot v prostředí se mění prevalence a intenzita infekce *Bd* (Murray et al. 2013). Pokud se v důsledku globálního oteplování zvyšuje teplota během zimy, patogen je schopný rychleji růst na přezimujících larvách a po metamorfóze může propuknout v závažnou infekci (Pounds et al. 2001, Bosch et al. 2007). Některé

rozmnožovací lokality obojživelníků se kvůli změnám klimatu dokonce dostávají do klimatického optima patogenu, což usnadňuje jeho růst a zvyšuje hustotu zoospor ve vodě (Garner et al. 2009b). Podle Bosche et al. (2007) se v období, kdy docházelo ve studovaných oblastech k masovým úhynům obojživelníků, významně změnily meteorologické podmínky. Přibýlo dnů s teplotami mezi 21 a 27 °C, ale nezvýšil se počet dnů s teplotami převyšujícími 28 °C, což je kritická teplotní mez pro přežití *Bd* (Bosch et al. 2007).

Obecně lze za příznivé prostředí pro šíření patogenu považovat teplejší oblasti během studenějšího období a ve vyšších nadmořských výškách (Berger et al. 1998, Bradley et al. 2002). Proto se v tropech infekce obvykle objevuje v chladnějších měsících a mizí v teplejších (Piotrowski et al. 2004), nebo se vyskytuje v horách (Kriger & Hero 2008). Nízké teploty mohou mít negativní vliv na imunitu obojživelníků a zvyšovat tak virulenci patogenu. Při nízkých teplotách totiž může docházet ke snížené produkci antimikrobiálních a slizničních sekretů kůže, nižší obnově epidermálních buněk, případně i nižší schopnosti metabolizovat toxiny produkované houbou (Berger et al. 2004).

Zvyšující se intenzita UV-B záření má na obojživelníky subletální účinky, které mohou ovlivnit růst a vývoj, chování, fyziologii a anatomii obojživelníků (Blaustein & Kiesecker 2002). Záření může působit i synergicky v interakci s dalšími environmentálními stresory (ztráta biotopů, kontaminace prostředí) a snižovat tak odolnost jedinců (Searle et al. 2009). Oslabený imunitní systém se pak stává vstupní bránou pro propuknutí infekce (Beebee & Griffiths 2005).

Populační poklesy obojživelníků související s chytridiomykózou jsou pravděpodobně výsledkem komplexní sítě interakcí, přičemž vliv klimatu je spolupůsobícím faktorem s dalšími vlivy (populační hustota hostitele, zastoupení vývojových stádií v populaci, mikrobiální konkurenti atd., Bosch et al. 2007).

Původ a expanze *Bd*

Chytridiomykóza byla identifikována a popsána koncem 20. století jako nemoc způsobující vysokou mortalitu obojživelníků v Austrálii a Střední Americe (Berger et al. 1998, Longcore et al. 1999). Z vyšetření muzejních vzorků byl zjištěn výskyt patogenu *Bd* v roce 1933 u africké drápatky *Xenopus fraseri* (Soto-Azat et al. 2009) a nedávno byl objeven vzorek dokonce z roku 1911 u druhu *Rugosa emeljanovi* (dříve *Rana* nebo *Glandirana rugosa*) pocházející z Koreje (Fong et al. 2015). Zdá se, že chytridiomykóza byla v Africe stabilní

endemickou infekcí dávno před tím, než byl nalezen jakýkoliv infikovaný jedinec mimo Afriku (Weldon et al. 2004). Přesný původ patogenu *Bd* není znám, ale Afrika (Weldon et al. 2004), Severní Amerika (James et al. 2009), Asie (Bai et al. 2012, Fong et al. 2015) a Atlantský les v Brazílii (Rosenblum et al. 2013) jsou považována za místa možného původu.

Existují dvě hypotézy o původu patogenu; první se přiklání k rychlé a recentní expanzi patogenu do nových oblastí, kde se stal příčinou populačních poklesů („hypotéza nového patogenu“); druhá hypotéza popisuje *Bd* jako endemický patogen a populační úbytek je výsledkem vyšší citlivosti hostitele, vyšší virulence patogenu, environmentálních změn a kombinací dalších faktorů („hypotéza endemického patogenu“), (Weldon et al. 2004, Ouellet et al. 2005, Rachowicz et al. 2005, Morgan et al. 2007, Lips et al. 2008). Z posledních studií vyplývá, že genetická diverzita *Bd* je mnohem širší, než se doposud myslelo, což naznačuje složitou evoluční historii patogenu (Rosenblum et al. 2013).

Je zřejmé, že k šíření choroby dochází hlavně v důsledku lidské činnosti, jedná se především o: (i) umělé transporty obojživelníků do nových oblastí, (ii) reintrodukce obojživelníků z domácích a laboratorních chovů i z volné přírody, (iii) výměny zvířat mezi zoologickými zahradami, (iv) únik zvířat z chovných farem, (v) mezinárodní obchod s obojživelníky a (v) pravděpodobně i záchranné transfery (Pessier et al. 1999, Daszak et al. 2001, Mazzoni et al. 2003, Young et al. 2007, Goka et al. 2009, Civiš et al. 2010). Někteří autoři předpokládají, že se plíseň rozšířila po celém světě prostřednictvím obchodu s drápatkami (*Xenopus laevis*), které se v 50. letech minulého století používaly k testování gravidity a laboratorním účelům (Weldon et al. 2004, Soto-Azat et al. 2009). K celosvětovému šíření chytridiomykózy rovněž přispívá obchod se skokanem volským určeným ke konzumaci (Schloegel et al. 2010).

Mezinárodní obchod s obojživelníky

Největší objem mezinárodního obchodu s obojživelníky na světě je situován v Číně (Gratwicke et al. 2010). Ročně se vyváží přibližně 100 až 400 milionů obojživelníků pocházejících většinou z Indonésie. Žabí stehýnka skokana volského pro luxusní trhy Francie, Belgie a Spojených Států Amerických se v posledních letech stala miliardovým obchodním artiklem (Schloegel et al. 2010). Např. v roce 2006 se na farmách vyprodukovalo asi 75 000 tun skokana volského a kolem 8000 tun bylo odchyceno ve volné přírodě (Gratwicke et al. 2010). Více než 94 % obojživelníků dovážených do USA je omezeno právě na import skokana volského; ročně se doveze více než 2,5 milionu kusů (Harrel et al. 2014). Při tak

obrovském objemu importovaných zvířat je velká pravděpodobnost zavlečení nemocí. Na trzích v USA byl zjištěn vysoký výskyt *Bd* infekce (41–62 %) u skokanů dovážených především z jihovýchodní Asie a Jižní Ameriky (Fisher et al. 2007, Schloegel et al. 2010). Navíc byla na patogen *Bd* pozitivní i voda, ve které se skokani transportují, což může být potenciálním zdrojem šíření (Johnson & Speare 2003). Podle Teixeira et al. (2001) je téměř 95 % poptávky po žabích stehýnkách a produktech zajišťováno z volné přírody, přičemž v Indonésii ani v jiných zemích není nastavena žádná kontrola dohlížející na potenciální hrozbu napadení potravinářských zdrojů patogenem *Bd* (Gratwicke et al. 2010). Obojživelníci jsou mimo potravinové účely využíváni také pro zájmový chov (Andreone et al. 2005), jako zdroj tradiční medicíny (Rowley et al. 2010), k laboratorním účelům (Weldon et al. 2007) a v rybářském průmyslu (Picco & Collins 2008). Se stále se zvyšující poptávkou roste i tlak na divoké populace, kterým hrozí úplné vyhubení (Collins 2010). Je pravděpodobné, že obojživelníci odchycení z volné přírody pro komerční účely mohou pocházet z oblastí výskytu *Bd* a mohou být infikováni (Peel et al. 2012). Nicméně ani legislativa zemí zapojujících se do mezinárodního obchodu s obojživelníky nestanovuje povinné vyšetření zvířat vůči tomuto patogenu. Bai et al. (2012) zjistili, že infekce *Bd* se objevila u všech testovaných jedinců v obchodech se zvířaty v Číně. Ačkoli Čína patří mezi největší vývozce žabích stehýnek na světě, překvapivě zde nebyly zaznamenány žádné masové úhyny obojživelníků (Swei et al. 2011). Infikované žáby se mohou jevit klinicky v pořádku a jejich mezinárodní transporty mají za následek šíření choroby (Young et al. 2007). Světová organizace pro zdraví zvířat (OIE) v rámci potravinové politiky doporučuje odstranění infekčních částí (kůže a koncové části končetin s prsty) před vývozem (OIE 2009). Prevalence chytridiomykózy uvnitř mezinárodního obchodu s obojživelníky je vysoká a s největší pravděpodobností se bude nemoc šířit do dalších oblastí.

Chov obojživelníků v zajetí

Důležitým cílem profesionálního chovu obojživelníků v zajetí je možnost poskytnutí zdrojů nových jedinců pro reintrodukcii a vytvoření odolných a zdravých populací, které podpoří ty stávající (Frias-Alvarez et al. 2008). Chov v zajetí tak může hrát klíčovou roli při omezování dopadu chytridiomykózy na volně žijící populace obojživelníků (Department of the Environment and Heritage, 2006). Ale ani záchranné programy nejsou pro obojživelníky jistotou. Například v Mexiku na Instituto de Biología bylo zjištěno, že v chovech axolotlů mexických (*Ambystoma mexicanum*) určených k reintrodukcii se patogen *Bd* vyskytoval u

85 % jedinců (Frías-Alvarez et al. 2008). Z Evropy je známý případ ropušky baleárské (*Alytes muletensis*), endemita Malorky a pravděpodobně nejvzácnější evropské žáby, u které se prokázalo zavlečení infekce do divokých populací právě záchrannými chovy a zpětným posilováním místní populace (Walker et al. 2008). Introdukce infikovaných obojživelníků do volné přírody může způsobit další poklesy jednotlivých druhů a nákaza se může šířit také heterospecificky (Frías-Alvarez et al. 2008). Je proto nutné provést koordinované postupy *in situ* (např. výzkum, monitoring a ochrana biotopů) a realizovat chovatelské programy *ex situ* (např. zajištění přežití populací a jejich výzkum), (Mendelson et al. 2005). Snaha o zachování zdravých populací by také měla poskytovat přehled o dynamice chytridiomykózy, interakcích mezi hostitelem a patogenem i dopady na přežití populací (Carnaval et al. 2006).

Přestože existují spolehlivé metody k testování a rychlé detekci patogenu *Bd*, diagnostická vyšetření nejsou běžnou praxí většiny světových ani tuzemských zoologických zahrad (Peel et al. 2012). Obojživelníci odchycení z volné přírody tak mohou způsobit epidemii v zavedených chovech. (Nichols et al. 1998). Vypuštění infikovaných zvířat z umělých chovů může být naopak fatální pro volně žijící populace. Účinné vnitrostátní a mezinárodní karanténní a kontrolní postupy jsou asi jediným efektivním způsobem zabraňujícím šíření chytridiomykózy (Nichols et al. 1998). Čím dříve se provede diagnostika u podezřelých jedinců, tím dříve se může zahájit vhodná léčba a zvyšuje se tak naděje na uzdravení nakažených jedinců, případně celých chovů. Globalizace bez adekvátní karantény, dozoru a antiparazitních programů bude mít za následek vznik dalších ohnisek nákazy, což povede ke ztrátě biodiverzity (Skeratt et al. 2007). Záchranné programy a schopní chovatelé jsou tak možná poslední nadějí pro mnoho vzácných druhů obojživelníků ohrožených vyhynutím.

Rozšíření *Bd* ve světě

Patogen *Bd* byl zaznamenán v 56 zemích světa (www.bd-maps.net). Nejintenzivnější výzkum chytridiomykózy je v Austrálii a Neotropické oblasti, kde měla přítomnost *Bd* nejhorší dopady na populace obojživelníků (Berger et al. 1998, Berger et al. 2004). Nejvyšší počet ohrožených druhů se v současné době vyskytuje v zemích Latinské Ameriky (Kolumbie, Mexiko, Ekvádor). Nicméně, nejhorší stav je v Karibiku, kde je ohroženo nebo zaniklo více než 80 % obojživelníků; v Dominikánské republice, na Kubě, Jamajce a neuvěřitelných 92 % na Haiti (IUCN 2008). Plíseň byla rovněž diagnostikována v Argentině (Barrionuevo & Mangione 2006), Bolívii (Barrionuevo et al. 2008) a Brazílii (Carnaval et al. 2005, 2006),

Peru (Seimon et al. 2005), Uruguayi (Mazzoni et al. 2003) a v dalších zemích. Chytridiomykóza způsobila rovněž epidemické vlny spojené s vysokou mortalitou na Novém Zélandu a v Africe (Young et al. 2007). V rámci Asie byla přítomnost patogenu potvrzena v následujících zemích: Čína, Filipíny, Indie, Indonésie, Japonsko, Jižní Korea, Kyrgyzstán, Laos, Malajsie, Rusko, Srí Lanka a Vietnam (Swei et al. 2011, Bai et al. 2012, Dahanukar et al. 2013, Reshetnikov et al. 2014). Prevalence *Bd* v asijských je zpravidla velmi nízká (Swei et al. 2011).

První pozitivní nálezy z Evropy pochází ze Španělska z r. 1997 (Bosch et al. 2001). Z dalších jihoevropských států byla plíseň *Bd* zaznamenána v Itálii (Stagni et al. 2002) a Portugalsku (Garner et al. 2005). Západní Evropa je rovněž dobře zmapovaná na přítomnost *Bd*; pozitivní nálezy se objevily v Belgii (Spitzen-van der Sluijs et al. 2010), Francii (Garner et al. 2006), Holandsku (Spitzen-van der Sluijs et al. 2010), Lucembursku (Wood et al. 2009) i Velké Británii (Garner et al. 2005). Ze zemí střední Evropy byl monitoring proveden v ČR (Baláž et al. 2009, Civiš et al. 2012, Baláž et al. 2014b), Maďarsku (Gál et al. 2012), Německu (Garner et al. 2005), Polsku (Sura et al. 2010), Rakousku (Sztatecsny & Glaser 2011), Slovensku (Baláž et al. 2014a) a Švýcarsku (Garner et al. 2005). Jedinou, zatím téměř neprozkoumanou částí Evropy, zůstávala právě její jihovýchodní část a Balkánský poloostrov. Monitoring přítomnosti *Bd* byl proveden pouze v Chorvatsku (Vörös & Jelić 2011) a Rumunsku (Vörös et al. 2013), a to s pozitivními výsledky. Největší druhová rozmanitost obojživelníků je soustředěna v jižní části Balkánského poloostrova, v tzv. Jadranském trojúhelníku (Lymberakis & Poulakakis 2010), ve kterém leží Černá Hora. Vzhledem k samotnému postavení Černé Hory na Balkánském poloostrově, rozmanitosti jejího geologického podkladu, krajiny, klimatu a půdy se zde vytvořily podmínky, díky nimž patří Černá Hora mezi významná místa evropské i světové biodiverzity. Počet jednotlivých druhů na jednotku plochy je 0,837, což je nejvyšší zaznamenaný index ve všech evropských zemích (Šćepanović et al. 2010). Batrachofauna Černé Hory je druhově velmi rozmanitá – žije zde 17 druhů obojživelníků, z toho 11 druhů žab a 6 druhů ocasatých (<http://amphibiaweb.ogr/>). Například horské oblasti Lovćen a Prokletije jsou obzvláště vhodné pro obojživelníky (Šćepanović et al. 2010), ale vysoké nadmořské výšky s vlhkým klimatem mohou být zároveň ideálním místem výskytu *Bd* (Alford et al. 2001, Bovero et al. 2008).

V ČR započal výzkum patogenu v roce 2008, kdy byl výskyt *Bd* poprvé potvrzen u ropuchy obecné (*Bufo bufo*) a u skokanů rodu *Pelophylax* (Baláž et al. 2009). Od roku 2009 probíhá

systematické vzorkování. Doposud byla plíseň u nás zjištěna u devíti druhů na většině lokalit, kde byla přítomnost patogenu *Bd* zjišťována (Civiš et al. 2010, 2012, Baláž et al. 2014b). Zatímco ve světě se pozornost věnuje jak volně žijícím, tak v zajetí chovaným obojživelníkům (Raphael & Pramuk 2007; Frías-Alvarez et al. 2008), u nás se chovům, resp. výzkumu přítomnosti nemoci v nich, nevěnoval donedávna nikdo (Havlíková et al. 2015).

Diagnóza onemocnění patogenem *Bd*

Diagnóza tohoto onemocnění se může provádět pomocí histologické analýzy, histochemické analýzy, nebo kombinací obou, nicméně u jedinců infikovaných pouze několika houbovými stélkami je to často obtížné (Annis et al. 2004). Přítomnost chytridiomycétní houby je identifikována mezibuněčnými sporangii a stélkou uvnitř epidermis (Daszak et al. 1999). V současné době je nejpoužívanější metodou detekce chytridiomykózy TaqMan real-time polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) použitím primerů *Bd*. Analýza Taqman real-time PCR odhalí přítomnost a prevalenci *Bd* zoospor (Boyle et al. 2004). Pro analýzu je možné použít ústřížků prstů, kousky kůže nebo celých jedinců, ale tyto metody jsou pro obojživelníky invazivní až destruktivní. Stěry z kůže pomocí standardizovaných výtěrek (MW100, Medical Wire & Equipment Co-UK) patří k jedné z nejčastěji používaných metod, a to především pro její šetrnost (Hyatt et al. 2007). Tato metoda je vysoce citlivá (zaznamenaná infekci v řádu jednotlivých buněk), specifická (použité primery jsou navrženy pouze pro *Bd* a byly testovány proti množství jiných příbuzných plísní) a umožňuje kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce (Boyle et al. 2004, Hyatt et al. 2007). Výsledek se uvádí v tzv. GE, neboli genomických ekvivalentech jedné zoospor, jako standardy jsou použity vzorky DNA s různým počtem zoospor (100, 10, 1 a dokonce 0,1).

Léčba patogenu *Bd*

Z poznatků teplotního optima *Bd* (Longcore et al. 1999, Piotrowski et al. 2004) vychází léčba zvýšenou teplotou. To je ovšem možné jen u druhů, které tyto podmínky snášejí (druhy z teplých oblastí, druhy s denní aktivitou, druhy, které se sluní). K přeléčení obvykle stačí jeden týden při teplotách kolem 30 °C, při silnější nákaze se doporučuje opakované vystavení teplotám až 37 stupňů po dobu tří hodin (Woodhams et al. 2003).

V případě nesnášenlivosti vysokých teplot (u většiny druhů), při akutních nákazách nebo úhynech je další možností léčba itraconazolem (sodium itraconazol, Forzan et al. 2008). U akvatických druhů se léčivo s obsahem itraconazolu (např. Sporanox[®] sirup, Janssen Cilag

S.p.A., Beerse, Belgie) aplikuje do akvária v koncentraci 0,01 % (tj. 10 ml sirupu Sporanox / 1 vody) a nechá se 30 minut působit. U terestrických druhů je nejvhodnější použití jednorázových kelímků s roztokem Sporanoxu (10 ml / 1 vody, ředěných izotonickým solným roztokem tj. 0,6 g soli / 1 vody), roztok se nechá pět minut působit a léčba se opakuje po dobu 11 dní (Forzan et al. 2008). U nově metamorfovaných jedinců se doporučuje snížit koncentraci itraconazolu na 0,0025 % a délku léčby zkrátit na šest dní (Brannelly et al. 2012). Nicméně použití této léčby není vhodné pro pulce, u nichž způsobuje depigmentaci pokožky (Garner et al. 2009a). Navíc při léčbě velkého počtu zvířat je tento postup časově i technicky náročný a itraconazol v kapalně formě je hůře dostupný (Martel et al. 2011). Bezpečnějším a efektivnějším antimykotickým lékem je voriconazol, který se aplikuje postříkem v koncentraci 1,25 µg/ml po dobu sedmi dnů. Tento postup se ukázal jako vysoce účinný i pro citlivé druhy, pro jejichž pulce byly jiné postupy léčby toxické (např. léčba amphotericinem B, formaldehydem, malachitovou zelení, Martel et al. 2011). Během léčby je nutné dodržovat přísná hygienická a karanténní opatření. Je nezbytné, aby byli léčeni jedinci izolováni od ostatních ve speciální karanténní místnosti; aby byly jejich boxy dezinfikovány, všechny organický materiál odstraněn nebo sterilizován, pomůcky dezinfikovány, jednorázové rukavice měněny při kontaktu s každým novým jedincem a voda dezinfikována před vypuštěním do odpadu (Johnson & Speare 2003, Forzan et al. 2008).

1.3 *Batrachochytrium salamandrivorans*

Taxonomické zařazení *Batrachochytrium salamandrivorans*

Kmen: Chytridiomycota

Třída: Chytridiomycetes

Řád: Rhizophydiales

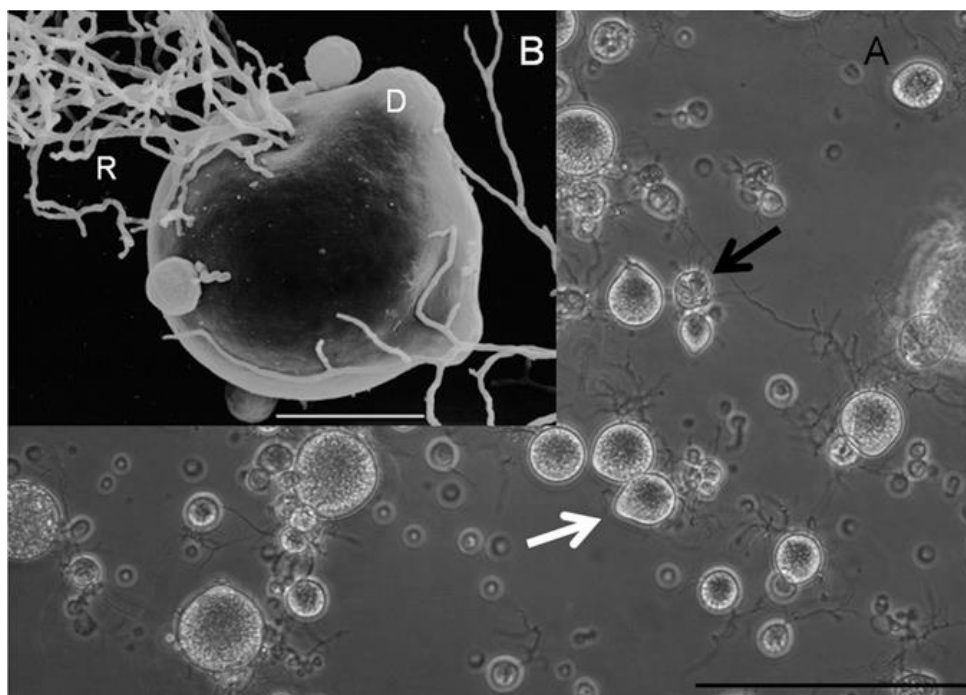
Rod: *Batrachochytrium*

(Martel et al. 2013)

Fyziologie, působení patogenu *Bsal* a projevy onemocnění

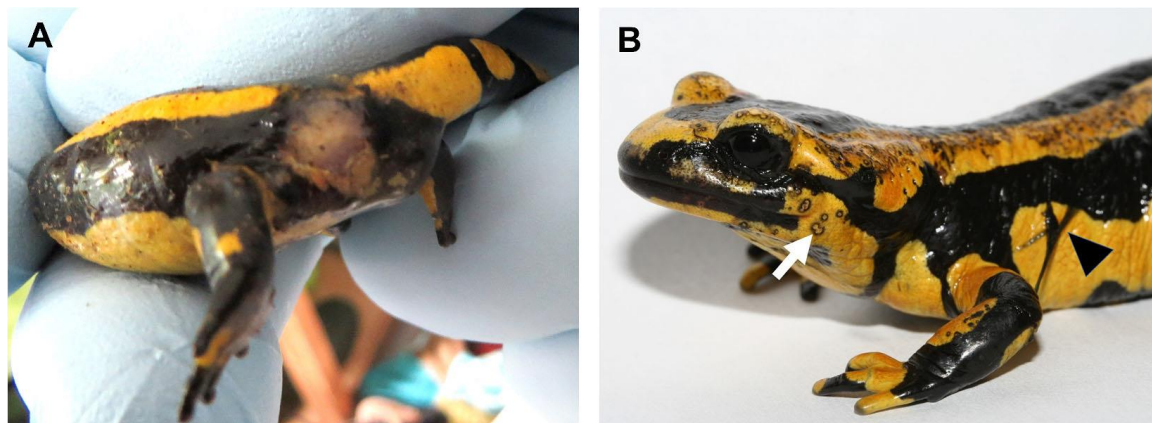
Patogen *Bsal* se vyskytuje ve vodním prostředí ve dvou formách: jako pohyblivá zoospora a encystovaná zoospora. Zoospora při kontaktu s kůží obojživelníka přisedá a vytváří centrální stélku, která se může spojovat do segmentů koloniální stélky (obr. 4). Koloniální stélka (15,7–50,3 μm , průměrně 27,9 μm) obsahuje několik ohraničených sporangií (6,9–17,2 μm , průměrně $12,2 \pm 1,9$ μm). Buněčná stěna na povrchu sporangií vyběhá v několik výpustních trubic, ze kterých se uvolňují pohyblivé zoospory (4,0–5,5 μm , průměrně 4,6 μm), (Martel et al. 2013, Stegen 2017).

Obr. 4. *In vitro* kultura *B. salamandrivorans*. (A) Monocentrické stélky převažují, vzácná přítomnost koloniálních stélek (černá šipka). Sporangia vytváří výpustní trubice (bílá šipka) k uvolnění zoospor (měřítko 100 μm). (B) Obrázek pořízený elektronovým rastrovacím mikroskopem; zralé sporangium s rhizoidy (R), výpustní trubice (D), (měřítko 10 μm), (©Martel et al. 2013).



Schopnost patogenu dovést populace obojživelníků k rychlému zániku může souviset s jeho dvěma životními strategiemi: jako pohyblivá zoospóra se dostává k hostiteli a jako encystovaná zoospóra si vytváří trvalou virulenci (infekční kmen se udržel v populaci přes dva roky a byl stále stejně virulentní) a dlouhodobou rezistenci (minimálně 31 dní ve filtrované vodě bez hostitele, Stegen et al. 2017). Způsob přenosu *Bsal* není zcela jasný, ale pravděpodobně se přenáší přímým kontaktem mezi jedinci, kontaminovanou vodou a substrátem (Stegen et al. 2017), stejně jako je tomu v případě *Bd* (Morgan et al. 2007). Stegen et al. 2017 zjistili, že *Bsal* neúměrně více napadá pohlavně dospělé jedince, což může mít souvislost právě se vzájemným kontaktem při rozmnožování a teritoriálním chování.

Tento patogen parazituje na epidermálních buňkách ocasatých obojživelníků, čímž dochází k tvorbě hlubokých vředů a kožních lézí s výraznou degradací pokožky (obr. 5). Rohovatěním a rozrušováním pokožky je narušena její celistvost s následným poškozením životně důležitých funkcí (homeostáza elektrolytů, výměna plynů, termoregulace, antimikrobiální schopnost). U mloků skvrnitých dochází k úhynům během dvou až tří týdnů od napadení jedince patogenem (Martel et al. 2013, Martel et al. 2014). Jsou ale zaznamenány i případy, kdy infikovaní mloci uhynuli během sedmi dnů od napadení. Kromě výrazných změn na kůži se infekce projevuje i změnami v chování; anorexií, apatií, ataxií, setrváním v nepřírozené poloze (Martel et al. 2013, Martel et al. 2014, Gray et al. 2015).



Obr. 5. Na obrázku A je zřetelně vidět hluboká kožní léze *S. s. bernadezi* infikovaného *Bsal*, (B) *S. s. fastuosa* vykazuje typické léze – mnohočetné kožní vředy (bílá šipka) a nápadné rozrušování pokožky (černá šipka), (©Sabino-Pinto et al. 2015).

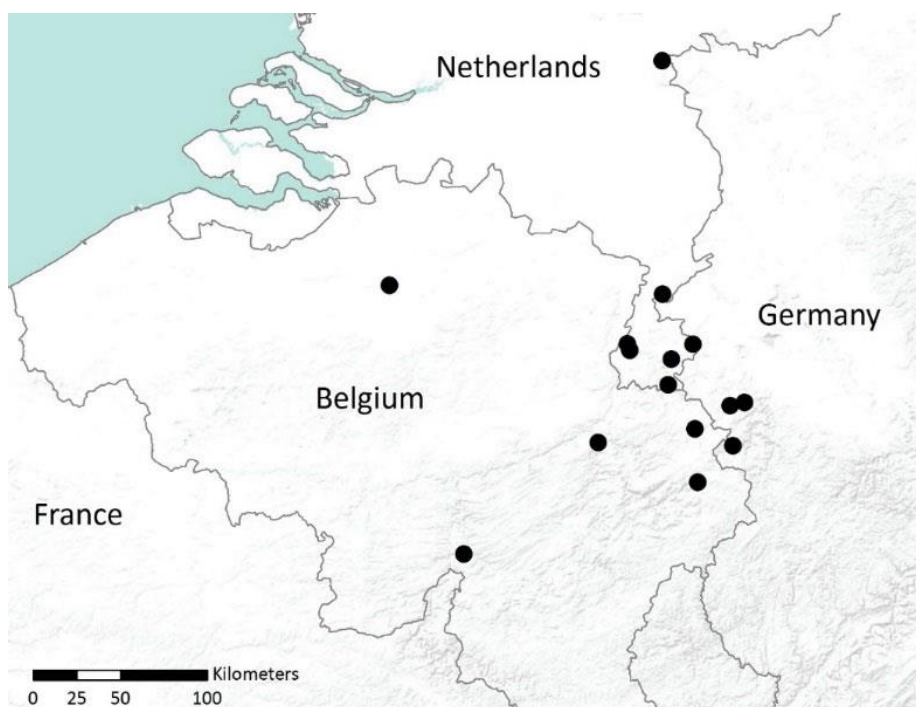
Do nedávna se předpokládalo, že je *Bsal* omezena pouze na hostitele řádu Urodela (Martel et al. 2014). Podle nejnovějších studií se ukazuje, že je houba stejně tak schopna infikovat řád Anura, což může mít zásadní důsledky v epidemiologii patogenu (Nguyen et al. 2017, Stegen et al. 2017). V porovnání s *Bd* byla v souvislosti s *Bsal* u testovaných čolků a mloků

pozorována vyšší patogenita způsobující mortalitu (Martel et al. 2013, Martel et al. 2014). Při testování citlivosti mloků skvrnitých vůči *Bsal* se zjistilo, že mortalita není ovlivněna teplotou, ani intenzitou zoospor a nakažené zvíře si nevytváří imunitu ani po vícečetném experimentálním naočkování patogenu. Nemoc byla u mloků při nízké i vysoké intenzitě naočkovaných zoospor vždy letální, s pomalejším průběhem u nižší intenzity patogenu (Stegen et al. 2017). Ostatní druhy ocasatých obojživelníků vykazují různý stupeň citlivosti v závislosti na množství zoospor (Martel et al. 2014). Obojživelníci mohou být rezistentní (bez infekce a bez projevů onemocnění), tolerantní (s infekcí bez projevů onemocnění), mírně citliví (infekce vedoucí k onemocnění s možností následného zotavení) nebo vysoce citliví (infekce vedoucí k letálnímu onemocnění, EFSA 2017; European Food Safety Authority). U čolka horského (*Ichthyosaura alpestris*) při vysoké intenzitě zoospor (10^4 zoospor/jedinec) dochází k úmrtí do tří týdnů, zatímco při nízké intenzitě (100 zoospor/jedinec) může po několika měsících dojít až k úplnému odstranění zoospor a klinickému uzdravení jedince (Stegen et al. 2017). Zatím jediným evropským druhem, který se zdá být vůči patogenu rezistentní, je čolek hranatý (*Lissotriton helveticus*, Martel et al. 2014). Dřívější studie ukazovaly výrazně nižší teplotní preference patogenu *Bsal* než má *Bd* (schopnost růstu již při nízkých teplotách kolem 5 °C, teplotní optimum pro růst mezi 15–20 °C a při teplotách nad 24 °C úhyn patogenu, Martel et al. 2013, Blooi et al. 2015a). Při porovnání dynamiky infekce *Bsal* v závislosti na teplotě se zjistilo, že při nižších teplotách (4 °C) se sice plíseň šíří pomaleji než při teplotách 15 °C, nicméně i tak dochází k letální infekci (Stegen et al. 2017). Současné výsledky ukazují, že patogen je schopen infikovat a zabíjet obojživelníky v širokém teplotním rozmezí. To potvrzuje i další studie, podle které se většina infikovaných obojživelníků nacházela v rybnících a potocích o teplotě vody 20–25 °C s maximem až 26,43 °C (Laking et al. 2017). Patogen *Bsal* je tedy schopen tolerovat mnohem vyšší teploty, než se doposud myslelo.

Původ a výskyt *Bsal* ve světě

Molekulární výzkumy vedou k přesvědčení, že tento patogen pochází pravděpodobně z východní Asie (Thajsko, Vietnam a Japonsko), kde je většina tamních druhů rezistentních či tolerantních vůči *Bsal* (Martel et al. 2014, Laking et al. 2017). Nejstarší doložený případ výskytu *Bsal* pochází z roku 1861 z muzejního vzorku čolka mečocasého (*Cynops ensicauda*). Zdá se, že patogen *Bsal* koexistuje s asijskými druhy ocasatých obojživelníků posledních 30 milionů let a Asie je tak jeho přírodním rezervoárem (Martel et al. 2014). Tuto hypotézu podporuje i nedávná

studie prováděná ve Vietnamu, kde byl patogen *Bsal* objeven u vietnamských ocasatých obojživelníků ve velmi nízké intenzitě (2,92 %) bez zjevných projevů onemocnění. Přítomnost *Bsal* v kombinaci s absencí symptomů naznačuje endemismus patogenu a vietnamské druhy se jeví jako jeho rezervoár (Laking et al. 2017). Zatímco asijské druhy jsou vůči patogenu převážně rezistentní, evropské a americké druhy jsou většinou vysoce citlivé a po nákaze patogenem propuká závažné onemocnění (Mutchmann et al. 2015). Vzhledem k diskontinuitě globálního rozšíření *Bsal* se zdá, že zavlečení patogenu z Asie do Evropy muselo být zprostředkováno člověkem (Martel et al. 2014). Od roku 2008 byly v Holandsku zaznamenány opakované nálezy uhynulých dospělců mloka skvrnitého a v roce 2010 došlo k výrazným poklesům uvnitř pozorovaných populací (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013). Do roku 2013 zbyla z původních populací čítajících stovky jedinců (Gubbels 2009) pouze 4 %, čímž mloci skvrnití téměř vymizeli z volné přírody (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013). Masové vymírání celých populací v Holandsku měl na svědomí právě patogen *Bsal*, který byl nalezen, izolován a popsán až v roce 2013 (Martel et al. 2013). Z Holandska se plíseň rozšířila do Belgie, kde způsobila v roce 2013 a 2014 ohniska onemocnění (Martel et al. 2014). Patogen *Bsal* byl u volně žijících ocasatých obojživelníků rovněž detekován v Německu blízko hranic Holandska a Belgie, kde se kromě mloků skvrnitých objevil i na čolcích obecných (*Lissotriton vulgaris*) a čolcích horských (Spitzen-van der Sluijs et al. 2016).



Obr. 6. Hlášená ohniska infekcí *Bsal* u volně žijících populací mloků a čolků od roku 2013 do roku 2017 (©Wouter Beukema, Ghent University, EFSA 2017).

Přestože mloci skvrnití jsou vysoce citliví vůči patogenu *Bsal* a při nakažení vykazují 100% mortalitu (Martel et al. 2014, Stegen et al. 2017), objevily se případy, kdy se infekce zřejmě nerozšířila na celou populaci. Na několika lokalitách v Holandsku, Belgii i Německu byla zaznamenána přítomnost *Bsal* u náhodně nalezených mrtvých jedinců, zatímco početnost jejich populací se nezměnila a neprojevíly se ani žádné klinické příznaky chytridiomykózy (Spitzen-van der Sluijs et al. 2016). Účinky chytridiomykózy tak mohou být na úrovni populací devastující, zatímco na úrovni jedince nemusí být zaznamenány (Van Rooij et al. 2015). Další nález plísně *Bsal* byl potvrzen ve Velké Británii u čolků velkých (*Triturus cristatus*) chovaných v zajetí (Cunningham et al. 2015). Nedávno byl patogen objeven rovněž v soukromém chovu ve Španělsku (Fitzpatrick et al. 2016). Ze studie Sabino-Pinto et al. (2015) vyplývá, že patogen *Bsal* má devastující dopady na všechny čtyři druhy mloků (*S. salamandra*, *S. algira*, *S. corsica* a *S. infraimmaculata*) včetně dvanácti poddruhů mloka skvrnitého. V jednom soukromém chovu v Německu došlo k více než 50% ztrátám, přičemž chovaní mloci vykazovali téměř 100% prevalenci infekce touto plísní. Jelikož mloci mají velmi široký areál rozšíření (*S. algira* pochází ze severní Afriky, *S. corsica* z ostrova Korsika, *S. infraimmaculata* z Blízkého Východu a evropský druh *S. salamandra* s dvanácti poddruhy se rozprostírá od Portugalska po Ukrajinu), zavlečení a šíření patogenu *Bsal* do divokých populací může mít v budoucnu naprosto zničující dopad (Sabino-Pinto et al. 2015).

Mezinárodní obchod s ocasatými obojživelníky

Nedávné studie předpokládají, že se patogen *Bsal* rozšířil z Asie do Evropy mezinárodním obchodem s obojživelníky (Martel et al. 2014, Cunningham et al. 2015, Yap et al. 2015). Z Asie se ročně dováží obrovské množství mloků a čolků do celého světa. Nicméně oficiální kvantitativní údaje týkající se pohybu zvířat v rámci obchodu mezi EU a zeměmi třetího světa nejsou k dispozici, protože neexistuje žádný univerzální harmonizovaný systém kódování komodit (EFSA 2017). Mezi tři nejčastěji dovážené druhy patří: čolek modroocasý (*Cynops cyanurus*), č. ohňobřichý (*Cynops pyrrhogaster*) a pačolek vietnamský (*Paramesotriton deloustali*), jež byly identifikovány jako pravděpodobný rezervoár patogenu (Martel et al. 2014). Například do Spojených Států Amerických se ročně doveze 100 000 kusů obojživelníků rodu *Cynops* spp. a *Paramesotriton* spp. (Richgels et al. 2016). V roce 2013 se do Holandska dovezlo 21 000 jedinců druhu *Paramesotriton chinensis*, *Notophthalmus viridescens* a *Cynops* spp. (Spitzen-van der Sluijs et al. 2015). Dalšími asijskými obojživelníky (a potenciálními vektory *Bsal*) hojně dováženými do EU jsou čolci rodů *Pachytriton*, *Tylotriton* a *Salamandrella* (EFSA

2017).

Podle nejnovějších studií je zřejmé, že potenciálním vektorem patogenu mohou být kromě ocasatých obojživelníků i žáby (Nguyen et al. 2017, Stegen et al. 2017). Druh vietnamské kuňky (*Bombina microdeladigitora*), který byl nedávno importován do Evropy, byl pozitivní jak v místě původu (Sa Pa, Lao Cai Province, Vietnam), tak v německém obchodě se zvířaty, přičemž se jednalo o stejný kmen patogenu *Bsal* (Nguyen et al. 2017). Experimentální naočkování ropušky starostlivé (*Alytes obstetricans*) houbou *Bsal* bylo rovněž úspěšné. Přestože intenzita zoospor byla po několika týdnech od inokulace nízká a infekce asymptomatická, k přenosu patogenu na citlivé mloky skvrnité to stačilo (Stegen et al. 2017). Vzhledem k těmto poznatkům dostává riziko přenosu prostřednictvím mezinárodního obchodu mnohem širší rozměr. *Bombina microdeladigitora* sice není druhem, který by se ve velkém množství vyvážel do světa (Nguyen et al. 2017), ale např. její příbuzná *Bombina orientalis* patří k běžně prodávanému druhu v našich obchodech se zvířaty a je pro svou nenáročnost, výrazné zabarvení a denní aktivitu mezi chovateli a zoologickými zahradami velmi oblíbená (Havlíková et al. 2015).

V Severní Americe najdeme nejvýznamnější ohniska biodiverzity ocasatých obojživelníků čítající 48 % z 676 známých druhů; 190 druhů v USA, 137 druhů v Mexiku a 21 druhů v Kanadě (Yap et al. 2015). Přestože se v těchto zemích nález plísně *Bsal* zatím nepotvrdil, je vysoká pravděpodobnost jejího zavlečení právě díky masovému obchodu s obojživelníky (Richgels et al. 2016). Ze zdrojů databáze CITES vyplývá, že největším dovozcem obojživelníků do ČR jsou USA, Kanada a Hong kong (zdroj: CITES.org).

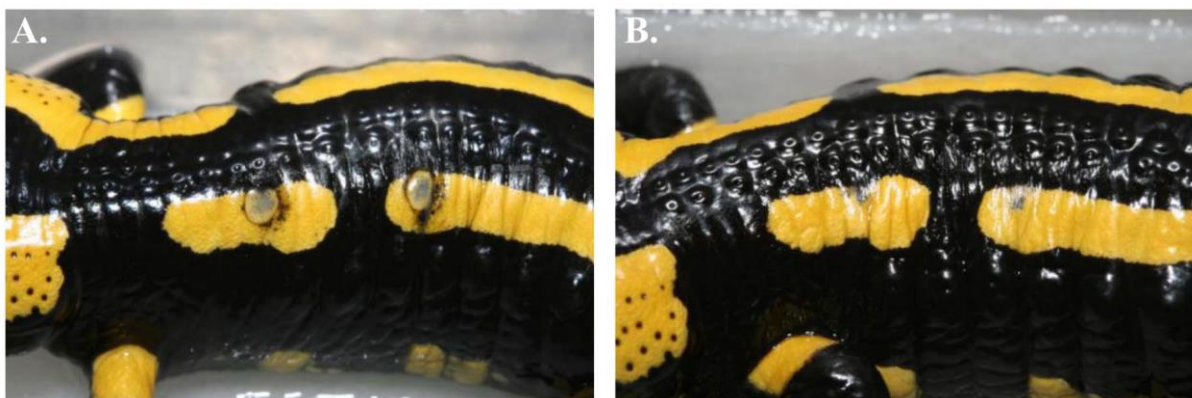
Diagnóza a léčba patogenu *Bsal*

Neinvazivní metodou odběru vzorku je kožní stěr ze živého obojživelníka, po kterém následuje detekce *Bsal* DNA použitím kvantitativní polymerázové reakce qPCR. Minimální intenzita zoospor pro detekci touto metodou je teoreticky 0,1 GE. Analyzovat lze i ústřížky prstů a vzorky kůže (Bloom et al. 2013). Tato metoda je velmi citlivá a je schopná detekovat houbu, aniž by se projevil klinické příznaky chytridiomykózy (Martel et al. 2014). Alternativními metodami detekce patogenu je histopatologie kůže, imunohistochemie s použitím polyklonálních protilátek a nově vyvinutá metoda laterálního průtoku (Dillon et al. 2017).

Neschopnost mloků skvrnitých vyvolat imunitní reakci vůči patogenu vylučuje očkování jako možnost zmírnění citlivosti a vytvoření kolektivní imunity (Stegen et al. 2017). Jelikož patogen

Bsal napadá hlavně ocasaté obojživelníky (Martel et al. 2014), léčba zvýšením teploty je vhodná pouze pro některé druhy. Pro eliminaci sesterské plísně *Bd* je potřeba vystavit jedince teplotám 30 °C i vyšším (Woodhams et al. 2003), což přesahuje kritickou teplotní mez u většiny ocasatých (Bury 2008). Nejvhodnější teplota pro účinnou léčbu ocasatých obojživelníků byla stanovena na 25 °C, po dobu 10 dní, obr. 7 (Bloom et al. 2015a), nicméně nedávné poznatky ukázaly, že minimálně jeden z kmenů *Bsal* odolal teplotám i nad 26 °C (Laking et al. 2017). Při experimentálním nakažení a léčení jedinců mloka skvrnitého byla léčba zvýšením teploty na 25 °C po dobu 10 dnů úspěšná (Stegen et al. 2017).

Další možností je léčba farmaky, konkrétně kombinací polymixinu E a voriconazolu při teplotě 20 °C. Infikované zvíře se ponoří do roztoku polymyxinu E (2000 IU/ml) na 10 minut. Poté je ošetřeno postříkem voriconazolu (12,5 µg/ml). K úplnému potlačení patogenu *Bsal* je nutné léčbu opakovat dvakrát denně po dobu 10 dnů (Bloom et al. 2015b).



Obr. 7. Na obrázku A jsou patrné kožní léze způsobené infekcí *Batrachochytrium salamandrivorans*. Po ošetření zvýšením teploty na 25 °C po dobu 10 dní jsou léze zřetelně menší (B) a nakonec zcela zmizí (©Bloom et al. 2015b).

Součástí úspěšné léčby a prevence je i dodržení přísných hygienických opatření. Na základě výsledků studie je doporučeno dezinfikovat všechny pomůcky použité v terénu, laboratorní a chovatelské zařízení desinfekčními přípravky: 1% Virkon S®, 4% chlornan sodný a 70% etanol, minimálně pět minut 1% Virkonem a jednu minutu ostatními desinfekčními přípravky (Van Rooij et al. 2017).

2. Cíle dizertační práce

2.1 Sledování patogenu *Bd* v ČR – chovy

První projekt byl zaměřen na zoologické zahrady, herpetologické stranice, komerční prodejce a soukromé chovatele. Hlavním cílem této studie bylo potvrdit/vyvrátit výskyt *Bd* u obojživelníků chovaných v zajetí u nás, případně určit prevalenci onemocnění a porovnat patogenitu v různých typech chovných zařízení a mezi druhy. V případě pozitivních nálezů byla snaha o zjištění původu zvířat a navržení konkrétních postupů zabráňujících dalšímu šíření nemoci (léčba, karanténa, hygienická opatření).

2.2 Sledování patogenu *Bd* na Balkánském poloostrově – volně žijící populace

Vzhledem k tomu, že znalosti o výskytu původce chytridiomykózy jsou nezbytné pro účinnou ochranu obojživelníků, hlavním cílem projektu bylo zmapování výskytu *Bd* v dosud neprobádaných oblastech Balkánského poloostrova, především v Černé Hoře. Konkrétně jsme se snažili zjistit 1) přítomnost patogenu v oblasti, 2) porovnat intenzitu nákazy mezi jednotlivými druhy a mezi lokalitami, 3) v případě pozitivních výsledků srovnání mezi stejnými nebo příbuznými druhy, či mezi oblastmi s podobnými klimatickými a geografickými podmínkami.

2.3 Sledování patogenu *Bsal* u ocasatých obojživelníků v ČR – volně žijící populace a chovy

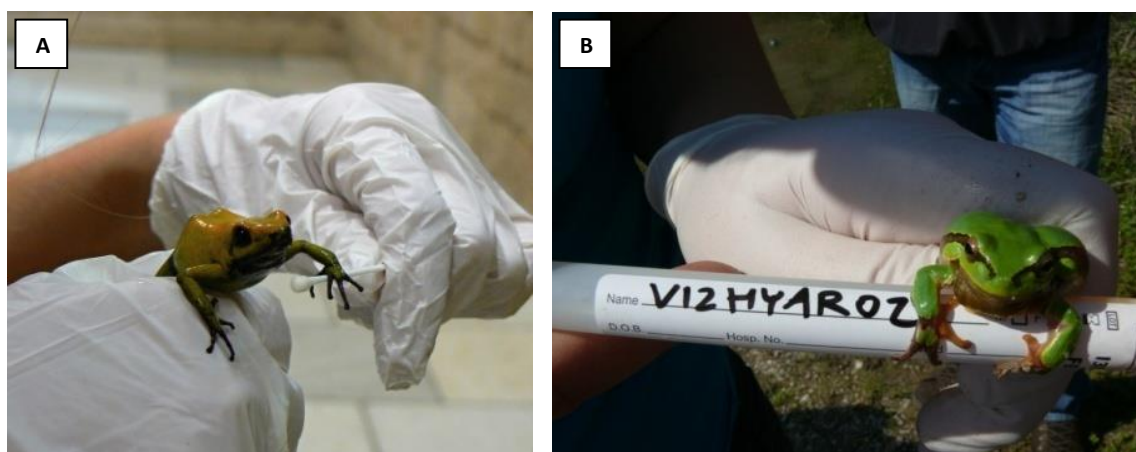
ČR, zvláště pak Praha, patří k oblastem se zvýšeným rizikem výskytu patogenu *Bsal*. Je zde poměrně bohatá diverzita ocasatých obojživelníků (Sillero et al. 2014, Šťastný et al. 2015), ČR sousedí s Německem s potvrzeným výskytem *Bsal* v chovech (Sabino-Pinto et al. 2015) a zejména v Praze je situována rozsáhlá síť chovatelů a komerčních prodejců (Havlíková et al. 2015). Hlavním cílem třetího projektu bylo zmapování výskytu *Bsal* u ocasatých obojživelníků v Praze a přilehlém okolí jak ve volné přírodě, tak i v chovech obojživelníků.

3. Metodika

3.1 Sběr dat

Odběr vzorků probíhal u všech tří dílčích studií stejným způsobem, proto je tato část metodiky společná. Případné odlišnosti jsou uvedeny u jednotlivých studií.

Vzorkování bylo prováděno nedestruktivní metodou stěry z pokožky obojživelníků standardizovanými výtěrkami Dryswab® (MW100, Medical Wire & Equipment Co, UK) podle uznávané metodiky (Hyatt et al. 2007). S obojživelníky se manipulovalo velmi šetrně za použití jednorázových gumových rukavic, které byly měněny při každém kontaktu s novým jedincem, aby se zabránilo možné kontaminaci mezi jedinci (Forzan et al. 2008). Stěr byl proveden pěti tahy tam a zpět po obou bocích, břiše, zádech, vnitřní straně stehen a poté jeden stěr z plovací blány zadních nohou. Při vzorkování každého jedince byly dodržovány předepsané hygienické bezpečnostní předpisy; dezinfekce veškerých použitých pomůcek, případně použití jednorázového materiálu, důkladné očištění a dezinfikování obuvi při přesunech na další lokality (Wellington & Haering 2008). Nejšetrnější metodou dezinfekce pro okolí je úplné vysušení na slunci po dobu nejméně tří hodin (Williams et al. 2002). Každý vzorkovaný jedinec byl evidován¹ včetně fotografického záznamu k případnému pozdějšímu zjištění přítomnosti symptomů.



Obr. 8. (A) Odběr stěru standardizovanou výtěrkou (zoo Zlín, *Phyllobates terribilis* © Barbora Havlíková). (B) Identifikace jedince² (Černá Hora, Virpazar, *Hyla arborea* © Jirí Vojar).

¹Evidence každého jedince byla provedena co nejpodrobněji; měřením, určením pohlaví, určením vývojového stádia (juvenil/adult), popisem lokality (typ habitatu, zeměpisná délka a šířka, nadmořská výška), přidělením identifikačního kódu: první dvě písmena – název lokality, druhá dvě písmena – druhové jméno, třetí dvě písmena – rodové jméno, číslo – pořadí příslušného druhu v řadě.

²V tomto případě kód VI2HYAR02 znamená: lokalita Virpazar 2, *Hyla arborea*, druhý vzorkovaný jedinec na lokalitě.

Vzorkování na přítomnost patogenu *Bd* v chovech se uskutečnilo v období mezi červnem 2012 a únorem 2014. Vzorky byly odebírány v různých typech chovných zařízení obojživelníků. Vzorkování bylo zaměřeno jak na státní instituce (zoologické zahrady, herpetologické stanice), tak na komerční obchod s obojživelníky (prodejny se zvířaty, burzy) a na soukromé chovatele. Různé typy zařízení byly sledovány záměrně, aby bylo možné provést jejich srovnání, co se týče prevalence výskytu *Bd*. Z každého terária bylo odchyceno tři až pět jedinců stejného druhu, u kterých byl proveden stěr.

U akvatických druhů; např. drápatka vodní (*Xenopus laevis*), žebrovník Waltlův (*Pleurodeles waltl*), čolek východní (*Cynops orientalis*), axolotl mexický (*Ambystoma mexicanum*) byla provedena detekce patogenu *Bd* přímo ze vzorků vody, ve které se daný obojživelník nacházel. Zde je totiž velká pravděpodobnost nákazy kontaminovanou vodou obsahující zoospory *Bd*, tzv. environmentální DNA (Daszak et al. 2000, Johnson & Speare 2005). Akvatické druhy se chovají většinou ve velkém množství a odebrání vzorku z každého jedince by bylo finančně i časově náročné. Výhodou této metody je detekce patogenu z jediného vzorku vody, čímž se ovzorkuje celé akvárium. V případě pozitivních nálezů je zapotřebí přeléčit celé akvárium, takže není nutné vědět, který konkrétní jedinec byl nakažený.

Na Balkánském poloostrově se na přítomnost *Bd* vzorkovalo v Černé Hoře, Albánii a Makedonii. Pilotní studie byla provedena v roce 2013, kdy se vzorky odebíraly spíše náhodně na jedné lokalitě v Černé Hoře, aby se získaly předběžné informace o přítomnosti *Bd* v této oblasti. O rok později byl v Černé Hoře proveden intenzivní výzkum na třinácti lokalitách. Na každé lokalitě bylo odchyceno a ovzorkováno minimálně 30 jedinců stejného druhu, aby bylo dosaženo věrohodnosti v případě negativních výsledků (Digiacoimo & Koepsell 1986).

Během podzimu 2015 a následujícího jara 2016 se vzorkovalo na přítomnost patogenu *Bsal* v Praze a přilehlém okolí jak ve volné přírodě, tak i v chovech obojživelníků. Bylo vytipováno devět lokalit s volně žijícími populacemi mloka skvrnitého, čolka obecného a čolka horského. Z chovatelských zařízení byly vybrány čtyři sbírky obojživelníků soukromých chovatelů a pražská zoologická zahrada, která se mimo jiné specializuje na chov velemloka čínského (*Andrias davidianus*).

3.2 Analýza vzorků

Detekce *Bd* byla provedena kvantitativní real-time PCR (qPCR) metodou (Boyle et al. 2004) s přidáním bovinního séra albumin (BSA) kvůli omezení inhibice PCR (Garland et al. 2010). Tato metoda je vysoce citlivá (schopná zachytit infekci jednotlivých buněk), specifická (primery jsou navrženy přímo pro *Bd* a byly testovány proti množství příbuzných skupin hub) a umožňuje kvantifikaci cílové DNA ve vzorku (Hyatt et al. 2007).

Vzorky ze stěrů byly uchovány v původním obalu v lednici při teplotě 4 °C, vzorky tkáně byly uchovány v etanolu. Špičky výtěrek nebo malé kousky tkáně byly smíchány s PrepMan® (reagencie pro přípravu vzorku), homogenizovány na MagNA Lyseru (Roche Diagnostics) a vařeny po dobu 10 minut. Takto připravené vzorky DNA se 10× ředily a poté se analyzovaly metodou qPCR. Výsledky analýzy jsou prezentovány jako genomický ekvivalent jedné zoospory (GE). Kvantifikační standardy o koncentracích 0.1, 1, 10 a 100 GE byly poskytnuty od Institute of Zoology, Zoological Society of London. Vzorek byl považován za pozitivní, pokud se zobrazila typická rostoucí fluorescenční křivka a výsledné množství bylo nad 0,1 GE. Analýzy vzorků se prováděly na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně, což bylo do nedávna jediné pracoviště v celé ČR, kde bylo možné tyto analýzy provádět. Nyní už jsou analýzy prováděny i v našich laboratořích na FŽP ČZU v Praze.

Detekce patogenu *Bd* ze vzorků vody byla provedena standardní PCR metodou (Annis et al. 2004) za použití jednoduchého filtračního systému k izolaci DNA (Walker et al. 2007) v laboratoři molekulární genetiky na FŽP ČZU.

Přítomnost patogenu *Bsal* se zjišťovala SYBR Green kvantitativní polymerázovou reakcí (qPCR) podle Blooi et al. (2013) a porovnávala se proti genomickým standardům *Bsal*, poskytla An Martel, Ghent University. U této metody byl často zjištěn fluorescenční růst nespecifických produktů, což poněkud komplikovalo interpretaci výsledků. U nejednoznačných výsledků byla po standardní PCR použita gelová elektroforéza k potvrzení identity produktů PCR. K detekci *Bsal* byla později použita doporučená metoda qPCR pro duplex *Bd+Bsal* (Blooi et al. 2013), která pracuje se specifickými sondami pro *Bd* a *Bsal* a jednoznačně detekuje tyto dva patogeny. Vyšší náklady na tuto analýzu jsou vyrovnány jasnějšími a konkrétnějšími výsledky. Analýzy na přítomnost patogenu *Bsal* jsou prováděny na VFU v Brně i na FŽP ČZU.

3.3 Statistické zpracování dat

Porovnání intenzity nákazy Bd mezi chovnými zařízeními a druhy

Podíl *Bd*-pozitivních oproti *Bd*-negativním vzorkům mezi typy chovných zařízení (ZOO, herpetologická stanice, soukromý chovatel, obchod se zvířaty) a mezi jednotlivými druhy obojživelníků byl analyzován pomocí zobecněných lineárních modelů (GLM) statistickým softwarem R, verze 2.10.1 (R Development CoreTeam 2009). Pro tyto účely jsme použili GLM log-lineární model s Poissonovým rozdělením, kde frekvence nakažených/čistých byly vysvětlovány a parametry prostředí vysvětlujícími proměnnými. Obojživelníci chovaní ve společné nádrži nemohli být považováni za nezávislé měření v důsledku pseudo-replikací (tj. zvířata ze stejné nádrže měla vyšší pravděpodobnost, že budou nakažená, Crawley 2007). Z tohoto důvodu jsme jako jednotku pro analýzu použili nádrž místo jedince. Při porovnání přítomnosti *Bd* mezi zoologickými zahradami následoval stejný postup. K otestování významnosti každé vysvětlované proměnné v modelu jsme použili chí-kvadrát test (Crawley 2007).

Porovnání intenzity nákazy Bd mezi balkánskými druhy a zeměmi

Konfidenční intervaly prevalence (95%, Sterne's exact method) mezi balkánskými druhy byly počítány pomocí softwaru Quantitative Parasitology (Rózsa et al. 2000). Přítomnost *Bd* mezi třemi zeměmi (Albánie, Černá Hora, Makedonie) byla porovnáována metodou zobecněných lineárních modelů (GLM) a statistickým softwarem R, verze 2.10.1 (R Development CoreTeam2009). Pro GLM jsme použili log-lineární model s Poissonovým rozdělením vysvětlované proměnné (tj. frekvence *Bd*-pozitivních a *Bd*-negativních vzorků v každé zemi či podle druhu). Správnost výsledného modelu byla diagnostikována standardními metodami

Porovnání intenzity nákazy Bsal ve volné přírodě a chovech ČR

Konfidenční intervaly (99 % Sterne-Wald) jsou při nulové prevalenci *Bsal* 0,0–4,2 % v divočině a 0,0–2,6 % v zajetí (Rózsa et al. 2000). Vzhledem k absenci *Bsal* + byly počítány konfidenční intervaly prevalence. Standardní testy provedeny být nemohly (bez *Bsal* +).

4. Výsledky

Problematika chytridiomykózy je diskutovaným tématem po celém světě. Přestože se výzkumem plísně *Bd* zabývají vědci téměř 20 let (Berger et al. 1998, Longcore et al. 1999), v ČR je studován polovinu této doby, od roku 2008 (Baláž et al. 2009, Civiš et al. 2010). Je to zřejmě způsobeno tím, že v ČR nebyly doposud zjištěny žádné dramatické úhyny související s chytridiomykózou (Civiš et al. 2010, 2012, Baláž et al. 2014), jako tomu bylo v tropických zemích (Collins 2010) a jižní Evropě (Bosch et al. 2001). Nicméně většina druhů obojživelníků žije převážně skrytě, a tak jejich úmrtnost může zůstat bez povšimnutí (Gray et al. 20017). Ačkoli je výskyt našich obojživelníků dobře zmapovaný (Moravec 1994, Vojar et al. 2008, Šandera et al. 2010, www.biolib.cz), studie týkající se populační dynamiky obojživelníků obecně chybí, takže nelze tvrdit, že patogen *Bd* (potažmo *Bsal*) nemá na naše obojživelníky žádný vliv.

V rámci ČR se výzkum patogenu *Bd* nejprve soustředil na obojživelníky žijící ve volné přírodě (Civiš et al. 2012, Baláž et al. 2014). Od roku 2012 jsme začali monitorovat i obojživelníky chované v zajetí se zaměřením na zoologické zahrady, herpetologické stanice a soukromé chovatele (Havlíková et al. 2015, **příloha I. a**). V roce 2014 se náš výzkum přesunul do jihovýchodní Evropy na Balkánský poloostrov, kde se monitoring na přítomnost *Bd* dosud neprováděl (Vojar et al. 2017, **příloha I. b**). S objevem, nebezpečným šířením a devastujícím dopadem nově popsané plísně *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel et al. 2013) se naše pozornost zaměřila na ocasaté obojživelníky ve volné přírodě i v chovech ČR, konkrétně v Praze a přilehlém okolí (Baláž et al., *in press*, **příloha I. c**).

4.1 Potvrzení výskytu patogenu *Bd* v umělých chovech v České republice (příloha I. a)

Na základě našich výsledků byla přítomnost *Bd* potvrzena v ČR v umělých chovech obojživelníků. Z 610 získaných vzorků jsme zaznamenali pozitivní výsledky na přítomnost *Bd* u 31 z nich (5,1 %). Z celkových 117 vzorkovaných druhů se u osmi z nich (6,8 %) potvrdila infekce touto plísní. Jednalo se o druhy: *Bombina scabra*, *Dendrobates azureus*, *Neurergus kaiserii*, *Osteopilus septentrionalis*, *Silurana amieti*, *Silurana* sp. (nepopsaný druh importovaný z Ghany), *Theloderma bicolor* a *Theloderma stellatum*.

Vzorky jsme odebírali ve 21 chovných zařízeních; v osmi zoologických zahradách, jedné herpetologické stanici, ve třech obchodech se zvířaty, u jednoho prodejce na burze a u osmi soukromých chovatelů. Patogen *Bd* jsme našli ve dvou zoologických zahradách, jedné

herpetologické stanici a u dvou soukromých chovatelů. Počty zdravých a nakažených jedinců se na přítomnost *Bd* mezi různými typy chovných zařízení významně nelišily. Poměr pozitivních jedinců se ale významně lišil mezi jednotlivými taxony. Zatímco u řádu Anura se ze 416 vzorkovaných jedinců plíseň objevila ve 34 případech (8,2 %), u řádu Caudata byl pozitivní pouze jediný vzorek (1/198). Nejvyšší míra infekce (69,6 %) byla nalezena u čeledi Pipidae, rodu *Silurana* spp.; konkrétně u druhu *Silurana amiети* a *Silurana* sp. (blíže nepopsaný druh importovaný z Ghany). Nakažení jedinci však nevykazovaly žádné typické symptomy chytridiomykózy. Bez zjevných symptomů byla většina vzorkovaných jedinců, čemuž odpovídala i intenzita nákazy. Ta se pohybovala v mírných hodnotách GE (0,4–188,3 GE), pouze u dvou případů jsme zaznamenali vyšší a velmi vysoké intenzity (331,3 a 9230 GE), s typickými příznaky chytridiomykózy a následným úhynem jedinců (*Dendrobates azureus*). Mírné příznaky (změny na kůži) se objevily u čeledi Rhacophoridae, kde jsme přítomnost *Bd* zaznamenali u 22,5 %; u druhů *Theلودerma bicolor* a *Theلودerma stellatum*. Oba zmíněné druhy projevily vysokou citlivost vůči léčbě itraconazolem. U druhu *Theلودerma bicolor* došlo po první léčebné koupeli ke ztrátě zraku a k následnému úhynu šesti léčených jedinců. Několik metamorfovaných jedinců *T. stellatum* uhynulo po měsíci od zahájení léčby a u pěti pulců se projevila malformace ústního disku. Výsledky nám potvrdily, že se léčba musí volit velmi uvážlivě; na základě intenzity onemocnění a citlivosti jednotlivých druhů (Bielby et al. 2008, Searle et al. 2011). Není vhodné aplikovat léčbu itraconazolem (dle Forzana et al. 2008) preventivně, při nízkých intenzitách patogenu ani při léčbě larválních a juvenilních stádií. V těchto případech je vhodnější použít léčbu zvýšením teploty (Woodhams et al. 2003), snížením koncentrace itraconazolu u metamorfovaných jedinců (Brannelly et al. 2012) nebo použitím voriconazolu (Martel et al. 2011), který je bezpečný jak pro citlivé druhy, tak pro pulce.

Výsledky detekce patogenu *Bd* přímo ze vzorků vody nebyly zcela jednoznačné. Některé vzorky vody vyšly na přítomnost *Bd* pozitivně, zatímco všechny kontrolní vzorky ze stěrů byly negativní. K protichůdnosti výsledků mohlo dojít z více důvodů; ve vodě mohla být environmentální zbytková DNA, která se na obojživelnících nenacházela, mohlo jít o mrtvé zoospory, stěry mohly být náhodně odebrány z míst, kde se zoospory na obojživelníkovi nenacházely, stěry nebyly odebrány ze všech zvířat v nádrži, takže mohlo dojít k náhodnému odběru neinfikovaných zvířat, vzorky ze stěrů mohly být kontaminovány. Vzhledem k nejednoznačnosti výsledků nelze dělat závěry.

4.2 První rozsáhlý průzkum patogenu *Bd* na Balkánském poloostrově (příloha I. b)

V průběhu dvou let (2013 a 2014) jsme odebrali 454 vzorků na území Černé Hory, Albánie a Makedonie. Patogen *Bd* byl detekován u 65 vzorků (14,3 %), u pěti druhů z 11 testovaných (*Bombina variegata*, *Hyla arborea*, *Lissotriton vulgaris*, *Pelophylax* sp. a *Triturus macedonicus*), na 13 lokalitách z celkových 38. Poměr nakažených jedinců se mezi zeměmi významně nelišil. Jelikož byl v Albánii a Makedonii odebrán poměrně nízký počet vzorků, detailněji jsme se v rámci porovnání mezi druhy zaměřili pouze na Černou Horu. V roce 2013 byl výskyt plísňe *Bd* v Černé Hoře potvrzen u 12, 5 % vzorkovaných jedinců, v roce 2014 u 14,6 % testovaných. Intenzivní výzkum v Černé Hoře v roce 2014 potvrdil přítomnost *Bd* u 18,7 % žab z 267 testovaných a pouze u jednoho ocasatého z 84 (1,2 %). Poměr nakažených a zdravých jedinců se významně lišil jak mezi druhy, tak mezi lokalitami. Nejvyšší míra infekce se objevila u rodu *Pelophylax* sp.; ze 160 vzorkovaných jedinců bylo 49 (30,6 %) *Bd* pozitivních. Tento výsledek je významný z hlediska výskytu skokana *Pelophylax shqipericus*, endemita Albánie a jihu Černé Hory, který je podle Červeného seznamu IUCN ohroženým druhem. Jeho budoucí existence je ohrožena zejména znečištěním vodních zdrojů a odchylem pro komerční účely. Proto je nezbytné zjistit, jaký vliv má chytridiomykóza na pokles jeho populací. Naše data podporují významnou roli skokanů rodu *Pelophylax* sp. jako přenašečů *Bd* (Woodhams et al. 2007b, Baláž et al. 2014a). Nízká variabilita prevalence *Bd* mezi různými lokalitami naznačuje, že tito skokani jsou sami o sobě nejdůležitějším faktorem výskytu *Bd*, zatímco faktory prostředí mohou mít sekundární vliv. Vzhledem k tomu, že jsou vodní skokani schopni se šířit na velké vzdálenosti, jejich populace jsou početné a navíc jsou vůči *Bd* imunní (Woodhams et al. 2012), měli by být důležitým předmětem studia pro pochopení dynamiky infekce *Bd*.

4.3 Výzkum nového patogenu *Bsal* u obojživelníků ve volné přírodě a v chovech v rámci ČR (příloha I. c)

Během podzimu 2015 a jara 2016 bylo odebráno 126 vzorků z ocasatých obojživelníků ve volné přírodě na devíti lokalitách Prahy a přilehlého okolí. U všech tří testovaných druhů (mlok skvrnitý, čolek obecný, č. horský) nebyla přítomnost patogenu *Bsal* detekována. V umělých chovech obojživelníků byly vzorky odebírány v pražské zoologické zahradě a čtyřech soukromých chovatelů. V rámci 198 vzorků z 60 druhů rovněž nebyla přítomnost patogenu *Bsal* potvrzena.

Vzhledem k potenciální hrozbě *Bsal* pro naše obojživelníky (Martel et al. 2014) budou nezbytné další kroky včetně prevence, navazujícího výzkumu na dalších lokalitách a kontrolách již sledovaných populací. Zejména při monitoringu musí být kladen obrovský důraz na dodržování přísných hygienických pravidel a opatrnost při jakékoli manipulaci se zvířaty. V ideálním případě je snaha se manipulaci zcela vyhnout – tzv. pasivní kontrola, kdy se symptomy nemoci sledují pouze vizuálně. Zapojit by se měli všechny zainteresované strany navštěvující stanoviště obojživelníků (terénní pracovníci, vědci, výzkumníci, ochránci přírody, dobrovolníci atd.) Shromažďují se podezřelé případy, sleduje se úmrtnost a teprve pak následuje konkrétní vyšetření na přítomnost *Bsal* (aktivní kontrola). To je v mnoha ohledech, a zvláště u ocasatých obojživelníků, nejvhodnější metodou detekce patogenu (EFSA 2017).

5. Závěr

Vzhledem k vážnému ohrožení obojživelníků patogeny *Bd* a *Bsal* je intenzivní výzkum přítomnosti, prevalence a dynamiky obou plísní naprosto nezbytný (při zachování striktních hygienických pravidel). Monitoringem plísně *Bd* se náš výzkumný tým zabývá od roku 2008, kdy byl poprvé potvrzen její výskyt ve volné přírodě v ČR u ropuchy obecné a skokanů rodu *Pelophylax* (Baláž et al. 2009). Ačkoli v našich podmínkách nebyly doposud zjištěny masové úhyny v důsledku chytridiomykózy a míra infekce byla u většiny testovaných jedinců nízká, odpovídající evropskému průměru, je třeba tomuto patogenu věnovat zvýšenou pozornost. Samotná přítomnost plísně může působit synergicky s ostatními negativními vlivy, což může být pro obojživelníky fatální. V souvislosti se změnami klimatu se může měnit i vliv patogenu *Bd* a naše druhy se vůči němu mohou stát časem citlivější.

Jelikož šíření chytridiomykózy úzce souvisí s mezinárodním obchodem s obojživelníky, zaměřili jsme se v této práci mimo jiné na umělé chovy. V rámci našeho výzkumu jsme zmapovali výskyt plísně *Bd* a *Bsal* u obojživelníků chovaných v zajetí, zjistili a porovnali prevalenci mezi jednotlivými druhy a chovnými zařízeními a v případě pozitivních nálezů jsme navrhli vhodnou léčbu. Přítomnost patogenu *Bd* jsme zaznamenali hlavně ve formě mírných asymptomatických infekcí, ale vyskytly se i případy akutních onemocnění, která mohou ohrozit celé chovy. V případě vzácných a nákladných druhů tak může přítomnost patogenu způsobit i značné finanční škody. Mnohem závažnější škody ale může způsobit přenos plísně do volné přírody. Proto je nezbytné riziko přenosu zmírnit. Na základě výsledků a poznatků tohoto výzkumu bychom měli být schopni nastavit opatření zabráňující dalšímu šíření patogenu. Na začátku je potřeba přesně určit distribuci nemoci, zajistit kontrolu a ochranu zdravých chovů. Už k tomuto cíli je nutné optimalizovat systém sběru vzorků a zrychlit celý proces od odběru vzorku po oznámení výsledků. Následná léčba nebo zrušení chovů je už na chovatelích, ale lze očekávat, že v případě cenných chovů budou mít o léčbu zájem. V mezinárodním měřítku vznikají snahy o detailní dohled, implementaci přísných hygienických a karanténních opatření a v celkovém důsledku o omezení importu a chovu obojživelníků (Young et al. 2007). Jenže právě schopní chovatelé mohou mnohým vzácným druhům umožnit jejich přežití v zajetí a omezit tak dopad chytridiomykózy na volně žijící populace (např. posílením stávajících populací reintrodukcemi).

Na základě výsledků našich výzkumů se zatím nepodařilo prokázat ani vyvrátit, že by plíseň *Batrachochytrium dendrobatidis* bezprostředně ohrožovala obojživelníky ve volné přírodě

ČR. Vyloučeno to ovšem není, jelikož působení *Bd* u nás není zatím zcela jasné. Pokud se plíseň objeví v umělých chovech, může být fatální nejen pro obojživelníky v zajetí (většinou se chovají citlivé tropické druhy), ale může ohrozit i volně žijící populace (riziko přenosu patogenu do přírody). Tyto výsledky korespondují s naším dalším výzkumem provedeným ve volné přírodě v Černé Hoře, kde jsme rovněž zaznamenali pouze mírné infekce bez zjevných symptomů a úhynů. Nelze ovšem tvrdit, že patogen nemá na obojživelníky žádný vliv. Zdá se ale, že významnou roli z hlediska šíření patogenu zde mají skokani rodu *Pelophylax*, kteří jsou vůči němu rezistentní a v přírodě působí jako potenciální přenašeči (Woodhams et al. 2012, Baláž et al. 2014a).

Plíseň *Batrachochytrium salamandrivorans* může mít v našich podmínkách mnohem závažnější dopad. Ačkoli jsme zatím přítomnost patogenu *Bsal* ve volné přírodě ani v chovech v ČR nepotvrdili, jeho devastující účinky jsou známy z Holandska a Belgie, kde téměř vymizely populace mloků skvrnitých (Martel et al. 2013, Spitzen-van der Sluijs et al. 2013, Martel et al. 2014). V rámci Evropy byl výskyt patogenu také potvrzen v chovech ve Velké Británii, Německu a Španělsku (Cunningham et al. 2015, Joana Sabino-Pinto et al. 2015, Fitzpatrick et al. 2016), takže pravděpodobnost zavlečení na naše území je poměrně vysoká. Stálý výbor Bernské úmluvy proto vydal doporučení č. 176 týkající se prevence a kontrol patogenu *Bsal*. Podle něj by měly evropské země přijmout opatření zahrnující programy pro kontrolu a monitoring možného šíření patogenu, zejména v rizikových oblastech, a vypracovat akční plány umožňující rychlou reakci v případě propuknutí infekce (Council of Europe 2015).

Státy Nového světa mají ještě přísnější legislativu. V USA byl v lednu 2016 vydán zákaz importu ocasatých obojživelníků za účelem ochrany divokých populací před tímto smrtícím patogenem. Zákaz platí jak pro dovoz obojživelníků³ do USA, tak pro mezistátní přepravu mezi státy Columbia, Puerto Rico a veškerými státy USA. Vztahuje se na živé i mrtvé exempláře a jejich části s výjimkou povolení pro zoologické, vzdělávací, lékařské nebo vědecké účely (U. S. Fish and Wildlife Service 2016). V Kanadě byl od května 2017 rovněž zakázán dovoz ocasatých obojživelníků. Kanadská vláda vydala zákaz importu pro všechny druhy řádu Caudata po dobu jednoho roku, pokud není k dispozici povolení. Toto omezení

³Zákaz importu ocasatých obojživelníků do USA platí pro následující rody: *Chioglossa*, *Cynops*, *Euproctus*, *Hydromantes*, *Hynobius*, *Ichthyosaura*, *Lissotriton*, *Neurergus*, *Notophthalmus*, *Onychodactylus*, *Paramesotriton*, *Plethodon*, *Pleurodeles*, *Salamandra*, *Salamandrella*, *Salamandrina*, *Siren*, *Taricha*, *Triturus* a *Tylosotriton*.

dovozu zahrnuje živé i mrtvé exempláře, jejich vajíčka, spermie, tkáňové kultury a embrya nebo jakékoli části či deriváty těchto živočichů (Environment and Climate Change Canada 2017). V rámci Evropy však veškerá bezpečnostní opatření spadají pod politiku jednotlivých evropských států. V Belgii a Holandsku se bezpečnostní opatření zaměřují zejména na zvýšení informovanosti veřejnosti a vypracování nouzových akčních plánů (Gray et al. 2015). Zatím jedinou evropskou zemí, kde je dovoz všech druhů ocasatých obojživelníků zakázaný, je Švýcarsko (Gray et al. 2015).

Do ČR se ocasatí obojživelníci dováží především z USA a Asie (Hong Kong, Singapur). Státní veterinární správa ČR rovněž vydala opatření proti šíření nebezpečného patogenu. Od 1. září 2016 by měla kontrolovat všechny zásilky ze třetích zemí obsahující především druhy rodu *Cynops*, *Notophthalmus* a *Plethodon*. Zvířata mají být po dovozu na místo určení držena v izolaci několik dní odděleně od ostatních zvířat a jsou pod dozorem místně příslušné krajské veterinární správy (Státní veterinární správa 2016). Otázkou zůstává, zda tato opatření budou skutečně dodržována a zda budou dostačující. Podle EFSA 2017 by měla karanténa trvat minimálně 40 dní. Navíc podle nejnovějších studií mohou být vektorem pro přenos patogenu *Bsal* i žáby (Nguyen et al. 2017, Stegen et al. 2017), takže by se zákaz importovaných obojživelníků musel rozšířit o další druhy. Většina zemí kontroluje pouze importy domácích zvířat, u nichž hrozí nemoci veřejného či hospodářského významu (slintavka, kulhavka, vzteklna atd.). Importy volně žijících zvířat však nepodléhají kontrolám ani v případě, že jsou jejich nemoci uvedeny na seznamu OIE (Cunningham et al. 2017). Členské země OIE většinou ani nemají nastavené příslušné hygienické požadavky pro importovaná zvířata, protože mezinárodní obchod s obojživelníky je obecně neregulovaný a neevdovaný (Peel et al. 2012). Obchodní dohody EU často zakazují přerušování mezinárodního importu zvířat za účelem kontroly infekčních chorob, pokud nejsou země EU přímo součástí specifického programu pro jejich kontrolu. Dokonce i v případě, kdy je omezení v souladu s pravidly Světové obchodní organizace (WTO), jsou země EU neochotné zavádět tato omezení, pokud by je to ekonomicky znevýhodňovalo. Pokud by byla tato omezení implementována přímo na chytridiomykózu, mohlo by se zabránit dalšímu šíření skrze mezinárodní obchod (Hudson et al. 2016). Přestože je snaha o zavádění bezpečnostních opatření, kontrol a hygienických doporučení, z výše uvedeného vyplývá, že jen malé procento zemí se jimi bude opravdu řídit. Vzhledem k nekontrolovatelnému mezinárodnímu obchodu s obojživelníky, potažmo i rozšířenému černému trhu, je vysoká pravděpodobnost, že se tento smrtící patogen bude dále šířit. Bez restriktivní politiky, která by přesně stanovovala pravidla mezinárodního obchodu

(např. zákaz importů obojživelníků ze třetích zemí, testování importů evropských obojživelníků na *Bsal* atd.), se bude situace nejspíše zhoršovat. Úspěšnému zabránění šíření *Bsal* lze pravděpodobně dosáhnout jen kombinací přísné karantény a vstupních kontrol každého importovaného obojživelníka do EU (EFSA 2017), což je prakticky nemožné. Pokud propukne infekce v dalších zemích EU, věřím, že se vynaloží veškeré úsilí, aby se ochránily nenakažené populace a vyléčily ty napadené. Otázkou ovšem zůstává, zda už nebude pozdě. Nejvyšší pozornost by se v první řadě měla věnovat prevenci, ochraně volně žijících populací, systematickému monitoringu, kontrolám, dodržování přísných hygienických pravidel a informovanosti veřejnosti. Náš výzkumný tým v loňském roce navázal spolupráci se Státní veterinární správou ohledně případné pomoci při kontrolách a monitoringu importů. Momentálně žádáme o podporu Technologické agentury České republiky (TAČR), konkrétně v rámci programu TAČR Beta, kde bychom chtěli v rámci projektu zavést systém aktivního a pasivního monitoringu obou patogenů ve volné přírodě i v chovech, vyvinout metody léčby, nastavit systém spolupráce mezi univerzitami VFU, ČZU, Státní veterinární správou, MŽP ČR a AOPK ČR, chovateli, zoologickými zahradami a dalšími zainteresovanými subjekty. Vzhledem ke globálním dopadům na obojživelníky se *Bd/Bsal* staly jedním z nejvíce studovaných patogenů volně žijících zvířat. Vědecké poznatky mohou pomoci při prevenci i ochraně obojživelníků a zachování jejich biodiverzity.

6. Použitá literatura

- Alford R. A., Dixon P. M., Pechmann, J. H. K. (2001):** Global amphibian population declines. *Nature* 414: 449–500.
- Andreone F., Cadle J. E., Cox N., Glaw F., Nussbaum R. A., Raxworthy C. J., Stuart S. N., Vallan D., Vences M. (2005):** Species review of amphibian extinction risks in Madagascar: conclusions from the global amphibian assessment. *Conservation Biology* 19: 1790–1802.
- Annis S. L., Dastoor F. P., Ziel H., Daszak P., Longcore J. E. (2004):** A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40(3): 420–428.
- Bai Ch., Liu X., Fisher M. C., Garner T. W. J., Li Y. (2012):** Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China. *Diversity and Distributions* 18(3): 307–318.
- Baillie J. E. M., Hilton-Taylor C., Stuart S. N. (2004):** IUCN Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment. IUCN. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Baláz V., Balážová A., Haleš J. (2009):** Epidemická nemoc obojživelníků už i v ČR! In: J. Bryja, Z. Řehák and J. Zukal (eds.). Zoologické dny Brno 2009. Sborník abstraktů z konference 12. – 13. února 2009, p. 55. Ústav biologie obratlovců Akademie věd České republiky, Brno, Česká republika.
- Baláz V., Vörös J., Civiš P., Vojar J., Hettyey A., Sós A., Dankovics R., Jehle 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.
- Baláz V., Vojar J., Civiš P., Šandera M., Rozínek R. (2014b):** Chytridiomycosis risk among the Central European amphibians based on surveillance data. *Diseases of Aquatic Organisms* 112: 1–8.
- Baláz V., Solský M., González D., L., Havlíková B., Zamorano J., G., González Sevilleja C., Torrent L., Vojar J. (2018):** First survey of the pathogenic fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in wild and captive amphibians in the Czech Republic. *Salamandra* (in press).
- Barrionuevo S., Mangione S. (2006):** Chytridiomycosis in two species of *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Argentina. *Disease of Aquatic Organisms* 73: 171–174.
- Barrionuevo S., Aguayo R., Lavilla E. O. (2008):** First record of chytridiomycosis in Bolivia (*Rhinella quechua*; Anura: Bufonidae). *Disease of Aquatic Organisms* 82: 161–163.
- Beard K. H., O'Neill E. M. (2005):** Infection of an invasive frog *Eleutherodactylus coqui* by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hawaii. *Biological Conservation* 126: 591–595.
- Beebee T. J. C., Griffiths R. A. (2005):** The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125: 271–285.

- 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 of the United States of the America* 95: 9031–9036.
- 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. (2001):** Diseases in Australian frogs. PhD dissertation, James Cook University, Townsville, Australia.
- Berger L., Speare R., Hines H. B., Marantelli G., Hyatt A. D., McDonald K. R., Skerratt L. F., Olsen V., Clarke J. M., Gillespie G., Mahony M., Sheppard N., Williams C., Tyler M. J. (2004):** Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal* 82: 434–439.
- Berger L., Speare R., Skerratt L. F. (2005):** Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. *Disease of Aquatic Organisms* 68: 65–70.
- Bielby J., Cooper N., Cunningham A. A., Garner T. W. J., Purvis A. (2008):** Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. *Conservation Letters* 1: 82–90
- Blaustein A. R. & Kiesecker J. M. (2002):** Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5: 597–608.
- Blaustein A. R., Romansic J. M., Scheessele E. A., Han B. A., Pessier A. P., Longcore J. E. (2005):** Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* 19: 1460–1468.
- Blooi M., Pasmans F., Longcore J. E., Spitzen-van der Sluijs A., Vercammen F., Martel A. (2013):** Duplex Real-Time PCR for Rapid Simultaneous Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in Amphibian samples. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 4173–4177.
- Blooi M., Martel A., Haesebrouck F., Vercammen F., Bonte D., Pasmans F. (2015a):** Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Scientific Reports* 5: 8037.
- Blooi M., Pasmans F., Rouffaer L., Haesebrouck F., Vercammen F., Martel A. (2015b):** Successful treatment of *Batrachochytrium salamandrivorans* infections in salamanders requires synergy between voriconazole, polymyxin E and temperature. *Scientific Reports* 5: 11788.

- Bosch J., Martinez-Solano I., Garcia-Paris 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.
- Bosch J., Carrascal L. M., Duran L., Walker S., Fisher M. C. (2007):** Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 274(1607): 253–260.
- Bovero S., Sotgiu G., Angelini C., Doglio S., Gazzaniga E., Cunningham A. A., Garner T. W. J. (2008):** Detection of Chytridiomycosis Caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Endangered Sardinian Newt (*Euproctus platycephalus*) in Southern Sardinia, Italy. *Journal of Wildlife Diseases* 44(3): 712–715.
- Boyle D. G., Hyatt A. D., Daszak P., Berger L., Longcore J. E., Porter D., Hengstberger S. G., Olsen V. (2003):** Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes. *Diseases of Aquatic Organisms* 56: 59–64.
- Boyle D. G., Boyle B. D., Olsen V., Morgan J. A., Hyatt A. D. (2004):** Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 141–148.
- Bradley G. A., Rosen P. C., Sredl M. J., Jones T. R., Longcore J. E. (2002):** Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 38: 206–212.
- Brannelly, L. A., Richards-Zawacki, C. L., Pessier A. P. (2012):** Clinical trials with itraconazole as a treatment for chytrid fungal infections in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* 101: 95–104.
- Briggs C. J., Knapp R. A., Vredenburg V. T. (2010):** Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungus pathogen of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(21): 9695–9700.
- Brucker R. M., Harris R. H., Schwantes Ch. R., Gallaher T. N., Flaherty D. C., Lam B. A., Minbiole K. P. C. (2008):** Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology* 34:1422–1429.
- Burkhart J. G., Ankley G., Bell H., Carpenter H., Fort D., Gardiner D., Gardner H., Hale R., Helgen J. C., Jepson P., Johnson D., Lannoo M., Lee D., Lary J., Levey R., Magner J., Meteyer C., Shelby M. D., Lucier G. (2000):** Strategies for assessing the implications of malformed frogs for environmental health. *Environmental Health Perspectives* 108(1): 80–90.
- Bury R. B. (2008):** Low thermal tolerances of stream amphibians in the Pacific Northwest: Implications for riparian and forest management. *Applied Herpetology* 5: 63–74.

- Campbell C. R., Voyles J., Cook D. I., Dinudom A. (2012):** Frog skin epithelium: Electrolyte transport and chytridiomycosis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44(3): 431–434.
- Carnaval A. C. O. Q., Toledo L. F., Haddad C. F. B., Britto F. B. (2005):** Chytrid fungus infects high-altitude stream-dwelling *Hylodes magalhaesi* (Leptodactylidae) in the Brazilian Atlantic rainforest. *Froglog* 70: 3.
- Carnaval A. C. O. Q., Puschendorf R., Peixoto O. L., Verdade V. K., Rodrigues M. T. (2006):** Amphibian Chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic rain forest. *EcoHealth Journal Consortium* 3: 41–48.
- 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*'s occurrence in the Czech Republic. *Herpetological Review* 43: 75–78.
- Cohen M. M. (2001):** Frog Decline, Frog Malformations, and a Comparison of Frog and Human Health. *American Journal of Medical Genetics* 104: 101–109.
- Collins J. P. (2010):** Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 93–99.
- Collins J. P., Crump M. L. (2009):** Extinction in our Times. *Global Amphibian Decline*. Oxford University Press, Oxford.
- Corn P. S. (2005):** Climate change and amphibians. *Animal Biodiversity and Conservation* 28(1) : 59–67.
- Crawley M. J. (2007):** *The R Book*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Cunningham A. A., Beckmann K., Perkins M., Fitzpatrick L., Cromie R., Redbond J., et al. (2015):** Emerging disease in UK amphibians. *Veterinary Records* 176: 468.
- Cunningham A. A., Daszak P., Wood J. L. N. (2017):** One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philosophical Transaction Royal Society B* 372: 20160167.
- Dahanukar N., Krutha K., Paingankar M. S., Padhye A. D., Modak N., Molur S. (2013):** Endemic Asian Chytrid Strain Infection in Threatened and Endemic Anurans of the Northern Western Ghats, India. *PLoS ONE* 8(10): e77528.
- Daszak P., Berger L., Cunningham A. A., Hyatt A. D., Green D. E., Speare R. (1999):** Emerging infectious disease and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* 5(6): 735–748.
- Daszak P., Cunningham A., Hyatt A. (2000):** Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443–449.
- Daszak P., Cunningham A. A., Hyatt A. D. (2001):** Anthropogenic environmental change. *Acta Tropica* 103–116.

- Daszak P., Strieby A., Cunningham A. A., Longcore J. E., Brown C. C., Porter D. (2004):** Experimental evidence that the bulldog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal* 14: 201–207.
- Davidson E. W., Parris M., Collins J. P., Longcore J. E., Pessier A. P., Brunner J. (2003):** Pathogenicity and Transmission of Chytridiomycosis in Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia* 3: 601–607.
- DiGiacomo R. F., Koepsell T. D. (1986):** Sampling for detection of infection or disease in animal populations. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189: 22–23.
- Dodd C. K., Smith. L. L. (2003):** Habitat destruction and alteration: historical trends and future prospects for amphibians. In: Semlitsch R. D.: *Amphibian Conservation*. Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington: 94–112.
- Fellers G. M., Green D. E., Longcore J. E. (2001):** Oral chytridiomycosis in the Mountain Yellow-legged Frog. *Copeia* 4: 945–953.
- 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 Biological Review* 21: 2–9.
- Fisher M. C., Henk D. A., Briggs Ch. J., Brownstein J. S., Madoff L., McCraw S. L., Gurr S. J. (2012):** Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484(7393): 186–194.
- Fitzpatrick L., Pasmans F., Martel A., Cunningham A. (2016):** Epidemiological tracing of *Batrachochytrium salamandrivorans* infection in European private amphibian collections. EWDA Conference Proceeding 2016, p. 30.
- Fong J. J., Cheng T. L., Bataille A., Pessier A. P., Waldman B., Vredenburg V. T. (2015):** Early 1900s detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Korean amphibians. *PLoS ONE* 10: e0115656.
- Forzan M. J., Gunn H., Scott P. (2008):** Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment, and control. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39(3): 406–411.
- Frías-Alvarez P., Vredenburg V. T., Familiar-López M., Longcore J. E., González-Bernal E., Santos-Barrera G., Zambrano L., Perra-Olea G. (2008):** Chytridiomycosis Survey in Wild and Captive Mexican Amphibians. *EcoHealth Journal Consortium* 5(1): 18–26.
- Gál J. T., Szabó K., Vörös J. (2012):** Effect of *Batrachochytrium dendrobatidis* on an amphibian community in Bakony Mountains, Hungary. *Állattani Közlemények* 97: 47–59.
- Gascon C., Collins J. P., Moore R. D., Church D. R., McKay J. E., Mendelson J. R. III (2007):** Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group, Gland.

- Garland S., Baker A., Phillott A. D., Skerratt L. F. (2010):** BSA reduces inhibition in a TaqMan assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 113–116.
- Garmyn A., Van Rooij P., Pasmans F., Hellebuyck T., Van Den Broeck W., Haesebrouck F. Martel A. (2012):** Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE* 7(4): e35038.
- 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., Seglie D., Walker S., Cunningham A. A., Fisher M. C. (2006):** The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters* 2: 455–459.
- Garner T. W. J., Garcia G., Carroll B., Fisher M. C. (2009a):** Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* 83: 257–260.
- Garner T. W. J., Walker S., Bosch J., Leech S., Rowcliffe J. M., Cunningham A. A., Fischer M. C. (2009b):** Life history influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos* 118(5): 783–791.
- Goka K., Yokoyama J., Une Y., Kuroki T., Suzuki K., Nakahara M., Kobayashi A., Inaba S., Mizutani T., Hyatt A. D. (2009):** Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes, and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology* 18: 4757–4774.
- Gomez A., Giri B., Saha A., Mishra. R., Dasgupta S. C., Debnath A., Gomes A. (2007):** Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian Journal of Experimental Biology* 45:579–593.
- Gratwicke B., Evans M. J., Jenkins P. T., Kusriani M. D., Moore R. D., Sevin J., Wildt D. E. (2010):** Is the international frog legs trade a potential vector for deadly amphibian pathogens? *Frontiers in Ecology and the Environment* 8: 438–442.
- Gray M. J., Lewis J. P., Nanjappa P., Klocke B., Pasmans F., Martel A., et al. (2015):** *Batrachochytrium salamandrivorans*: The North American Response and a Call for Action. *PLoS Pathogens* 11 (12): e1005251.
- Gubbels R. E. M. B. (2009):** Vuursalamander *Salamandra salamandra*. *De amfibieën en reptielen van Nederland – Nederlandse fauna* 9: 87–95. In: Spitzen-van der Sluijs A., Spikman F., Bosman W., Zeeuw M., Meij T., Govers E., Kik M., Pasmans M., Martel A. (2013): Enigmatic decline drives *Salamandra salamandra* to the edge of extinction in The Netherlands. *Amphibia-Reptilia* 34 (2): 233–239.

- Haas D., Degafó G. (2005):** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 3:307–319.
- Harris R. N., James T. Y., Lauer A., Simon M. A., Patel A. (2006):** The amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth* 3: 53–56.
- Harris R. N., Brucker R. M., Walke J. B., Becker M. H., Woodhams D. C., Schwantes C. R., Flaherty D. C., Minbiole K. P. C. (2009):** Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *International Society for Microbial Ecology Journal* 3:818–824
- Havliková B., Baláž V., Vojar J. (2015):** First systematic monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in collections of captive amphibians in the Czech Republic. *Amphibia-Reptilia* 36: 27–35.
- Herrel A., van der Meijden A. (2014):** An analysis of the live reptile and amphibian trade in the USA compared to the global trade in endangered species. *Herpetological Journal* 24: 103–110.
- Hudson M. A., Young R. P., D’Urban Jackson J., Orozco-terWengel P., Martin L., James A., Sulton M., Garcia G., Griffiths R. A., Thomas R., Magin C., Bruford M. W., Cunningham A. A. (2016):** Dynamics and genetics of disease-driven species decline to near extinction: lessons for conservation. *Scientific Reports* (6): 30772.
- 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.
- James T. Y., Litvintseva A. P., Vilgalys R., Morgan J. A. T., Taylor J. W., Fisher M. C., Berger L., Weldon Ch., du Preez L., Longcore J. E. (2009):** Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Pathogens* 5(5): e1000458.
- Johnson M. L., Speare R. (2003):** Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases* 9: 922–925.
- Johnson M. L., Speare R. (2005):** Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 181–186.
- Keisecker J. M., Blaustein A. R., Belden L. K. (2001):** Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410: 681–684.
- Kilpatrick A. M., Briggs Ch. J., Daszak P. (2010):** The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology & Evolution* 25(2): 109–118.
- Kruger K. M., Hero J. M. (2008)** Altitudinal distribution of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in subtropical Australian frogs. *Australian Ecology* 33:1022–1032.

- Kolby J. E., Smith K. M., Berger L., Karesh W. B., Preston A., Pessier A. P., Skerratt L. F. (2014):** First evidence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and ranavirus in Hong Kong amphibian trade. *PLoS ONE* 9: e90750.
- Laking A. E., Ngo H. N., Pasmans F., Martel A., Nguyen T. T. (2017):** *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. *Scientific Reports* 7: 44443.
- Lips K. R., Brem F., Brenes R., Reeve J. D., Alford R. A., Voyles J., Carey C., Livo L., Pessier A. P., Collins J. P. (2006):** Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 3165–3170.
- Lips K. R., Diffendorfer J., Mendelson J. R., Sears M. W. (2008):** Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology* 6 (3): e72.
- 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.
- Lymberakis P., Poulakakis N. (2010):** Three continents claiming an archipelago: the evolution of Aegean's herpetofaunal diversity. *Diversity* 2: 233–255.
- Martel A., Van Rooij P., Vercauteren G., Baert K., Van Waeyenberghe L., Debacker P., Garner T. W. J., Woeltjes T., Ducatelle R., Haesebrouck F., Pasmans F. (2011):** Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology* 49: 143–149.
- 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.
- Martel A., Blooi M., Adriaensen C., Van Rooij P., Beukema W., Fisher M. C., et al. (2014):** Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* 346: 630–631.
- Mazzoni R., Cunningham A. A., Daszac P., Apolo A., Perdomo E., Speranza G. (2003):** Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infectious Diseases* 9: 995–998.
- 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. (2012):** 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 of the United States of the America* 110(1): 210–215.

- Mendelson J. R., Lips K. R., Gagliardo R. W., Rabb G. B et al. (2005):** Confronting amphibian declines and extinctions – Amphibian Conservation Summit Declaration. *Science Supporting Online Material* 1–10 (www.sciencemag.org/cgi/content/full/313/5783/48/DC1, verze ze 7. 1. 2008).
- Moravec J. (ed.), (1994):** Atlas rozšíření obojživelníků v České republice. Atlas of Czech Amphibians, Národní muzeum, (zoologické odd.), Praha, 136 p.
- Morgan J. A. T., Vredenberg V. T., Rachowicz L. J., Knapp R. A. et al. (2007):** Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America* 104: 13845–13850.
- Murray K. A., Skerratt L. F., Garland S., Kriticos D., McCallum H. (2013):** Whether the weather drives patterns of endemic amphibian chytridiomycosis: A pathogen proliferation approach. *PLoS ONE* 8: e61061.
- Mutchmann F. (2015):** Chytridiomycosis in amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine* 24: 276–282.
- Neang T. (2010):** An Investigation into Frog Consumption and Trade in Cambodia. Flora and Fauna International, Cambodia Programme, Phnom Penh, Cambodia.
- Nguyen T. T., Nguyen T. V., Ziegler T., Pasmans F., Martel A. (2017):** Trade in wild anurans vectors the urodelan pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* into Europe. *Amphibia-Reptilia* 38(4): 554–556.
- Nichols D. K., Pessier A. P., Longcore J. E. (1998):** Cutaneous chytridiomycosis: an emerging disease? *Proceedings of the Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians and the American Association of Wildlife Veterinarians* 1998: 269–271.
- Olson D. H., Aanensen D. M., Ronnenberg K. L., Powell C. I., Walker S. F., Bielby J., et al. (2013):** Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS ONE* 8: e56802.
- Ouellet M., Mikaelian I., Paul B. D., Rodrigue J., Green D. M. (2005):** Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conservation Biology* 19: 1431–1440.
- Peel A. J., Hartley M., Cunningham A. A. (2012):** Quantitative risk analysis of introducing *Batrachochytrium dendrobatidis* to the UK through the importation of live amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* 98: 95–112.
- Pessier A. P., Nichols D. K., Longcore J. E., Fuller M. S. (1999):** Cutaneous Chytridiomycosis in Poison Dart Frogs (*Dendrobates* spp.) and White's Tree Frogs (*Litoria Caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 194.
- Picco A. M., Collins J. P. (2008):** Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology* 22: 1582–1589.

- Piotrowski J. S., Annis S. L., Longcore J. E. (2004):** Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9–15.
- Pounds J. A. (2001):** Climate and amphibian declines. *Nature* 410: 639–640.
- R Development Core Team (2009):** *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rachowicz L. J., Vredenburg V. T. (2004):** Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms* 61: 75–83.
- Rachowicz L. J., Hero J. M., Alford R. A., Taylor J. W. Morgan J. A. T., Vredenburg V. T., Collins J., Briggs Ch. (2005):** The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging diseases of wildlife. *Conservation Biology* 19: 1441–1448.
- Rachowicz L. J., Knapp R. A., Morgan J. A. T., Stice M. J., Vredenburg V. T., Parker J. M., Briggs C. J. (2006):** Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology* 87: 1671–1683.
- Raphael B., Pramuk J. (2007):** Treatment of chytrid infection in *Typhlonectes* spp. using elevated water temperatures. *Proceedings of the IRCEB meeting*, Phoenix, Arizona, November 2007. Unpublished.
- Reshetnikov A., Chestnut T., Brunner J., Charles K., Nebergall E., Olson D. (2014):** Detection of the emerging amphibian pathogens *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus in Russia. *Diseases of Aquatic Organisms* 110(3): 235–240.
- Retallick P. W. R., McCallum H., Speare R. (2004):** Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLOS Biology* 2: 1965–1971.
- Richgels K. L. D., Russell R. E., Adams M. J., White C. L., Grant E. H. C. (2016):** Spatial variation in risk and consequence of *Batrachochytrium salamandrivorans* introduction in the USA. *Royal Society Open Science* 3: 150616.
- Rosenblum E. B., Stajich J. E., Maddox N., Eisen M. B. (2008):** Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America* 105: 17034–17039.
- Rosenblum E. B., James T. Y., Zamudio K. R., Poorten T. J., Ilut D., Rodriguez D., Eastman J. M., Richards-Hrdlicka K., Joneson S., Jenkinson T. S., Longcore J. E. et al. (2013):** Complex history of the amphibian killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America* 110: 9385–9390.
- Rowley J., Brown R., Bain R., Kusriani M., Inger R., Stuart B., Wogan G., Thy N., Chan-ard T., Trung C. T., Diesmos A., Iskandar D. T., Lau M., Ming L. T., Makchai S., Truong N. Q., Phimmachak S. (2010):** Impending conservation crisis for Southeast Asian amphibians. *Biology Letters* 6: 336–338.

- Rózsa, L., Reiczigel, J., Majoros, G. (2000):** Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology* 86: 228–232.
- Sabino-Pinto J., Bletz M., Hendrix R., Perl R. G. B., Martel A., Pasmans F., Lötters S., Mutschmann F., Schmidt B. R., Schmeller D. S., Veith M., Wagner N., Vences M. & Steinfartz S. (2015):** First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Germany. *Amphibia-Reptilia* 36(4): 411–416.
- Searle C. L., Belden L. K., Bancroft B. A., Han B. A., Biga L. M., Blaustein A. R. (2009):** Experimental examination of the effects of ultraviolet-B radiation in combination with other stressors in frog larvae. *Oecologia* 162: 237–245.
- Searle C. L., Gervasi S. S., Hua J., Hammond J. I., Relyea R. A., Olson D. H., Blaustein A. R. (2011):** Differential host susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an emerging amphibian pathogen. *Conservation Biology* 25: 965-974
- Simon T. A., Hoernig G., Sowell P., Halloy S., Seimon A. (2005):** Identification of chytridiomycosis in *Telmatobius marmoratus* at 4450 m in the Cordillera Vilcanota of Southern Peru. *Herpetological Monographs* 7: 273–281.
- Schloegel L. M., Daszak P., Cunningham A. A., Speare R., Hill B. (2010):** Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 101–108.
- Sillero N., Campos J., Bonardi A., Corti C, Creemers R., Crochet P. A., Crnobrnja-Isailovic J., Denoël M., Ficetola G. F., Gonçalves J., Kuzmin S., Lymberakis P., de Pous P., Rodríguez A., Sindaco R., Speybroeck J., Toxopeus B., Vieites D. R., Vences M. (2014):** Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia*, 35: 1–31.
- 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 Journal Consortium* 4: 125–134.
- Skerratt L. F., McDonald K. R., Hines H. B., Berger L., Mendez D., Phillott A., Cashins S. D., Murray K. A., Speare R. (2010):** Validation of the mapping protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* in Queensland, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 117e129.
- Soto-Azat C., Clarke B. T., Fisher M. C., Walker S. F., Cunningham A. A. (2009):** Non-invasive sampling methods for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in archived amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* 84: 163–166.
- Spitzen-van der Sluijs A., Zollinger R., Bosman W., Pasmans F., Martel A., Van Rooij P., Clare F. (2010):** Short report: *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians in the Netherlands and Flanders (Belgium). Nijmegen. Stichting Ravon. [<http://hdl.handle.net/1854/LU-994789>].

- Spitzen-van der Sluijs A., Spikman F., Bosman W., Zeeuw M., Meij T., Goverse E., Kik M., Pasmans F., Martel A. (2013):** Enigmatic decline drives *Salamandra salamandra* to the edge of extinction in The Netherlands. *Amphibia-Reptilia* 34(2): 233–239.
- Spitzen-van der Sluijs A., Martel A., Asselberghs J., Bales E. K., Beukema W., Bletz M. C., Dalbeck L., Goverse E., Kerres A., Kinet T., Kirst K., Laudelout A., Marin da Fonte L. F., Nöllert A., Ohlhoff D., Sabino-Pinto J., Schmidt B. R., Speybroeck J., Spikmans F., Steinfartz S., Veith M., Vences M., Wagner N., Pasmans F. & Lötters S. (2016):** Expanding Distribution of Lethal Amphibian Fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 22(7): 1286–1288.
- Stagni G., Dall’Olio R., Fusini U., Mazzotti S., Scoccianti C., Serra A. (2004):** Declining populations of Apennine yellow bellied toad *Bombina pachypus* in northern Apennines (Italy): Is *Batrachochytrium dendrobatidis* the main cause? *Italian Journal of Zoology* 71(2): 5–13.
- Stegen G., Pasmans F., Schmidt B. R., Rouffaer L. O., Van Praet S., Schaub M., Canessa S., Laudelout A., Kinet T., Adriaensen C., Haesebrouck F., Bert W., Bossuyt F., Martel A. (2017):** Drivers of *Batrachochytrium salamandrivorans* mediated salamander extirpation. *Nature* 544: 353–354.
- Stuart S. N., Chanson J. S., Cox N. A., Young B. E., Rodrigues A. S. L., Fischman D. L., Waller R. W. (2004):** Status and trends of amphibian declines and extinction worldwide. *Science* 306: 1783.
- Sura P., Janulis E., Profus P. (2010):** Chytridiomikoza – śmiertelne zagrożenie dla płazów (Chytridiomycosis – a mortal danger for amphibians). *Chrońmy Przyrodę Ojczyzny* 66: 406–421.
- Swei A., Rowley J. J. L., Rödder D., Diesmos M. L. L., Diesmos A. C. et al. (2011):** Is chytridiomycosis an emerging infectious disease in Asia? *PLoS Biology* 6: e23179.
- 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.
- Šandera M., John V., Jeřábková L., Zicha O. (2010):** Mapování výskytu obojživelníků a plazů v ČR na BioLibu v roce 2009. *Herpetologické informace* 9(1): 33–55.
- Šćepanović L., Đoković T., Milošević B., Bjelica N., Božović A., Đukanović G., Damjanović S., Novaković V., Tadić I., Bulatović I., Bataković M., Vukčević M., Pulević M. (2010):** *Reporter životne sredine*, Podgorica, Montenegro: Agencija za zaštitu životne sredine Crne Gore.
- Teixeira R. D., Periera Mello S. C. R., Lima dos Santos C. A. M. (2001):** The world market for frog legs. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. *Globefish Research Programme* 86: 44.
- Van Rooij P., Martel A., Haesenbrouck F., Pasmans F. (2015):** Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research* 46: 137.

- Van Rooij P., Pasmans F., Coen Y., Martel A. (2017):** Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. *PLoS ONE* 12(10): e0186269.
- Vojar J., Solský M., Doležalová J., Šálek M., Kopecký O. (2008):** Factors influencing occupancy of breeding ponds in the agile frog (*Rana dalmatina*): A conservation perspective. In: P. Kočárek, V. Plášek, K. Malachová (Eds) *Environmental Changes and Biological Assessment IV*, April 10–11, 2008 (pp. 52–53). University of Ostrava, Faculty of Science.
- Vojar J., Havlíková B., Solský M., Jablonski D., Ikovič V., Baláž V. (2017):** Distribution, prevalence and amphibian hosts of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Balkans. *Salamandra* 53(1): 44–49.
- Vörös J., Jelić D. (2011):** First steps to survey chytrid fungus in Croatia. *Hyla* 31–34.
- Vörös J., Bosch J., Dán Á., Hartel T. (2013):** First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* on amphibians in Romania. *North-western Journal of Zoology* 9(2): 446–449.
- 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.
- Walker S. F., Salas M. B., Jenkins D., Garner T. W. J., Cunningham A. A., Hyatt A. D., Bosch J., Fisher M. C. (2007):** Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. *Diseases of Aquatic Organisms* 77: 105–112.
- Walker S. F., Bosch J. et al. (2008):** Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Current Biology* 18: R853–R854.
- Weldon C., du Preez L. H., Hyatt A. D., Muller R., Speare R. (2004):** Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10(12): 2100–2105.
- Weldon C., De Villiers A. L., Du Preez L. H. (2007):** Quantification of the trade in *Xenopus laevis* from South Africa, with implications for biodiversity conservation. *African Journal of Herpetology* 56: 77–83.
- Wellington R., Haering R. (2008):** Hygienic protocol for the control of disease in frogs. *Information Circular Number 6*. Department of Environment and Climate Change (NSW) Sydney South, Australia.
- Whiles M. R., Lips K. R., Pringle C. M., Kilham S. S., Bixby R. J., Brenes R., Connelly S., Colon-Gaud J. Ch., Hunte-Brown M., Huryn A. D., Montgomery Ch., Peterson S. (2006):** The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4: 27–34.
- Williams E. S., Yuill T., Artois M., Fischer J., Haigh S. A. (2002):** Emerging infectious diseases in wildlife. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*. 21(1): 139–157.

- 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., Alford R. A., Marantelli G. (2003):** Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 65–67.
- Woodhams D. C., Rollins-Smith L. A., Carey C., Reinert L., Tyler M. J., Alford R. A. (2006):** Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. *Oecologia* 146: 531–540.
- Woodhams D. C., Ardipradja K., Alford R. A., Harris R., Marantelli G., Reinert L., Rollins-Smith L. A. (2007a):** Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation* 10: 409–417.
- Woodhams D. C., Hyatt A. D., Boyle D. G., Rollins-Smith L. A. (2007b):** The Northern Leopard Frog *Rana pipiens* is a widespread reservoir species harboring *Batrachochytrium dendrobatidis* in North America. *Herpetological Review* 39: 66–68.
- Woodhams D. C., Bosch J., Briggs Ch. J., Cashins S., Davis L. R., Lauer A., Muths E., Puschendorf R., Schmidt B. R., Sheafor B., Voyles J. (2011):** Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in Zoology* 8: 8.
- Woodhams D. C., Bigler L., Marschang R (2012):** Tolerance of fungal infection in European water frogs exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis* after experimental reduction of innate immune defenses. *BMC Veterinary Research* 8(1): 197.
- Yap T. A., Koo M. S., Ambrose R. F., Wake D. B., Vredenburg V. T. (2015):** Averting a North American biodiversity crisis: A newly described pathogen poses a major threat to salamanders via trade. *Science* 349(6247): 481–482.
- Young B. E., Stuart S. N., Chanson J. S., Cox N. A., Boucher T. M. (2004):** Disappearing Jewels: The Status of New World Amphibians, *NatureServe*, Arlington, Virginia, USA.
- Young S., Berger L., Spare R. (2007):** Amphibian chytridiomycosis: strategies for captive management and conservation. *International Zoo Yearbook* 41: 1–11.

Ostatní zdroje

Amphibian Conservation Summit (2005): 17–19 September 2005, Washington DC, [http://irceb.asu.edu/amphibians/pdf/ACAP%20Summit%20Declaration.pdf].

AmphibiaWeb (2018): Information on Amphibian Biology and Conservation. Berkeley, California, Copyright © 2000–2018, [http://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html].

Balcanica.info – obojživelníci a plazi Balkánu. [http://cs.balcanica.info/], © 2006–2012, ISSN 1802-3258.

Bd Maps – Global Bd-Mapping Project [www.bd-maps.net], © 2018.

Biolib.cz – Biological library [www.biolib.cz], © 1999-2018.

Council of Europe (2015): Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats, 35th meeting; 2015 Dec 1–4; Strasbourg, France. Recommendation No. 176

(2015) on the prevention and control of the *Batrachochytrium salamandrivorans* chytrid fungus, [https://wcd.coe.int/com.instranet.InstraServlet?command=com.instranet.CmdBlobGet&].

Department of the Environment and Heritage (2006): Threat abatement plan, Infection of amphibians with chytrid fungus resulting in chytridiomycosis, Commonwealth of Australia, [http://www.environment.gov.au/biodiversity/threatened/publications/tap/chytrid/index.html].

EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), More S. et al. (2017): Scientific Opinion on the assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*). EFSA Journal 2017 15 (11): 5071, 34 p. [https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5071].

Environment and Climate Change Canada (2017): Import restriction on salamanders, [http://ec.gc.ca/cites/default.asp?lang=En&n=0FC40F59-1].

OIE (World Organisation for Animal Health), (2009): Aquatic Animal Health Code, charter 2.4.1., [http://www.oie.int/eng/normes/fcode/a_summry.html].

OIE (World Organisation for Animal Health), (2017): Aquatic Animal Health Code, chapter 1.3, article 1.3.4., [http://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre_diseases_listed.htm].

IUCN (International Union for Conservation of Nature) Red List of Threatened Species 2008, [http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis].

IUCN (2016): Red List of Threatened Species. [http://www.iucnredlist.org].

U. S. Fish and Wildlife Service (2016): Injurious wildlife species; listing salamanders due to risk of salamander chytrid fungus. Federal Register 81: 1534–1556, [https://www.fws.gov/injuriouswildlife/pdf_files/List-of-Salamander-Species.pdf].

Státní veterinární správa © 2016–2017: SVS bude z důvodů prevence smrtelného onemocnění kontrolovat všechny zásilky čolků a mloků ze třetích zemí. Tisková zpráva z 1. 9. 2016,

[<https://www.svs-cr.cz/svs-bude-z-duvodu-prevence-smrtelneho-onemocneni-kontrolovat-vsechny-zasilky-colku-a-mloku-ze-tretich-zemi/>].

First systematic monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in collections of captive amphibians in the Czech Republic

Barbora Havlíková¹, Vojtech Baláz^{2,3}, Jiří Vojar^{1,*}

Abstract. The popularity of amphibians as pets in the Czech Republic is growing. Private keepers breed mainly exotic species that are available at popular exotic animal fairs and in pet shops. This growing demand for amphibians also brings increasing risk of disease transmission. In our study, we focused on two objectives: detecting the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) in captive amphibians across the Czech Republic and summarizing the results of itraconazole treatments. We performed a systematic survey, focusing on public institutions, the pet trade and private breeders. Of 610 amphibians tested, we recorded 5.1% to be infected with *Bd*. The fungus was present mainly as a mild asymptomatic infection, but we also found cases of acute disease, including mortalities. Amphibian breeders, zookeepers and pet sellers should regularly test their animals for the presence of *Bd* and other pathogens, because captive amphibians can serve as their reservoirs. When *Bd* infection is present in a captive amphibian, treatment should be appropriate to the infection's intensity. The trade-off between the risk of disease and the risk of antifungal treatment varies greatly among species, and even itraconazole's use can cause fatal health complications.

Keywords: amphibian trade, antifungal treatment, captive-bred amphibians, chytridiomycosis, infectious disease, itraconazole.

Introduction

Amphibian chytridiomycosis, a cutaneous disease caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Berger et al., 1998; Longcore, Pessier and Nichols, 1999), is one of the factors of a global amphibian crisis. Its impact is seen in sudden decline in some populations (Stuart et al., 2004) and even extinction of entire species (Mendelson et al., 2006; Rachowicz et al., 2006). Chytridiomycosis ranks as the worst infectious disease ever recorded among vertebrates with respect to the number of infected species (Amphibian Conservation Summit, 2005). Because of the great impact on populations in the wild, the World Organiza-

tion for Animal Health (OIE) in 2008 added *Bd* to its list of internationally notifiable infectious diseases (OIE, 2009). OIE member countries should monitor *Bd* and report data as to the pathogen's occurrence (Schloegel et al., 2010).

Batrachochytrium dendrobatidis is highly transmissible (Peel, Hartley and Cunningham, 2012), has low host specificity (Olson et al., 2013), and can live and survive without a host in water or a moist environment (Johnson and Speare, 2003). Infection by *Bd* often occurs in the absence of clinical signs (Daszak et al., 2004; Young, Berger and Speare, 2007). Global distribution of the pathogen has, in part, been facilitated by human activities (Peel, Hartley and Cunningham, 2012), including international trade in amphibians used for food, bait, zoo-stocking, research and pet-keeping purposes (Mazzoni et al., 2003; Weldon et al., 2004; Garner et al., 2006). The prevalence of chytridiomycosis in the international amphibian trade is relatively high (Schloegel et al., 2009; Spitzen-van der Sluijs et al., 2011), and thus pet animals can serve as *Bd* reservoirs and *Bd* vectors (Fisher and Garner, 2007; Tamukai et al., 2014).

1 - Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Prague 6, 165 21, Czech Republic

2 - Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, Brno, 612 42, Czech Republic

3 - Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, Brno, 612 42, Czech Republic

*Corresponding author; e-mail: vojar@fzp.czu.cz

The Czech Republic is an important player in the European amphibian trade of both imported and captive-bred amphibians. A great many amphibians entering the amphibian trade are still taken from the wild (Schloegel et al., 2010). According to the annual reports of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES), most of those amphibians imported to the Czech Republic originate in the US and Central and South America, which are regions with high incidence of *Bd* (Lips et al., 2005; Ouellet et al., 2005). On the other hand, captive breeding may help directly to reduce the impact of over-collection in wild populations. The captive populations could even form a backup option for disease-depleted wild populations, and reintroduction of offspring raised in captivity is viewed as a last-chance option to re-establish new self-sustaining wild populations (Frías-Alvarez et al., 2008; Woodhams et al., 2011).

Although many zoological institutions are currently involved in captive breeding of amphibians for species reintroduction programs (Schloegel et al., 2010), specific quarantine procedures (Pessier, 2008) and diagnostic testing for *Bd* detection are not standard practice at most zoos (Peel, Hartley and Cunningham, 2012). The number of threatened amphibians in captive breeding programs is increasing, and research estimates indicate that this number ultimately will include hundreds of species (Young et al., 2004). Therefore, private breeders play a crucial role as an irreplaceable source of expertise in captive breeding of very rare species (Garner et al., 2009a). Intentional selection of disease-tolerant lineages in captivity has potential to increase the chances of species survival in the presence of this pathogen (Venesky et al., 2012).

As there is believed to be a linkage between *Bd*'s presence in captive and wild amphibians, it is necessary to investigate amphibians from the perspectives of wild population conservation as well as biosecurity of captive populations. Recent studies have confirmed *Bd* to occur in wild

species throughout the Czech Republic (Civiš et al., 2012; Baláž et al., 2014). As the Czech Republic is an important amphibian pet-trade transit and breeding country, there has been an urgent need to begin monitoring the presence of *Bd* in captive-bred amphibians. This paper provides the first report regarding the presence of *Bd*, cases of chytridiomycosis, and results of antifungal treatment in captive amphibians within the Czech Republic.

Materials and methods

Data collection

Between June 2012 and February 2014, 665 samples were collected and analysed. Twenty-one collections of captive amphibians were examined, with monitoring at state institutions (8 zoos, 1 herpetological station), within the pet trade (3 pet shops, 1 pet fair vendor), and in private collections (8 private breeders) (table 1). Overall, this research encompassed 610 animals. In addition, some *Bd*-positive animals were retested after treatment (so there were 665 samples in total).

Sampling was performed by a non-destructive method of skin swabbing using the sterile Dryswab[®] (MW100, Medical Wire & Equipment Co, UK). Animals were handled in a manner to minimize their stress, and a new pair of disposable powder-free latex gloves was used for each specimen to prevent disease transmission between animals (Forzan, Gunn and Scott, 2008). A prescribed hygiene safety protocol (Wellington and Haering, 2008) was followed. Three to five individuals of the same species were sampled from each tank following a well-regarded methodology (Hyatt et al., 2007). Each sampled individual was photographed for later identification of positive individuals within sampled groups. Samples were stored in original packing in a refrigerator at 4°C.

Another *Bd* testing method involves environmental detection in samples from water (Walker et al., 2007) within which amphibians were present. Water samples were collected at the four types of breeding facilities (zoo, herpetological station, private breeder and pet shop). Altogether 38 water samples were collected through the course of the study. A sample consisting of 500 ml of water was pumped from each tested tank into plastic bottles, and these samples were frozen until sample processing.

Analysis of samples

DNA was isolated from swabs using PrepMan Ultra, and *Bd* detection was performed by real-time quantitative PCR (Boyle et al., 2004) with the addition of bovine serum albumin (BSA) to limit PCR inhibition (Garland et al., 2010). This method is highly sensitive (capable to capture infection of individual cells), specific (the primers used are

Table 1. Comparison of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) occurrence among breeding facilities.

Type of breeding facilities (total/ <i>Bd</i> +))	Number of species (total/ <i>Bd</i> +))	Number of samples	<i>Bd</i> positive	Individual infection incidence
Zoo (8/2)	50/3	89	5	5.6%
Herpetological station (1/1)	26/2	19	2	10.5%
Private collection (8/2)	69/3	97	3	3.1%
Pet trade (4/0)	13/0	20	0	0%
Total	117/8	225	10	4.4%

designed for *Bd* and have been tested against a number of other related fungi), and allows quantification of the target DNA present in the sample (Hyatt et al., 2007). Results from the assay are presented as the genomic equivalent value of one zoospore (GE). DNA quantification standards with concentration of 0.1, 1, 10 and 100 GE made of the *Bd* GPL lineage were provided by the Zoological Society of London.

Water samples were filtered using 0.45 μ m water filters. The DNA was extracted from the filter-disc using a Power-Water DNA Isolation Kit (Walker et al., 2007). Detection of *Bd* DNA in these samples was performed by standard PCR method using primers specific to *Bd* (Annis et al., 2004) in the Laboratory of Molecular Genetics at the Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague.

Treatment of infected individuals

In cases of positive results, we recommended proper quarantine measures and treatment and, when possible, elevation of housing temperature. The use of itraconazole baths for terrestrial and arboreal species or direct addition of itraconazole into aquaria for completely aquatic species was recommended as the most efficient way to clear the infection. Treatment was performed by the owners using baths in sodium itraconazole (Sporanox™, Janssen-Cilag, 2340 Beerse, Belgium) according to an acknowledged methodology: for adult amphibians a 0.01% solution of Sporanox was used (Forzan, Gunn and Scott, 2008) and for tadpoles and early metamorphosed individuals a 0.0025% solution of Sporanox was used (Brannelly, Richards-Zawackil and Pessier, 2012).

Statistical analysis

The proportions of *Bd*-positive versus *Bd*-negative samples among types of breeding facilities (zoo, herpetological station, private breeder, pet trade) and among the surveyed species were compared by generalized linear models (GLM) using R statistical software, version 2.10.1 (R Development Core Team, 2009). Within GLM, we used a log-linear model with a Poisson distribution of the response variable (i.e., frequencies of *Bd*-positive and *Bd*-negative samples). Due to co-housing of individuals, amphibians held together could not be considered as independent measurements (due to pseudo-replications, Crawley, 2007). Therefore, we used the tank instead of the individual as the unit for analyses. We followed the same procedure in comparing *Bd* presence and absence among the 8 zoos. We used chi-squared deletion tests (Crawley, 2007) to test the significance of each explanatory variable in the model.

Results

Summary of *Bd* presence

Occurrence of *Bd* was confirmed in captive-bred amphibians within the Czech Republic. *Bd* was detected at 2 zoos, 1 herpetological station and 2 private breeders (table 1), often in rare and expensive species. Of the 117 sampled amphibian species, 8 (6.8%) were *Bd* positive and 109 (93.2%) were *Bd* negative. Among 416 anuran samples, we found 34 (8.2%) samples to be positive. In caudate samples, only 1 sample was *Bd* positive out of the 198 sampled animals (table 2). The fungus was present mainly at low intensity causing asymptomatic infection, but some cases of acute disease, including mortalities, were recorded. GE values ranged from 0.4 to 9230 GE (table 3).

Although positive results for water samples were obtained for 11 tanks, additional swab samples from animals in those same tanks were found to be *Bd* negative. Species housed in the tested tanks included *Pleurodeles waltl*, *Silurana amieti*, *Silurana tropicalis*, *Theleiderma stellatum* and *Xenopus laevis*.

Comparison of breeding facilities by *Bd* presence

The number of *Bd*-negative samples significantly exceeded that of *Bd*-positive samples ($df = 1$, $P < 10^{-6}$) across all examined breeding facilities (zoo, herpetological station, private breeder, pet trade). The proportions of sampled tanks with *Bd*-negative and *Bd*-positive results were similar among breeding facilities ($df = 3$, $P = 0.29$, table 1). Among the 8 zoos examined, *Bd* was found in 2 zoos, and

Table 2. Amphibian taxonomic groups from collections of captive animals examined for presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*).

Order	Family	Number of animals sampled/number of animals <i>Bd</i> positive	<i>Bd</i> -positive species
Anura	Alytidae	6/0	
	Arthroleptidae	1/0	
	Bombinatoridae	20/1	<i>Bombina scabra</i>
	Bufoidea	25/0	
	Ceratophryidae	6/0	
	Dendrobatidae	150/2	<i>Dendrobates azureus</i>
	Eleutherodactylidae	5/0	
	Hylidae	43/2	<i>Osteopilus septentrionalis</i>
	Hyperoliidae	12/0	
	Mantellidae	2/0	
	Microhylidae	35/0	
	Pipidae	61/16	<i>Silurana amieti</i> <i>Silurana</i> sp.
	Pyxicephalidae	1/0	
	Ranidae	5/0	
Rhacophoridae	40/9	<i>Theلودerma bicolor</i> <i>Theلودerma stellatum</i>	
Caudata	Ambystomatidae	13/0	
	Hynobiidae	1/0	
	Salamandridae	184/1	<i>Neurergus kaiserii</i>
Total		610/31	8

then in a small number of samples (10). We found no differences in the proportions of sampled tanks with uninfected and infected animals among zoos ($df = 7$, $P = 0.64$).

Taxonomic comparison according to Bd presence

The proportion of *Bd*-positive samples differed among taxa ($df = 7$, $P = 0.002$) (fig. 1). The highest proportion of infection was found in *Silurana* spp. (fig. 1) within just 1 collection with *Silurana* sp. (undetermined species imported from Ghana) and *Silurana amieti*. Sixteen out of 23 animals (69.6%) were *Bd* positive. None of these infected animals showed any typical symptoms of chytridiomycosis. Their GE values ranged from 2.8 to 188.3. Two of 150 (1.3%) frogs belonging to the family Dendrobatidae were *Bd* positive (table 2). In these frogs, acute chytridiomycosis with typical symptoms was recorded and both frogs died during treatment. Post-mortem samples showed these animals to have the highest GE values

measured in the entire dataset (331.3 and 9230 GE). Nine of 40 (22.5%) frogs belonging to the family Rhacophoridae were infected with *Bd* (table 2). In just two of these cases mild symptomatic changes were found on the animals' skins. In the Pipidae family, 16 of 61 (26.2%) animals were *Bd* positive (table 2).

Treatment of infected individuals

Frogs belonging to the family Rhacophoridae showed partial or complete susceptibility to itraconazole treatment. While most of the threatened frogs survived and were cured (*Bd*-negative after treatment), six metamorphs of *Theلودerma stellatum* died within 1 month after treatment and 5 treated tadpoles developed malformation of oral discs. In another case, *Theلودerma bicolor* frogs were observed to be extremely sensitive to the antifungal treatment. Although only 1 of 6 was *Bd* positive and with a very low GE value (3.3), the owner decided to treat all of them as a preventive measure. The first bath, however, resulted in loss of sight in all

Table 3. Overview of individuals positive for *Batrachochytrium dendrobatidis* according to genomic equivalent (GE) values and origin.

Species	GE value	Origin
<i>Dendrobates azureus</i>	9230	pet fair
<i>Dendrobates azureus</i>	331.3	pet fair
<i>Silurana amieti</i>	188.3	private breeder
<i>Silurana amieti</i>	152	private breeder
<i>Theioderma stellatum</i>	126.5	private breeder
<i>Silurana amieti</i>	120.3	private breeder
<i>Theioderma stellatum</i>	77.4	private breeder
<i>Silurana amieti</i>	59.3	private breeder
<i>Theioderma stellatum</i>	52.9	private breeder
<i>Silurana amieti</i>	36.9	private breeder
<i>Silurana amieti</i>	31.5	private breeder
<i>Silurana amieti</i>	30.2	private breeder
<i>Theioderma stellatum</i>	30.1	private breeder
<i>Silurana amieti</i>	28.4	private breeder
<i>Silurana amieti</i>	27.9	private breeder
<i>Silurana</i> sp.	21.9	import Ghana
<i>Theioderma stellatum</i>	17.2	import Latvia
<i>Silurana</i> sp.	7.7	import Ghana
<i>Osteopilus septentrionalis</i>	7.5	import Cuba
<i>Neurergus kaiserii</i>	6.3	private breeder
<i>Theioderma stellatum</i>	5.6	private breeder
<i>Osteopilus septentrionalis</i>	5.3	import Cuba
<i>Silurana</i> sp.	4.4	import Ghana
<i>Silurana</i> sp.	4.3	import Ghana
<i>Theioderma stellatum</i>	3.9	private breeder
<i>Theioderma bicolor</i>	3.3	private breeder
<i>Silurana</i> sp.	2.8	import Ghana
<i>Silurana</i> sp.	2.8	import Ghana
<i>Bombina scabra</i>	0.61	wild captured
<i>Theioderma stellatum</i>	0.4	import Latvia

6 individuals and they subsequently died due to their inability to gather food.

Discussion

Summary of *Bd* presence

In this study, we confirmed *Bd* infections in captive amphibians in the Czech Republic. The overall occurrence of *Bd* (5.1%) was lower than that in wild amphibians within the country (19%) (Baláž et al., 2014) and slightly higher in comparison with the findings from a similar study performed in other European countries, including Belgium, the Netherlands, Germany and France (2.9%) (Spitzen-van der Sluijs et al., 2011).

Comparison of breeding facilities by *Bd* presence

We detected comparable incidence of *Bd*-positive amphibians (6.5%) in institutions (8 zoos and 1 herpetological station) in comparison with a similar study in Japan (5.9%) (Goka et al., 2009). We detected no *Bd*-positive samples in pet shops, whereas that prevalence in Japanese pet shops reached 28% (Goka et al., 2009). The observed absence of *Bd* in Czech pet shops and pet fairs may be biased by the limited number of samples (just 4 pet shops and 23 samples plus 1 pet fair seller and 28 samples). Unfortunately, we have met with great reluctance among commercial pet shops and pet fairs to cooperate by providing samples. Nevertheless, one pet fair seller did confess to suspecting some disease to exist within his stock. For many commercial sellers, the prospect of money from the sale of rare species is often stronger than the need to prevent the spread of infectious diseases. This shows that cooperation with the trade is not as simple in the Czech Republic as has been reported from Britain (Wombwell, pers. comm.; Garner et al., 2009a). Although we recorded no positive samples in the pet trade, more than half of the *Bd*-positive animals recorded came from private breeders, who had recently purchased animals in pet shops and at a pet fair. The reluctance of sellers to cooperate might in some cases be overcome by utilizing methods requiring less effort in sampling (e.g., water sampling).

Water samples

Using water samples for *Bd* detection yielded contradictory results. The failure of swab samples processed by qPCR to detect *Bd* among animals in tanks which appeared positive based on water samples was unexpected. Although swabbing is regarded as very sensitive, and capable of detecting *Bd* present in even very low infection intensities (Hyatt et al., 2007), in some cases the quality of a sample is reduced by the structure of the skin (e.g. during the terrestrial phase of toads; Garner, pers. comm.), by

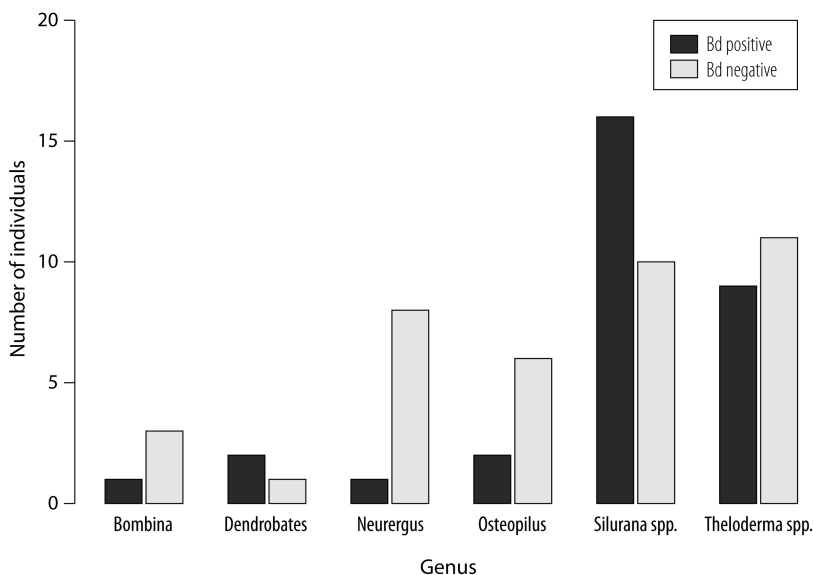


Figure 1. Comparison of particular amphibian taxa found positive and negative for *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*).

environmental inhibition of PCR (Hyatt et al., 2007), or possibly by the random chance of not swabbing an exact spot bearing fungal growth. As not all animals within a given tank were swabbed, some part of the inconsistency could be explained by the random chance of collecting samples from the uninfected individuals. Both primer sets were tested against a set of various fungi (Annis et al., 2004), and therefore the positivity should not be a result of unspecific primer alignment. One might ask if the primers used were picking up the presence of *Bd*'s closest relative, *B. salamandrivorans* (Martel et al., 2013), which is not detected by the qPCR (Boyle et al., 2004). We have proven this cannot be the case by testing the *Bs* standards provided by Ann Martel in the standard PCR (Annis et al., 2004) and obtaining a negative result. As there is always a risk of contamination, of course, we do not consider our results as unequivocal.

Treatment of infected individuals

Because chytridiomycosis is not always accompanied by clinical symptoms (Daszak et al., 2004; Young, Berger and Speare, 2007), it is difficult to recognize the disease without testing. In

our study, we recorded only 4 animals out of 31 *Bd*-positive samples (12.9%) showing changes on the skin and changes in behaviour that are typical clinical symptoms for *Bd* (Berger et al., 1998; Pessier et al., 1999; Boyle et al., 2004). In case of *Bd*-positive animals, we recommended treatment according to the biological properties of specific species and according to GE value. It is known that itraconazole can be fatal to larvae and metamorphs, while adults can be affected sporadically (Pessier and Mendelson, 2010) and depigmentation has been observed in tadpoles of *Alytes muletensis* (Garner et al., 2009b). The results from treatment using itraconazole observed in our study constitute a warning against preventive use of itraconazole in cases when the infection is not in acute phase and other, less-invasive methods (e.g., heat therapy; Woodhams, Alford and Marantelli, 2003) can be applied (Brannelly, Richards-Zawackil and Pessier, 2012).

Pathogens in the amphibian trade

Emerging diseases have gained prominence in wildlife conservation over the past decade. Although this is especially true for *Bd*, other

diseases may constitute threats which are just as important. The recently described chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*, highly pathogenic to caudates, causes declines in *Salamandra salamandra* populations in Western Europe and has the potential to cause serious biodiversity loss if it spreads across Europe (Martel et al., 2013, 2014). Ranavirus is another broadly distributed, highly virulent pathogen with diverse amphibian hosts causing mass mortalities and collapse of amphibian populations (Price et al., 2014). In the case of *Bd*, the amphibian trade contributes to the spread of genotypes of greater virulence (Farrell et al., 2011) or supports emergence of new strains due to lineage hybridization (McKenzie and Peterson, 2012). In all these emerging pathogens, the traded amphibians are of great importance in long-distance transmission. To minimize the risk of introducing pathogens from captive to wild animals, it is crucial to set up a system and facilities to provide a fast loop from sampling to pathogen detection and to reporting results. Furthermore, well-performed surveillance of pathogens in the amphibian trade enables assessment of disease status within wild populations, as has been demonstrated in Madagascar and Hong Kong (Kolby, 2014; Kolby et al., 2014).

In some cases, captive breeding programs provide the last chance to conserve and prevent the extinction of endangered species (Stuart et al., 2004; Mendelson et al., 2006). The captive populations are limited in size, however, and thus they are very sensitive to any random negative events, including pathogens or inappropriate treatments used against them.

Amphibian breeders, zookeepers, pet shop operators and pet fair sellers should regularly test their animals for the presence of *Bd* and quarantine newly acquired animals (Bovero et al., 2008; Kriger and Hero, 2009). Quarantine of captive amphibians is intended not only to control possible pathogens from spilling over into the environment, but, especially in cases of rare species, it should act against the op-

posite direction of pathogen transmission. *Bd* and other pathogens are widespread in the wild, and therefore it is important to account for the risk of infection being introduced from outside. Collection of live food (e.g., plankton) from unchecked water bodies may pose a risk to the captive amphibians.

Traders and breeders bear great responsibility, and they should attempt to limit risks by using best-practice protocols. Without adequate quarantine, surveillance, and parasite control programs, however, the trade in amphibians will result in further outbreaks of diseases among captive and wild amphibians.

Acknowledgements. This study was supported by Research Projects of the Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences in Prague, Nos. 20134261 and 20124233. We thank Trenton Garner from the Zoological Society of London for providing the quantification standards (0.1, 1, 10 and 100 GE) and An Martel from Ghent University for providing the *B. salamandrivorans* positive controls. We also thank all those zookeepers, institutions, amphibian private breeders and pet shop sellers who cooperated voluntarily and provided amphibians for sampling.

References

- Amphibian Conservation Summit (2005): Declaration from summit held in Washington DC during 17-19 September 2005. <http://irceb.asu.edu/amphibians/pdf/ACAP%20Summit%20Declaration.pdf>.
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P., Longcore, J.E. (2004): A DNA based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *J. Wildl. Dis.* **40**: 420-428.
- Baláz, V., Vörös, J., Civiš, P., Vojar, J., Hettyey, A., Sós, A., Dankovics, R., Jehle, R., Christiansen, D.G., Clare, F., Fisher, M.C., Garner, T.W.J., Bielby, J. (2014): Assessing risk and guidance on monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through identification of taxonomic selectivity of infection. *Conserv. Biol.* **28**: 213-223.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9031-9036.

- Bovero, S., Sotgiu, G., Angelini, C., Doglio, S., Gazzaniga, E., Cunningham, A.A., Garner, T.W.J. (2008): Detection of chytridiomycosis caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the endangered Sardinian newt (*Euproctus platycephalus*) in southern Sardinia, Italy. *J. Wildl. Dis.* **44**: 712-715.
- Boyle, D.G., Boyle, B.D., Olsen, V., Morgan, J.A., Hyatt, A.D. (2004): Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Org.* **60**: 141-148.
- Brannelly, L.A., Richards-Zawackil, C.L., Pessier, A.P. (2012): Clinical trials with itraconazole as a treatment for chytrid fungal infections in amphibians. *Dis. Aquat. Org.* **101**: 95-104.
- Catenazzi, A., Vredenburg, V.T., Lehr, E. (2010): *Batrachochytrium dendrobatidis* in the live frog trade of *Telmatobius* (Anura: Ceratophryidae) in the tropical Andes. *Dis. Aquat. Org.* **92**: 187-191.
- Civiš, P., Vojar, J., Literák, I., Baláz, V. (2012): Current state of *Bd*'s occurrence in the Czech Republic. *Herpetol. Rev.* **43**: 75-78.
- Crawley, M.J. (2007): *The R Book*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Daszak, P., Striemy, A., Cunningham, A.A., Longcore, J.E., Brown, C.C., Porter, D. (2004): Experimental evidence that the bulldog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol. J.* **14**: 201-207.
- Farrer, R.A., Weinert, L.A., Bielby, J., Garner, T.W.J., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham, A.A., Weldon, C., du Preez, L.H., Anderson, L., Pond, S.L.K., Shahar-Golan, R., Henk, D.A., Fisher, M.C. (2011): Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 18732-18736.
- 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 Biol. Rev.* **21**: 2-9.
- Forzan, M.J., Gunn, H., Scott, P. (2008): Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment, and control. *J. Zoo. Wildl. Med.* **39**: 406-411.
- Frías-Alvarez, P., Vredenburg, V.T., Familiar-López, M., Longcore, J.E., González-Bernal, E., Santos-Barrera, G., Zambrano, L., Parra-Olea, G. (2008): Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *EcoHealth* **5**: 18-26.
- Garland, S., Baker, A., Phillott, A.D., Skerratt, L.F. (2010): BSA reduces inhibition in a TaqMan (R) assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.* **92**: 113-116.
- Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A.A., Fisher, M.C. (2006): The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol. Lett.* **2**: 455-459.
- Garner, T.W.J., Stephen, I., Wombwell, E., Fisher, M.C. (2009a): The amphibian trade: bans or best practice? *EcoHealth* **6**: 148-151.
- Garner, T.W.J., Garcia, G., Carroll, B., Fisher, M.C. (2009b): Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis. Aquat. Org.* **83**: 257-260.
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T., Hyatt, A.D. (2009): Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Mol. Ecol.* **18**: 4757-4774.
- 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*. *Dis. Aquat. Org.* **73**: 175-192.
- Johnson, M.L., Speare, R. (2003): Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infect. Dis.* **9**: 922-925.
- Kolby, J.E. (2014): Presence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in native amphibians exported from Madagascar. *PLoS ONE* **9**: e89660.
- Kolby, J.E., Smith, K.M., Berger, L., Karesh, W.B., Preston, A., Pessier, A.P., Skerratt, L.F. (2014): First evidence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in Hong Kong amphibian trade. *PLoS ONE* **9**: e90750.
- Kriger, K., Hero, J.M. (2009): Chytridiomycosis, amphibian extinctions, and lessons for the prevention of future panzootics. *EcoHealth* **6**: 6-10.
- Lips, K.R., Burrows, P.A., Mendelson, J.R., Parra-Olea, G. (2005): Amphibian population declines in Latin America: a synthesis. *Biotropica* **37**: 222-226.
- 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.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W.F., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: 15325-15329.
- 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 Bocklaer, I., Bossuyt, F., Pasmans, F. (2014): Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* **346**: 630-631.
- Mazzoni, R., Cunningham, A.A., Daszac, P., Apolo, A., Perdomo, E., Speranza, G. (2003): Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infect. Dis.* **9**: 995-998.

- McKenzie, V.J., Peterson, A.C. (2012): Pathogen pollution and the emergence of a deadly amphibian pathogen. *Mol. Ecol.* **21**: 5151-5154.
- Mendelson, J.R. III, Lips, K.R., Gagliardo, R.W., Rabb, G.B., Collins, J.P., Diffendorfer, J.E., Daszak, P., Ibáñez, D.R., Zippel, K.C., Lawson, D.P., Wright, K.M., Stuart, S.N., Gascon, C., da Silva, H.R., Burrowes, P.A., Joglar, R.L., La Marca, E., Lötters, S., du Preez, L.H., Weldon, C., Hyatt, A., Rodriguez-Mahecha, J.V., Hunt, S., Robertson, H., Lock, B., Raxworthy, C.J., Frost, D.R., Lacy, R.C., Alford, R.A., Campbell, J.A., Parra-Olea, G., Bolaños, F., Domingo, J.J., Halliday, T., Murphy, J.B., Wake, M.H., Coloma, L.A., Kuzmin, S.L., Price, M.S., Howell, K.M., Lau, M., Pethiyagoda, R., Boone, M., Lannoo, M.J., Blaustein, A.R., Dobson, A., Griffiths, R.A., Crump, M.L., Wake, D.B., Brodie, E.D. Jr. (2006): Confronting amphibian declines and extinctions. *Science* **313**: 48.
- OIE (World Organisation for Animal Health) (2009): Aquatic Animal Health Code, charter 2.4.1. http://www.oie.int/eng/normes/fcode/a_summry.html.
- 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**: e56802.
- Ouellet, M., Mikaelian, I., Pauli, B.D., Rodrigue, J., Green, D.M. (2005): Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conserv. Biol.* **19**: 1431-1440.
- Peel, A.J., Hartley, M., Cunningham, A.A. (2012): Quantitative risk analysis of introducing *Batrachochytrium dendrobatidis* to the UK through the importation of live amphibians. *Dis. Aquat. Org.* **98**: 95-112.
- Pessier, A.P. (2008): Management of disease as a threat to amphibian conservation. *Int. Zoo Yearb.* **42**: 30-39.
- Pessier, A.P., Mendelson, J.R., Eds (2010): A Manual for Control of Infectious Diseases in Amphibian Survival Assurance Colonies and Reintroduction Programs. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN.
- Pessier, A.P., Nichols, D.K., Longcore, J.E., Fuller, M.S. (1999): Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **11**: 194.
- Price, S.J., Garner, T.W.J., Nichols, R.A., Balloux, F., Ayres, C., Mora-Cabello de Alba, A., Bosch, J. (2014): Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. *Curr. Biol.* **24**: 2586-2591.
- R Development Core Team (2009): R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Morgan, J.A.T., Stice, M.J., Vredenburg, V.T., Parker, J.M., Briggs, C.J. (2006): Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology* **87**: 1671-1683.
- 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*). *Biol. Conserv.* **142**: 1420-1426.
- Schloegel, L.M., Daszak, P., Cunningham, A.A., Speare, R., Hill, B. (2010): Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. *Dis. Aquat. Org.* **92**: 101-108.
- Spitzen-van der Sluijs, A., Martel, A., Wombwell, E., Van Rooij, P., Zollinger, R., Woeltjes, T., Rendle, M., Haesebrouck, F., Pasmans, F. (2011): Clinically healthy amphibians in captive collections and at pet fairs: a reservoir of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Amphibia-Reptilia* **32**: 419-423.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischmann, D.L., Waller, R.W. (2004): Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* **306**: 1783-1786.
- Tamukai, T., Une, Y., Tominaga, A., Suzuki, K., Goka, K. (2014): *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence and haplotypes in domestic and imported pet amphibians in Japan. *Dis. Aquat. Org.* **109**: 165-175.
- Venesky, M.D., Mendelson, J.R., Sears, B.F., Stiling, P., Rohr, J.R. (2012): Selecting for tolerance against pathogens and herbivores to enhance success of reintroduction and translocation. *Conserv. Biol.* **26**: 586-592.
- Walker, S.F., Salas, M.B., Jenkins, D., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Bosch, J., Fisher, M.C. (2007): Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. *Dis. Aquat. Org.* **77**: 105-112.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R., Speare, R. (2004): Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infect. Dis.* **10**: 2100-2105.
- Wellington, R., Haering, R. (2008): Hygienic protocol for the control of disease in frogs. Threatened Species Management Information Circular No. 6. Department of Environment and Climate Change, National Parks and Wildlife Service, Sydney South, Australia.
- Woodhams, D.C., Alford, R.A., Marantelli, G. (2003): Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Org.* **55**: 65-67.
- Woodhams, D.C., Bosch, J., Briggs, C.J., Cashins, S., Davis, L.R., Lauer, A., Muths, E., Puschendorf, R., Schmidt, B.R., Sheafor, B., Voyles, J. (2011): Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Front. Zool.* **8**: 8.
- Young, B.E., Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Boucher, T.M. (2004): Disappearing Jewels: The Status of New World Amphibians. NatureServe, Arlington, Virginia.
- Young, S., Berger, L., Speare, R. (2007): Amphibian chytridiomycosis: strategies for captive management and conservation. *Int. Zoo Yearb.* **41**: 1-11.

Submitted: September 29, 2014. Final revision received: December 29, 2014. Accepted: January 17, 2015.

Associate Editor: Sebastian Steinfartz.

Distribution, prevalence, and amphibian hosts of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Balkans

JIŘÍ VOJAR¹, BARBORA HAVLÍKOVÁ¹, MILIČ SOLSKÝ¹, DANIEL JABLONSKI², VUK IKOVIĆ³ & VOJTECH BALÁŽ^{4,5}

¹) Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic

²) Department of Zoology, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina B-1, 842 15 Bratislava, Slovakia

³) Montenegrin Ecologists Society, Bulevar Sv. Petra Cetinjskog 73, Podgorica, Montenegro

⁴) Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

⁵) Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

Corresponding author: Jiří VOJAR, e-mail: vojar@fzp.czu.cz

Manuscript received: 29 July 2015

Accepted: 7 September by STEFAN LÖTTERS

Abstract. The Mediterranean region, consisting of, amongst other areas, three main southern European peninsulas (the Iberian, Apennine, and Balkan) is known as one of the world's biodiversity hotspots. The Iberian Peninsula was the first place in Europe where amphibians were confirmed to be infected by the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Whereas the Iberian and Apennine peninsulas have been subject to intensive chytridiomycosis research, this study represents the first large-scale *Bd* survey in the Balkans. Over a two-year period, 454 skin swab samples of amphibians were collected in Montenegro, Albania, and the Republic of Macedonia of which 65 samples (14.3%) were *Bd*-positive. *Bd* was detected in 5 out of 11 sampled species (*Bombina variegata*, *Hyla arborea*, *Lissotriton vulgaris*, *Pelophylax* sp., and *Triturus macedonicus*) at 13 out of 38 localities. Infection rates did not differ between countries but varied greatly between species with a maximum in *Pelophylax* sp. (> 30%). Within positive *Pelophylax* samples, infection loads were constant across areas and age groups. Considering the Balkans' biodiversity and the potential threat to local endemics and genetic richness, future monitoring is vital for assessing *Bd* presence, prevalence and infection trends in the region.

Key words. Amphibian infectious disease, Balkan Peninsula, chytridiomycosis.

Introduction

With its extraordinary species richness and high level of endemism, the Mediterranean region is known as one of the world's biodiversity hotspots (cf. COX et al. 2006). Old radiation centres and glacial refuges of various organisms, including amphibians, in the Mediterranean (TABERLET et al. 1998, HUSEMANN et al. 2014) have contributed to the current species and genetic diversity in Europe. Compared to the Iberian and Apennine peninsulas, the Balkans encompass a lower overall amphibian species diversity (COX et al. 2006). However, with its 29 species of amphibians (excluding the batrachofauna of Crete and the eastern Aegean Islands), the region is nevertheless considered a centre of species diversity and endemism of the European herpetofauna (e.g., DŽUKIĆ & KALEZIĆ 2004 with respect to the recent taxonomy sensu SPEYBROECK et al. 2010).

The greatest species diversity within the Balkans was recorded for the so-called "Adriatic triangle" in Montenegro

(DŽUKIĆ & KALEZIĆ 2004). This area's remarkable geological, soil, and climatic diversity has shaped the highest diversity index recorded for all of Europe (number of species/area unit = 0.84; ŠĆEPANOVIĆ et al. 2010). The Balkans region has played an important role as a crossroad for species entering Europe from eastern radiation centres (e.g., the *Triturus karelinii* complex, *Hyla orientalis* or *Bufo viridis* complex; WIELSTRA et al. 2010, STÖCK et al. 2012, ÖZDEMİR et al. 2014). Several amphibian species presently express high phenotypic and especially unique genetic diversity or are endemic to the Balkans region (*Proteus anguinus*, *Triturus* spp., *Ichthyosaura alpestris*, *Bombina* spp., *Hyla arborea*, *Pelophylax shqipericus*, *Pelophylax epeiroticus*, *Rana graeca*; DŽUKIĆ & KALEZIĆ 2004, SOTIROPOULOS et al. 2007, FIJARCZYK et al. 2011, DUFRESNES et al. 2013, WIELSTRA et al. 2013).

Amphibians are presently facing a global decline that is in many cases caused by invasive species and diseases (BERGER et al. 1998, STUART et al. 2004). Knowledge of

presence of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), and its impact on amphibians in the main Mediterranean peninsulas varies greatly, while following a west-to-east gradient of “scientific interest”. The Iberian region became the centre of European chytridiomycosis research due to the declining populations of three species in the genus *Alytes* (BOSCH et al. 2001, BOSCH & RINCÓN 2008, BOSCH et al. 2013, ROSA et al. 2013). The Apennine Peninsula has been the subject of several local *Bd* mapping projects (e.g., SIMONCELLI et al. 2005, CANESSA et al. 2013, TESSA et al. 2013) that also included northern Italy (STAGNI et al. 2004) and the island of Sardinia (BIELBY et al. 2009). In the Balkans region, on the other hand, only few samples have been analysed and published to date, of which none (GARNER et al. 2005, VÖRÖS & JELIĆ 2011) or only small numbers proved *Bd*-positive (VÖRÖS et al. 2013). Asia Minor, meanwhile, has had a proven presence of *Bd* in just a single individual (GÖÇMEN et al. 2013). Given the low surveying effort, it is possible that even mass mortalities with an intensity equivalent to that of *Alytes obstetricans* in Spain (BOSCH et al. 2001) or of *Discoglossus sardus* in Sardinia (BIELBY et al. 2009) have gone unrecorded in the eastern Mediterranean region. The aim of our study was to conduct the first extensive survey of *Bd* occurrence in the Balkan Peninsula.

Material and methods

The present *Bd* survey focused on Montenegro, Albania, and the Republic of Macedonia (Fig. 1). In 2013, samples were collected haphazardly at one locality as a pilot study to provide preliminary information on the presence of *Bd* in the area. During spring of the following year, more intense *Bd* sampling was conducted in Montenegro. At each of 13 localities there, we endeavoured to sample a minimum of 30 individuals per species in order to ensure an acceptable probability of *Bd* detection (DIGIACOMO & KOEPEL 1986). Overall, sampling was conducted in two consecutive years (2013 and 2014) at 14 localities in Montenegro (one locality in 2013, 13 in 2014), 16 localities in Albania, and 8 localities in the Republic of Macedonia (Supplementary Table 1). Sample collection was performed by skin-swabbing live amphibians using sterile Dryswab® (MW100, Medical Wire & Equipment Co, UK) or by collecting toe clips (HYATT et al. 2007). A new pair of disposable gloves was used for each specimen to prevent disease transmission between animals (FORZÁN et al. 2008). Each sampled individual was recorded, photographed, and then returned to the place of its capture.

The swab samples were stored dry and refrigerated after returning from the field. The tissue samples were pre-

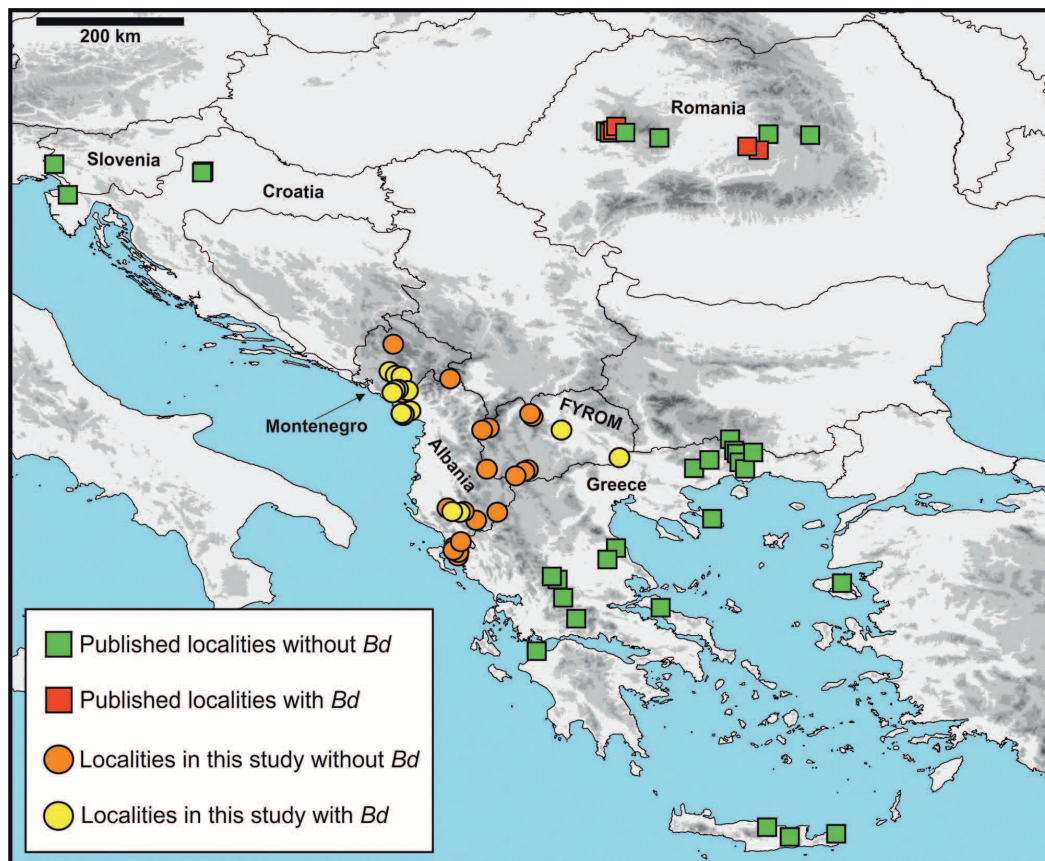


Figure 1. Current distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) in the Balkan Peninsula. Published localities according to GARNER et al. (2005), VÖRÖS & JELIĆ (2011) and VÖRÖS et al. (2013).

Table 1. Overview of amphibian taxonomic groups examined for the presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) in Albania, Montenegro, and the Republic of Macedonia. Total – overall number of sampled animals; *Bd*+ – number of *Bd*-positive animals; Prevalence – proportions of *Bd*-positive samples in percent with 95% confidence intervals (CI).

Taxa	Total/ <i>Bd</i> +	Prevalence [%] (95% CI)
Anura		
Bombinatoridae		
<i>Bombina variegata</i>	20/5	25 (10.4–47.5)
Bufonidae		
<i>Bufo bufo</i>	45/0	0 (0–8.3)
<i>Bufo viridis</i>	7/0	0 (0–37.7)
Hylidae		
<i>Hyla arborea</i>	54/1	1.9 (0.1–9.8)
Ranidae		
<i>Pelophylax</i> sp.	218/57	26.1 (20.6–32.5)
<i>Rana dalmatina</i>	17/0	0 (0–19.6)
<i>Rana graeca</i>	4/0	0 (0–52.7)
Caudata		
Salamandridae		
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	17/0	0 (0–19.6)
<i>Lissotriton vulgaris</i>	73/1	1.4 (0.1–7.3)
<i>Salamandra salamandra</i>	1/0	0 (0–95)
<i>Triturus macedonicus</i>	10/1	10 (0.5–44.6)
Total	466/65	13.9 (11–17.5)

served in pure ethanol. Swab tips or small pieces of skin tissue were treated with PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Life Technologies), homogenised in MagNA Lyser (Roche Diagnostics), and boiled for 10 minutes. The prepared DNA samples were then diluted 10 times and examined for the presence of *Bd* by the TaqMan® probe-based qPCR-assay developed by BOYLE et al. (2004) with bovine serum albumin (BSA) added to limit PCR inhibition (GARLAND et al. 2010). The addition of BSA prevents bias caused by PCR inhibition amongst taxa and improves the overall accuracy of the detection method (BALÁŽ et al. 2014a). No additional means to control for false negative results, like internal positive controls, were used due to budget limitations. The detection procedure was performed in LightCycler 480 II (Roche Diagnostics) using the LightCycler Probes Master in a manufacturer-recommended total volume of 20 µl. Each sample was run in duplicates, and the samples were re-tested in cases of ambiguous results. Aliquots of known concentration of *Bd* DNA were provided by the Institute of Zoology, Zoological Society of London, and served as quantification standards in the reaction, allowing quantification of the pathogen load in genomic equivalents of a zoospore (GE). A sample was considered positive if it produced a typical fluorescence growth curve and the resulting quantity was > 0.1 GE.

The prevalence and its confidence intervals (95%, Sterne's exact method) between species were computed using the software Quantitative Parasitology (ROZSA et al. 2000). The occurrence of *Bd* in the three countries was compared using Generalized Linear Models (GLMs) within R statistical software, version 3.0.2 (R Core Team 2013). Within each GLM, we used log-linear modelling with Poisson distribution of the response variable (frequencies of *Bd*-positive and *Bd*-negative samples in each country).

Subsequent analyses were performed only for the data set derived from our surveys in Montenegro during 2014. That data set, originally consisting of 350 samples from 8 species at 13 localities, was further restricted to species with at least 10 sampled animals per species and locality. Thus, the final data set consisted of 278 samples from 5 species (*Bufo bufo*, *Hyla arborea*, *Ichthyosaura alpestris*, *Lissotriton vulgaris*, *Pelophylax* sp.) at 10 localities. *Pelophylax* sp. was considered as a single taxon for reasons of difficult identification. By using a GLM, we compared the occurrence of *Bd* – expressed as a binary response variable (*Bd*-positive vs. *Bd*-negative) – between species and areas. Within the data subset consisting of only positive *Pelophylax* samples, we compared the mean GE values between areas (Supplementary Table 1), as well as between adult and subadult animals. The response variable GE had a normal distribution following logarithmic transformation, and therefore a Linear Model (LM) was used. Quantitative comparison of GE was restricted to *Pelophylax* sp., because the numbers of *Bd*-positive samples within other species were very low.

To test the significance of each explanatory variable in the model, we used Chi-squared deletion tests in the case of GLM and an F-test for the LM (CRAWLEY 2007). Each minimal adequate model was checked in the end with standard statistical diagnostics, i.e., by residuals and standardized residuals versus fitted and predicted values, as well as by Cook's distances (CRAWLEY 2007).

Results

Of our 454 samples, 65 were *Bd*-positive (14.3%), and *Bd* was detected in 5 (*Bombina variegata*, *H. arborea*, *L. vulgaris*, *Pelophylax* sp., and *Triturus macedonicus*) out of 11 sampled species (45.5%) at 13 out of 38 localities (34.2%) across the three surveyed countries (Supplementary Table 1, Table 1). We found no differences between countries in the proportions of *Bd*-positive samples ($df = 2, p = 0.24$); Montenegro: 55 *Bd*-positive samples out of the total 382 samples (i.e., 14.4%), Albania: 6/59 (10.2%), the Republic of Macedonia: 4/13 (30.8%), probably due to the low numbers of sampled animals in Albania and the Republic of Macedonia.

During the 2013 pilot study, 32 individuals of *Pelophylax* sp. were sampled in Montenegro at one locality. Four of these (12.5%) were *Bd*-positive. During the more intensive sampling in the following year, we sampled 350 animals and found 51 of these (14.6%) to be infected. Of the 13 Montenegro localities examined in 2014, *Bd* was detected

in 8 (Supplementary Table 1). Fifty of the 267 anuran samples (18.7%) and 1 of 84 urodelan samples (1.2%) tested in 2014 were positive for *Bd*. We recorded 8 amphibian species, three of which were *Bd*-positive (*H. arborea*, *L. vulgaris*, and *Pelophylax* sp.) and 5 of which were *Bd*-negative (Supplementary Table 1). The fungus occurred mainly at low infection intensity, with the GE values ranging from 0.29 to 212.0, and no apparent behavioural or macroscopic symptoms of disease were observed.

Across the 5 selected species with sufficient numbers of samples (at least 10 samples per species and locality in 2014) – *B. bufo*, *H. arborea*, *I. alpestris*, *L. vulgaris*, *Pelophylax* sp. – we found marginally significant difference in the proportions of *Bd*-positive and *Bd*-negative samples between five areas ($df = 4$, $p = 0.038$). Whereas the proportions of *Bd*-positive samples were about 20–25% in the areas of Lake Šas (7 out of 33 samples), Lake Skadar (24/94) and Danilovgrad (19/92), we found only one and no positive samples in the areas Štoj and Durmitor, respectively. The proportions of *Bd*-positive and *Bd*-negative samples differed greatly between species ($df = 4$, $p < 10^{-6}$), and the highest infection rate occurred in *Pelophylax* sp. (49 out of the 160 sampled animals, 30.6%). In another two species with proven *Bd* occurrence (*H. arborea* and *L. vulgaris*), we found only one positive sample per species (Supplementary Table 1). Within the data set consisting solely of positive *Pelophylax* samples, we found no differences in GE values either between adults and subadults ($F = 0.77$, $p = 0.38$) or between the four areas with *Bd* presence ($F = 0.94$, $p = 0.40$). Furthermore, the interaction between these two variables was not significant ($F = 0.33$, $p = 0.57$), meaning that GE values did not differ within age groups across areas.

Discussion

The overall risk posed by the amphibian chytrid fungus to European amphibians appears to be heterogeneous in both geography and host taxonomy. While the Mediterranean peninsulas contain several well-studied sites where chytridiomycosis has affected populations and caused mortalities (BOSCH et al. 2001, STAGNI et al. 2004, WALKER et al. 2008, BIELBY et al. 2009, ROSA et al. 2013), no such sites are known from central parts of Europe in spite of the wide distribution of the fungus in various environments (e.g., OHST et al. 2011, SZTATECSNY & GLASER 2011). This geographic variability is boosted further by differences within taxonomic groups in the probability of carrying the infection (BALÁŽ et al. 2014a).

The highest infection rate in Balkan species (30.6%) was observed in *Pelophylax* sp. This result is particularly important with regard to the endemic water frog *Pelophylax shqipericus* (an endangered species according to the IUCN Red List of Threatened Species) whose distribution is limited to western Albania and southern Montenegro at altitudes below 500 m a.s.l. and whose populations are diminishing due to a variety of factors. The northernmost limits of its range are at Lake Skadar where its continued existence

is significantly threatened by aquatic pollution and over-collection for commercial purpose (pet trade and food industry; UZZEL & CRNOBRNJA-ISAILOVIĆ 2009). Therefore, additional information about the role of chytridiomycosis in the decline of *P. shqipericus* is urgently needed.

Data supporting the universal role of *Pelophylax* frogs as *Bd* reservoirs are on the increase. *Bd* infections in this genus have been recorded across most of Europe (summary in BALÁŽ et al. 2014b), as well as in Turkey (GÖÇMEN et al. 2013). Showing low variability of *Bd* prevalence in *Pelophylax* frogs between different sites, our results imply that the water frog is itself the most important factor in the occurrence of *Bd* while environmental factors have secondary effects. Combined with the realisation that these frogs are immune to the disease itself (WOODHAMS et al. 2012), this information points to the water frogs as an important object of study for understanding the dynamics of *Bd* infection. The detection of *Bd* infections in amphibians from our dataset adds evidence to the presence of this pathogen in multiple areas of the northern Balkans (Carpathians; see VÖRÖS et al. 2013), and improves our knowledge of its current distribution. We detected *Bd* in several species (*B. variegata*, *H. arborea*, *L. vulgaris*, *Pelophylax* spp., and *T. macedonicus*) that express high genetic variability and contain lineages endemic to the area. The identified positive areas (central and southern Montenegro, southern Albania and eastern Macedonia) are known as a Pliocene-Pleistocene refuge for many vertebrate taxa. As for amphibians, four Balkans-endemic species occur (*P. epeiroticus*, *P. shqipericus*, *Rana graeca*, and *T. macedonicus*) and unique haplotypes of *B. variegata* and *L. vulgaris* were detected here (HOFMAN et al. 2007, FIJARZCYK et al. 2011, PABIJAN et al. 2015).

Based on the published works on the historical biogeography of amphibians in the Balkans and our current results, we suggest the following areas as important for study of *Bd* (besides the “Adriatic triangle”): Carpathians (*B. variegata*, *I. alpestris*; HOFMAN et al. 2007, FIJARZCYK et al. 2011), northern Balkan Mts. (*I. alpestris*), northwestern Adriatic (*H. arborea*, *L. vulgaris*; DUFRESNES et al. 2013, PABIJAN et al. 2015), Pindos Mts. (*B. variegata*, *H. arborea*, *L. vulgaris*, *T. macedonicus*, *Pelophylax ridibundus*; LYMBERAKIS et al. 2007, WIELSTRA et al. 2013), Peloponnese (*L. vulgaris*), and Crete (*Pelophylax cretensis*). However, there are many “white” areas on the map where further sampling is required to assess the actual prevalence of *Bd* in local amphibians. Furthermore, sampling should cover multiple seasons, because the prevalence and intensity of infection are strongly affected by climatic conditions and may vary seasonally (SAVAGE et al. 2011) and chytrid prevalence could be higher than suggested by our data. Badly chosen seasonality and poor sampling is probably the reason why *Bd* has yet not been found in, and published for, other regions of the Balkans (e.g., in Greece). It may be assumed that *Bd* is broadly distributed in the Balkans for which reason surveys at local and regional scales could provide valuable information about the spread and impact of the pathogen and help optimise potential conservation strategies.

In this study, we present the first regular survey of the occurrence of *Bd* in the Balkan Peninsula with the main focus on Montenegro. As the Mediterranean peninsulas are hotspots of diversity richness and endemism (Cox et al. 2006), it is important to conduct intensive research there as to the presence, prevalence, and infection trends of *Bd*. Our results support the importance of the *Pelophylax* species group as a *Bd* reservoir host. In the evolutionary past of the European fauna, the Mediterranean peninsulas have played roles as safe havens for biodiversity, including the batrachofauna. Today, these regions deserve to be the subjects of intense scientific and conservation measures in order to describe, understand, and save what is left before some of the unique species and lineages are lost to the pressure of invasive organisms, including pathogens.

Acknowledgements

We thank G. A. KIRKING for a useful comment on the manuscript, and J. DOLEŽALOVÁ, D. SMOLOVÁ, K. ŠIMŮNKOVÁ, P. CHAJMA, M. SLÁDEČEK, and M. ŠIKOLA for their help in the field. The project was supported by the Research Project of the Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences in Prague, No. 20144269. We are grateful to the Zoological Society of London for providing quantification standards. The sampling was performed on the basis of permit No. 02 Broj UPI-321/4 issued by the Montenegrin Agencija za Zaštitu Životne Sredine.

References

BALÁŽ, V., J. VOJAR, P. CIVIŠ, M. ŠANDERA & R. ROZÍNEK (2014a): Chytridiomycosis risk among the Central European amphibians based on surveillance data. – *Diseases of Aquatic Organisms*, **112**: 1–8.

BALÁŽ, V., J. VÖRÖS, P. CIVIŠ, J. VOJAR, A. HETTYEY, E. SÓS, R. DANKOVICS, R. JEHL, D. G. CHRISTIANSEN, F. CLARE, M. C. FISHER, T. W. J. GARNER & J. BIELBY (2014b): Assessing risk and guidance on monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through identification of taxonomic selectivity of infection. – *Conservation Biology*, **28**: 213–223.

BERGER, L., R. SPEARE, P. DASZAK, D. E. GREEN, A. A. CUNNINGHAM, C. L. GOGGIN, R. SLOCOMBE, M. A. RAGAN, A. D. HYATT, K. R. McDONALD, H. B. HINES, K. R. LIPS, G. MARANTELLI & H. PARKES (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 USA*, **95**: 9031–9036.

BIELBY, J., S. BOVERO, G. SOTGIU, G. TESSA, M. FAVELLI, C. ANGELINI, S. DOGLIO, F. C. CLARE, E. GAZZANIGA, F. LAPIETRA & T. W. J. GARNER (2009): Fatal chytridiomycosis in the Tyrrhenian painted frog. – *EcoHealth*, **6**: 27–32.

BOSCH, J., D. GARCÍA-ALONSO, S. FERNÁNDEZ-BEASKOETXEA, M. C. FISHER & T. W. J. GARNER (2013): Evidence for the introduction of lethal chytridiomycosis affecting wild Betic midwife toads (*Alytes dickhilleni*). – *EcoHealth*, **10**: 82–89.

BOSCH, J., I. MARTÍNEZ-SOLANO & M. GARCÍA-PARÍS (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.

BOSCH, J. & P. A. RINCÓN (2008): Chytridiomycosis-mediated expansion of *Bufo bufo* in a montane area of Central Spain: an indirect effect of the disease. – *Diversity and Distributions*, **14**: 637–643.

BOYLE, D. G., D. B. BOYLE, V. OLSEN, J. A. T. MORGAN & A. D. HYATT (2004): Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time TaqMan PCR assay. – *Diseases of Aquatic Organisms*, **60**: 141–148.

CANESSA, S., A. MARTEL & F. PASMANS (2013): No detection of chytrid in first systematic screening of *Bombina variegata pachypus* (Anura: Bombinatoridae) in Liguria, northern Italy. – *Acta Herpetologica*, **8**: 59–63.

COX, N., J. CHANSON & S. STUART (compilers) (2006): The Status and Distribution of Reptiles and Amphibians of the Mediterranean Basin. – IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

CRAWLEY, M. J. (2007): *The R Book*. – John Wiley & Sons, Chichester, England.

DIGIACOMO, R. F. & T. D. KOEPEL (1986): Sampling for detection of infection or disease in animal populations. – *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **189**: 22–23.

DUFRESNES, C., J. WASSEF, K. GHALI, A. BRELSFORD, M. STÖCK, P. LYMBERAKIS, J. CRNOBRNJA-ISAILOVIC & N. PERRIN (2013): Conservation phylogeography: does historical diversity contribute to regional vulnerability in European tree frogs (*Hyla arborea*)? – *Molecular Ecology*, **22**: 5669–5684.

DŽUKIĆ, G. & M. L. KALEZIĆ (2004): The biodiversity of amphibians and reptiles in the Balkan Peninsula. – pp. 167–192 in: GRIFFITHS, H. I., J. KRSTUFEK & J. M. REED (eds): *Balkan Biodiversity. Pattern and Process in the European Hotspot*. – Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

FIJARCZYK, A., K. NADACHOWSKA, S. HOFMAN, S. N. LITVINCHUK, W. BABIK, M. STUGLIK, G. GOLLMANN, L. CHOLEVA, D. COGĂLNICEANU, T. VUKOV, G. DŽUKIĆ & J. M. SZYMURA (2011): Nuclear and mitochondrial phylogeography of the European fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata* supports their independent histories. – *Molecular Ecology*, **20**: 3381–3398.

FORZÁN, M. J., H. GUNN & P. SCOTT (2008): Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment, and control. – *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **39**: 406–411.

GARLAND, S., A. BAKER, A. D. PHILLIOTT & L. F. SKERRATT (2010): BSA reduces inhibition in a TaqMan assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. – *Diseases of Aquatic Organisms*, **92**: 113–116.

GARNER, T. W. J., S. WALKER, J. BOSCH, A. D. HYATT, A. A. CUNNINGHAM & M. C. FISHER (2005): Chytrid fungus in Europe. – *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 1639–1641.

GÖÇMEN, B., M. VEITH, N. İÇCI, B. AKMAN, O. GODMANN & N. WAGNER (2013): No detection of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in terrestrial Turkish salamanders (*Lyciasalamandra*) despite its occurrence in syntopic frogs (*Pelophylax bedriagae*). – *Salamandra*, **49**: 51–55.

HOFMAN, S., C. SPOLSKY, T. UZZELL, D. COGĂLNICEANU, W. BABIK & J. M. SZYMURA (2007): Phylogeography of the fire-bellied toads *Bombina*: independent Pleistocene histories inferred from mitochondrial genomes. – *Molecular Ecology*, **16**(11): 2301–2316.

- HUSEMANN, M., T. SCHMITT, F. E. ZACHOS, W. ULRICH & J. C. HABEL (2014): Palaearctic biogeography revisited: evidence for the existence of a North African refugium for Western Palaearctic biota. – *Journal of Biogeography*, **41**: 81–94.
- HYATT, A. D., D. G. BOYLE, V. OLSEN, D. B. BOYLE, L. BERGER, D. OBENDORF, A. DALTON, K. KRIGER, M. HERO, H. HINES, R. PHILLOTT, R. CAMPBELL, G. MARANTELLI, F. GLEASON & A. COLLING (2007): Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. – *Diseases of Aquatic Organisms*, **73**: 175–192.
- LYMBERAKIS, P., N. POULAKAKIS, G. MANTHALOU, C. S. TSGENOPOULOS, A. MAGOULAS, & M. MYLONAS (2007): Mitochondrial Phylogeography of Western Palaearctic *Rana (Pelophylax)* spp. with emphasis in the Eastern Mediterranean populations. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**: 115–125.
- OHST, T., Y. GRÄSER, F. MUTSCHMANN & J. PLÖTNER (2011): Neue Erkenntnisse zur Gefährdung europäischer Amphibien durch den Hautpilz *Batrachochytrium dendrobatidis*. – *Zeitschrift für Feldherpetologie*, **18**: 1–17.
- ÖZDEMİR, N., S. GÜL, N. A. POYARKOV, B. KUTRUP, M. TOSONOĞLU & S. DOGLIO (2014): Molecular systematics and phylogeography of *Bufo variabilis* (syn. *Pseudepidalea variabilis*) (Pallas, 1769) in Turkey. – *Turkish Journal of Zoology*, **38**: 412–420.
- PABIJAN, M., P. ZIELIŃSKI, K. DUDEK, M. CHLOUPEK, K. SOTIROPOULOS, M. LIANA & W. BABIK (2015): The dissection of a Pleistocene refugium: phylogeography of the smooth newt, *Lissotriton vulgaris*, in the Balkans. – *Journal of Biogeography*, **42**(4): 671–683.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- ROSA, G. M., I. ANZA, P. L. MOREIRA, J. CONDE, F. MARTINS, M. C. FISHER & J. BOSCH (2013): Evidence of chytrid-mediated population declines in common midwife toad in Serra da Estrela, Portugal. – *Animal Conservation*, **16**: 306–315.
- ROZSA, L., J. REICZIGEL & G. MAJOROS (2000): Quantifying parasites in samples of hosts. – *Journal of Parasitology*, **86**: 228–232.
- SAVAGE, A. E., M. J. SREDL & K. R. ZAMUDIO (2011): Disease dynamics vary spatially and temporally in a North American amphibian. – *Biological Conservation*, **144**: 1910–1915.
- ŠĆEPANOVIĆ, L., T. ĐOKOVIĆ, B. MILOŠEVIĆ, N. BJELICA, A. BOŽOVIĆ, G. ĐUKANOVIĆ, S. DAMJANOVIĆ, V. NOVAKOVIĆ, I. TADIĆ, I. BULATOVIĆ, M. BATAKOVIĆ, M. VUKČEVIĆ & M. PULEVIĆ (2010): Reporter životne sredine. – Agencija za zaštitu životne sredine Crne Gore, Podgorica, Montenegro.
- SIMONCELLI, F., A. FAGOTTI, R. DALL'OLIO, D. VAGNETTI, R. PASCOLINI & I. ROSA (2005): Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in water frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. – *EcoHealth*, **2**: 307–312.
- SOTIROPOULOS, K., K. ELEFThERAKOS, G. DŽUKIĆ, M. L. KALEZIĆ, A. LEGAKIS & R. M. POLYMERI (2007): Phylogeny and biogeography of the alpine newt *Mesotriton alpestris* (Salamandridae, Caudata), inferred from mtDNA sequences. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **45**: 211–226.
- SPEYBROECK, J., W. BEUKEMA & P. A. CROCHET (2010): A tentative species list of the European herpetofauna (Amphibia and Reptilia) – an update. – *Zootaxa*, **2492**: 1–27.
- STAGNI, G., R. DALL'OLIO, U. FUSINI, S. MAZZOTTI, C. SCOCCIANTI & A. SERRA (2004): Declining populations of Apennine yellow bellied toad *Bombina pachypus* in northern Apennines (Italy): is *Batrachochytrium dendrobatidis* the main cause? – *Italian Journal of Zoology*, **71**: 151–154.
- STÖCK, M., C. DUFRESNES, S. N. LITVINCHUK, P. LYMBERAKIS, S. BIOLLAY, M. BERRONEAU, A. BORZÉE, K. GHALI, M. OGIELSKA & N. PERRIN (2012): Cryptic diversity among Western Palearctic tree frogs: postglacial range expansion, range limits, and secondary contacts of three European tree frog lineages (*Hyla arborea* group). – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**: 1–9.
- STUART, S. N., J. S. CHANSON, N. A. COX, B. E. YOUNG, A. S. L. RODRIGUES, D. L. FISCHMANN & R. W. WALLER (2004): Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. – *Science*, **306**: 1783–1786.
- SZTATECSNY, M. & F. GLASER (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.
- TABERLET, P., L. FUMAGALLI, A. G. WUST-SAUCY & J. F. COSSON (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. – *Molecular Ecology*, **7**: 453–464.
- TESSA, G., C. ANGELINI, J. BIELBY, S. BOVERO, C. GIACOMA, G. SOTGIU & T. W. J. GARNER (2013): The pandemic pathogen of amphibians, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Phylum Chytridiomycota), in Italy. – *Italian Journal of Zoology*, **80**: 1–11.
- UZZELL, T. & J. CRNOBRNJA-ISAILOVIĆ (2009): *Pelophylax shqipericus*. – in IUCN (ed.): IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. – Available online at www.iucnredlist.org, latest accessed 24 July 2015).
- VÖRÖS, J. & D. JELIĆ (2011): First steps to survey chytrid fungus in Croatia. – *Hyla*, **2011**: 31–34.
- VÖRÖS, J., J. BOSCH, Á. DÁN & T. HARTEL (2013): First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* on amphibians in Romania. – *North-Western Journal of Zoology*, **9**: 446–449.
- WALKER, S. F., J. BOSCH, T. Y. JAMES, A. P. LITVINTSEVA, J. A. O. VALLS, S. PIÑA, G. GARCÍA, G. A. ROSA, A. A. CUNNINGHAM, S. HOLE, R. GRIFFITHS & M. C. FISHER (2008): Invasive pathogens threaten species recovery programs. – *Current Biology*, **18**: R853–R854.
- WIELSTRA, B., A. B. BAIRD & J. W. ARNTZEN (2013): A multimer phylogeography of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies) reveals cryptic species. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **67**: 167–175.
- WIELSTRA, B., G. E. THEMUDO, Ö. GÜÇLÜ, K. OLGUN, N. A. POYARKOV & J. W. ARNTZEN (2010): Cryptic crested newt diversity at the Eurasian transition: the mitochondrial DNA phylogeography of Near Eastern *Triturus* newts. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**: 888–896.
- WOODHAMS, D. C., L. BIGLER & R. MARSCHANG (2012): Tolerance of fungal infection in European water frogs exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis* after experimental reduction of innate immune defences. – *BMC Veterinary Research*, **8**: 197.

Supplementary material

Supplementary Table 1. Summary of a *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) survey in Albania, Montenegro and the Republic of Macedonia during 2013 and 2014.

Online Supplementary data – *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Balkans

Supplementary Table 1. Summary of a *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) survey in Albania, Montenegro and the Republic of Macedonia during 2013 and 2014. Habitat – type of habitat; Lat. N – northern latitude; Long. E – eastern longitude; Alt. – altitude [m]; Total – overall number of sampled animals at a certain locality; *Bd+* – number of *Bd*-positive animals.

Country	Year	Locality	Habitat	Lat. N	Long. E	Alt.	Species	Total	<i>Bd+</i>
Albania	2013	Fitore	waterhole	39°52.17'	20°06.17'	32	<i>Rana dalmatina</i>	2	0
			meadow	40°21.99'	20°46.20'	2244	<i>Rana dalmatina</i>	1	0
			Kodër	waterhole	39°49.27'	20°06.63'	55	<i>Pelophylax</i> sp.	1
							<i>Rana graeca</i>	1	0
							<i>Rana dalmatina</i>	5	0
		Korab Mts	waterhole	41°40.94'	20°31.26'	1776	<i>Bombina variegata</i>	1	0
							<i>Ichthyosaura alpestris</i>	3	0
							<i>Triturus macedonicus</i>	3	0
		Shalës	river	39°43.41'	20°08.11'	38	<i>Pelophylax</i> sp.	10	0
			waterhole	39°40.85'	20°08.05'	62	<i>Pelophylax</i> sp.	1	0
		Shkallë	waterhole	39°40.85'	20°08.05'	62	<i>Pelophylax</i> sp.	1	0
		Sukë	stream	40°22.22'	20°09.29'	247	<i>Pelophylax</i> sp.	1	0
		Syri i Kaltër	lake, swamps	39°55.17'	20°11.11'	158	<i>Lissotriton vulgaris</i>	2	0
			lake, swamps	39°55.38'	20°11.48'	174	<i>Pelophylax</i> sp.	1	0
							<i>Rana graeca</i>	2	0
		Trebeshinë Mts	pond	40°20.58'	20°06.28'	1893	<i>Bombina variegata</i>	1	0
					<i>Bufo viridis</i>	3	0		
	pond	40°20.90'	20°06.14'	1835	<i>Triturus macedonicus</i>	1	1		
	waterhole	40°20.90'	20°06.14'	1844	<i>Bombina variegata</i>	4	3		
Trochuza	waterhole	42°30.99'	20°00.56'	1929	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	1	0		
Albania	2014	Banjë	river, swamps	40°14.61'	20°25.85'	362	<i>Bombina variegata</i>	1	0
						<i>Pelophylax</i> sp.	1	0	
		Lin	pond	41°03.82'	20°36.61'	951	<i>Bombina variegata</i>	1	0
		Schendli Mts	waterhole	40°22.77'	20°01.83'	766	<i>Bombina variegata</i>	3	0
			waterhole	40°21.33'	20°03.07'	1600	<i>Bombina variegata</i>	2	2
		Syri i Kaltër	lake, swamps	39°55.56'	20°11.51'	193	<i>Pelophylax</i> sp.	2	0
		Trebeshinë Mts	waterhole	40°21.48'	20°05.60'	1813	<i>Bombina variegata</i>	4	0
waterhole	40°21.19'		20°05.62'	1884	<i>Bombina variegata</i>	1	0		
Republic of Macedonia (FYROM)	2014	Baba Mts, NP Pelister	forest	41°02.40'	21°13.76'	1286	<i>Rana dalmatina</i>	1	0
			forest	41°01.99'	21°13.17'	1626	<i>Rana dalmatina</i>	1	0
		Babuna	river	41°41.21'	21°48.37'	172	<i>Pelophylax</i> sp.	2	2
		Bibaj	waterhole	41°43.71'	20°37.86'	1178	<i>Bombina variegata</i>	1	0
		Matka	river bank	41°57.47'	21°17.75'	302	<i>Bombina variegata</i>	1	0
			forest	41°56.81'	21°18.13'	316	<i>Salamandra salamandra</i>	1	0
		Nikolich	stream	41°15.11'	22°44.22'	160	<i>Pelophylax</i> sp.	5	2
		Pretor, Prespansko Lake	swamps	40°57.70'	21°04.04'	854	<i>Pelophylax</i> sp.	1	0
Montenegro	2013	Pothum	lake	42°18.78'	19°21.22'		<i>Pelophylax</i> sp.	32	4
Montenegro	2014	Lake Šas	lake, wetland	41°58.76'	19°20.16'	15	<i>Hyla arborea</i>	1	0
						<i>Pelophylax</i> sp.	32	7	
		Moromish	swamp	42°31.66'	19°11.89'	35	<i>Hyla arborea</i>	2	0
							<i>Lissotriton vulgaris</i>	30	0
							<i>Pelophylax</i> sp.	7	3
					<i>Triturus macedonicus</i>	1	0		
Plavnica	river channel	42°16.38'	19°12.06'	14	<i>Pelophylax</i> sp.	6	0		
Provalija	depression	43°04.14'	19°06.37'	1443	<i>Bufo bufo</i>	27	0		

Online Supplementary data – Jiří VOJÁR et al.

Country	Year	Locality	Habitat	Lat. N	Long. E	Alt.	Species	Total	Bd+										
Montenegro	2014	Slap	flooded valley	42°37.05'	19°03.12'	33	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	10	0										
							<i>Rana dalmatina</i>	1	0										
							<i>Bufo bufo</i>	17	0										
							<i>Pelophylax</i> sp.	31	14										
							<i>Rana dalmatina</i>	1	0										
							Šabov Krug	pools	42°32.52'	19°09.84'	35	<i>Hyla arborea</i>	2	0					
												<i>Pelophylax</i> sp.	2	2					
												Štoj	meadow	40°54.42'	19°16.02'	1	<i>Bufo viridis</i>	4	0
																	<i>Hyla arborea</i>	5	1
							Virpazar	pools	41°54.44'	19°16.06'	1	<i>Hyla arborea</i>	32	0					
		<i>Lissotriton vulgaris</i>	1	0															
		<i>Pelophylax</i> sp.	1	0															
		drainage ditch	41°54.53'	19°16.33'	3	<i>Hyla arborea</i>						8	0						
						<i>Lissotriton vulgaris</i>		31	0										
						<i>Pelophylax</i> sp.		9	0										
						Vranjna		lake	42°16.32'	19°08.65'	20	<i>Pelophylax</i> sp.	3	1					
		river channel	42°16.70'	19°08.03'	20							<i>Pelophylax</i> sp.	33	8					
		Virpazar	lake	42°14.68'	19°05.40'	10	<i>Hyla arborea</i>	1	0										
							<i>Pelophylax</i> sp.	3	0										
			wetland	42°14.88'	19°05.40'	19	<i>Bufo bufo</i>	1	0										
							<i>Hyla arborea</i>	3	0										
							<i>Lissotriton vulgaris</i>	9	1										
							<i>Pelophylax</i> sp.	35	14										
<i>Rana dalmatina</i>	1	0																	

Correspondence

First survey of the pathogenic fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in wild and captive amphibians in the Czech Republic

VOJTECH BALÁŽ^{1,2}, MILIČ SOLSKÝ³, DAVID LASTRA GONZÁLEZ³, BARBORA HAVLÍKOVÁ³, JUAN GALLEGU ZAMORANO³, CRISTINA GONZÁLEZ SEVILLEJA³, LAURA TORRENT³ & JIŘÍ VOJAR³

¹) Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

²) Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

³) Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic

Corresponding author: Jiří VOJAR, e-mail: vojar@fzp.czu.cz

Manuscript received: 8 June 2017

Accepted: 27 July 2017 by JÖRN KÖHLER

The recently discovered fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* (MARTEL et al. 2013) (hereinafter referred to as *Bsal*) has already received significant scientific and public attention (e.g., MARTEL et al. 2014, VAN ROOIJ et al. 2015, YAP et al. 2015, STEGEN et al. 2017). The *Bsal* epidemic has so far been limited to European newts and salamanders found in the wild (Belgium, Germany and the Netherlands: MARTEL et al. 2013, SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2016) and in captive populations (Germany: SABINO-PINTO et al. 2015; United Kingdom: CUNNINGHAM et al. 2015). In the Netherlands, *Bsal* is responsible for the near extinction of wild fire salamander (*Salamandra salamandra*) populations (SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2013).

The Bern Convention Standing Committee has therefore announced Recommendation No. 176 on the prevention and control of the *Bsal* chytrid fungus. According to this recommendation, European countries should adopt measures that include establishment of monitoring programmes to control the possible further spread of the disease, especially in areas of high risk (e.g., areas near disease outbreaks), and develop emergency action plans that will allow prompt responses in case of *Bsal* occurrence (Council of Europe 2015).

The Czech Republic is a country with relatively high caudate species diversity (SILLERO et al. 2014) and shares a western border with Germany, a country with previously proven *Bsal* occurrence (SABINO-PINTO et al. 2015, SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2016). The country, and especially the capital city of Prague, has an active and sizeable community of exotic pet keepers and pet shops, and large

exotic pet fairs take place on a regular basis (HAVLÍKOVÁ et al. 2015). Furthermore, Prague and its surroundings are known to harbour wild populations of at least four native caudate species: fire salamander, smooth newt (*Lissotriton vulgaris*), alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*) and great crested newt (*Triturus cristatus*) (ŠŤASTNÝ et al. 2015). All four are susceptible to *Bsal*-induced mortality (MARTEL et al. 2013, 2014, CUNNINGHAM et al. 2015, SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2016, STEGEN et al. 2017). The surrounding areas of such large cities are likely to constitute areas of high risk for wild populations of native amphibians. For this reason, we selected Prague and its surroundings as the first focal area for *Bsal* surveillance efforts in wild populations of Czech caudate amphibians. Considering that *Bsal* is spread through the pet trade in caudates originating in Asia (MARTEL et al. 2014), we also focused on captive collections of caudate amphibians.

In total, 324 swab samples were tested for both *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) and *Bsal* presence and prevalence. In wild populations, 126 samples of three caudate species (fire salamanders, smooth newts and alpine newts) were collected at nine sites within Prague's urban area and its surroundings during autumn 2015 and spring 2016 (Table 1). Furthermore, we analysed samples from five captive collections, including those of four private breeders and Prague's zoological garden during the period 2015–2016. Within each collection, only subset of about two to four individuals were sampled from an aquarium. This *Bsal*-targeted sampling in captivity was extended by re-analysing samples of caudates from previous surveillance projects

Table 1. Numbers (No.) of individuals sampled within nine wild caudate populations in Prague and its surroundings. Date = date of sampling.

Locality name	Coordinates		Species	No.	Date
Podhořský potok, small stream, tributary of Vltava River	50.129947°N	14.404111°E	<i>Salamandra salamandra</i>	31	07.10.2015
Únětice, unnamed tributary of Únětický potok	50.144853°N	14.384502°E	<i>Salamandra salamandra</i>	25	15.10.2015
Levý Hradec, unnamed tributary of Vltava River	50.169883°N	14.377429°E	<i>Salamandra salamandra</i>	12	20.10.2015
Úholičky, unnamed tributary of Podmoráňský potok	50.170698°N	14.344784°E	<i>Salamandra salamandra</i>	8	09.11.2015
Lhotecký potok, tributary of Vltava River	49.956059°N	14.411423°E	<i>Salamandra salamandra</i>	7	15.10.2015
Chalupecká strouha, near confluence with Zvolský potok	49.930541°N	14.390361°E	<i>Salamandra salamandra</i>	1	17.11.2015
Baně, unnamed tributary of Vltava River	49.961229°N	14.392828°E	<i>Salamandra salamandra</i>	2	17.11.2015
Ohrobecké údolí, unnamed tributary of Vltava River	49.943775°N	14.413338°E	<i>Salamandra salamandra</i>	10	21.10.2015
Botanická zahrada, artificial pond in botanic garden	50.070429°N	14.421077°E	<i>Lissotriton vulgaris</i>	28	01.07.2016
Botanická zahrada, artificial pond in botanic garden			<i>Ichthyosaura alpestris</i>	2	01.07.2016

searching for *Bd* presence in captive amphibians (HAVLÍKOVÁ et al. 2015), including 18 individuals of the largest amphibian species, the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*), reared in Prague's zoological garden. In total, 198 samples of 60 caudate (sub)species were analysed in captive collections (Table 2).

Sampling and DNA extraction were performed according to procedures used in amphibian chytridiomycosis research (BOYLE et al. 2004). The first sample subset, consisting of 98 wild and 56 captive samples, was checked for *Bsal* presence by SYBRGreen quantitative polymerase chain reaction (qPCR) following the method described in BLOOI et al. (2013) as one possible detection option. Bovine serum albumin (BSA) was added to reduce PCR inhibition (GARLAND et al. 2010). The identity of amplified DNA was checked by melt curve analysis and compared to results for genomic standards of *Bsal* provided by An Martel (Ghent University). We later adopted the duplex *Bd+Bsal* qPCR (BLOOI et al. 2013) and used it for additional samples. In this assay, we used genomic standards of *Bd* equivalent to 0.1, 1, 10 and 100 zoospores per 5 µl (strain IA042, Ibon Acherito, Pyrenees, 2004) obtained from the Institute of Zoology, Zoological Society of London. A single quantity sample of *Bsal* genomic DNA was used as a positive control. If any sample showed fluorescence growth in the wavelength of the *Bsal* probe, it would be re-analysed with the full set of *Bsal* standards. In this way, we slightly reduced the cost of analysis. In both detection assays, we used duplicates of all analysed samples, standards, as well as positive and negative controls.

All tested samples yielded negative results for the presence of *Bsal*. *Bd* was detected in three individuals of wild smooth newts and in one reared ribbed newt (*Pleurodeles waltl*) in a captive collection, albeit with no visible signs of the chytridiomycosis. Low *Bd* prevalence in caudates corresponds well with our previous findings in Czech captive collections (HAVLÍKOVÁ et al. 2015), and wild populations of caudates in Central and east Europe (BALÁŽ et al. 2014a,b, VOJAR et al. 2017).

The 0% *Bsal* prevalence in wild caudates has Sterne-Wald 99% confidence limits of 0.0–4.2%, while in the case of sam-

ples from captivity the 99% confidence limits are 0.0–2.6% (RÓZSA et al. 2000). This does not directly mean that *Bsal* is not present in the Czech Republic. Because the disease outbreaks can occur at very low host densities in wild populations (SCHMIDT et al. 2017), all host populations of susceptible European caudate species (MARTEL et al. 2014) are at risk from *Bsal* (SCHMIDT et al. 2017). In the case of asymptomatic Asian caudates in captive collections, infection may be present in such small prevalence (MARTEL et al. 2014, LAKING et al. 2017) that our sampling was not sufficient. On the other hand, because the intensive sampling of wild fire salamanders covered nearly all localities within Prague where the species presently is known to occur (ŠTASTNÝ et al. 2015) and no sampled individual exhibited visible disease symptoms, we conclude that *Bsal* probably has not invaded Prague's fire salamander population, at least for now. Similar results of pathogen absence have been found in studies focused on fire salamanders in Austria (GIMENO et al. 2015), eastern hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis*) in the U.S. (BALES et al. 2015), Japanese giant salamanders (*Andrias japonicus*) in Japan (BLETZ et al. 2017a), Chinese amphibians (ZHU et al. 2014), five species of newts and fire salamanders in most of tested localities in Belgium, Germany and the Netherlands (SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2016), alpine newts, smooth newts and great crested newts in Germany (BLETZ et al. 2017b), and in a study by PARROT et al. (2016) on 17 caudate species across three continents.

We used two available detection assays in our study, both based on DNA amplification with the same pair of *Bsal* primers (BLOOI et al. 2013) and differing only in the detection format of the amplicon. The SYBR Green qPCR assay often produced detectable fluorescence growth of nonspecific products, thus complicating interpretation of the results. In several cases, we ran standard PCR followed by gel electrophoresis with samples of equivocal results to confirm the identity of PCR products. Our results indicated a mean melting temperature (T_m) for *Bsal* standards of 77.21°C (SD = 0.29), which differs slightly from the published value of 75.5°C (BLOOI et al. 2013). For monitoring *Bsal* presence in wild and captive amphibians, we later adopted and recommend the use of duplex *Bd+Bsal* qPCR,

Table 2. List of surveyed species and numbers (No.) of individuals sampled in captivity.

Species	No.	Species	No.
<i>Ambystoma mexicanum</i>	3	<i>Neurergus deryugina deryugina</i>	2
<i>Ambystoma tigrinum</i>	2	<i>Neurergus strauchii barani</i>	3
<i>Andrias davidianus</i>	18	<i>Neurergus strauchii strauchii</i>	3
<i>Calotriton asper</i>	3	<i>Ommatotriton ophryticus nesterovi</i>	3
<i>Cynops ensicauda ensicauda</i>	3	<i>Pachyhynobius shangchengensis</i>	1
<i>Cynops ensicauda popei</i>	4	<i>Pachytriton</i> sp.	2
<i>Cynops orientalis</i>	1	<i>Paramesotriton caudopunctatus</i>	7
<i>Cynops pyrrhogaster</i>	3	<i>Paramesotriton deloustali</i>	6
<i>Cynops pyrrhogaster</i> “Kanagawa”	6	<i>Paramesotriton guangxiensis</i>	4
<i>Cynops pyrrhogaster</i> “Yubana”	2	<i>Paramesotriton hongkongensis</i>	3
<i>Euproctus platycephalus</i>	2	<i>Paramesotriton chinensis</i>	12
<i>Hynobius dunni</i>	1	<i>Paramesotriton</i> sp. “helm”	1
<i>Hynobius leechii</i>	2	<i>Paramesotriton</i> sp. “red”	6
<i>Hynobius lichenatus</i>	1	<i>Paramesotriton yunwensis</i>	2
<i>Hynobius quelpartensis</i>	2	<i>Pleurodeles nebulosus</i>	2
<i>Hynobius retardatus</i>	2	<i>Pleurodeles walzl</i>	4
<i>Hypselotriton cyanurus</i>	2	<i>Salamandra algira tingitana</i>	2
<i>Hypselotriton cyanurus cyanurus</i>	2	<i>Siren intermedia</i>	1
<i>Hypselotriton chenggongensis</i>	3	<i>Triturus anatolicus</i>	2
<i>Hypselotriton orientalis</i>	1	<i>Triturus blasii</i>	3
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	3	<i>Triturus carnifex</i>	9
<i>Laotriton laoensis</i>	3	<i>Triturus cristatus</i>	2
<i>Lissotriton boscai</i>	3	<i>Triturus dobrogicus dobrogicus</i>	2
<i>Lissotriton graecus</i>	3	<i>Triturus dobrogicus macrosoma</i>	3
<i>Lissotriton helveticus</i>	3	<i>Triturus ivanbureschi</i>	1
<i>Lissotriton italicus</i>	3	<i>Triturus karelinii</i>	2
<i>Lissotriton malcani</i>	3	<i>Triturus macedonicus</i>	10
<i>Lissotriton meridionalis</i>	3	<i>Triturus marmoratus</i>	2
<i>Lissotriton montandoni</i>	3	<i>Triturus pygmaeus</i>	3
<i>Neurergus crocatus complex</i>	3	<i>Tylotriton shanjing</i>	2

which is designed specifically to detect either of the pathogen species (BLOOI et al. 2013). The higher cost of analyses versus using fluorescent probes is counterbalanced by clearer and more specific results.


As not only newts, but also infected anurans and even waterfowl via scales on their feet, may promote fungal spread over large spatial distances (STEGEN et al. 2017), the spread of this emerging pathogen is difficult to predict, and we can expect the distribution of *Bsal* to change considerably over time. The risk that new points of entry for *Bsal* into Europe will occur via the pet trade is a constant threat that can be alleviated by collaboration among pet owners, the pet trade, veterinary authorities, and conservationists (SABINO-PINTO et al. 2015). It is essential to prevent this pathogen entering the wild amphibian populations (CUNNINGHAM et al. 2015), because there is no effective method to reduce the impact of chytridiomycosis in the field (GARNER et al. 2016). Therefore, our next planned steps in the Czech Republic include establishment and issue of biosecurity guidelines for owners of caudates, providing *Bsal*

detection in captive collections of amphibians, forming a network of continuously monitored localities in proximity to larger cities, and preparing an action plan in case of *Bsal* occurrence in collaboration with the Nature Conservation Agency of the Czech Republic, the State Veterinary Authority, and the Czech Ministry of Environment.

Acknowledgements

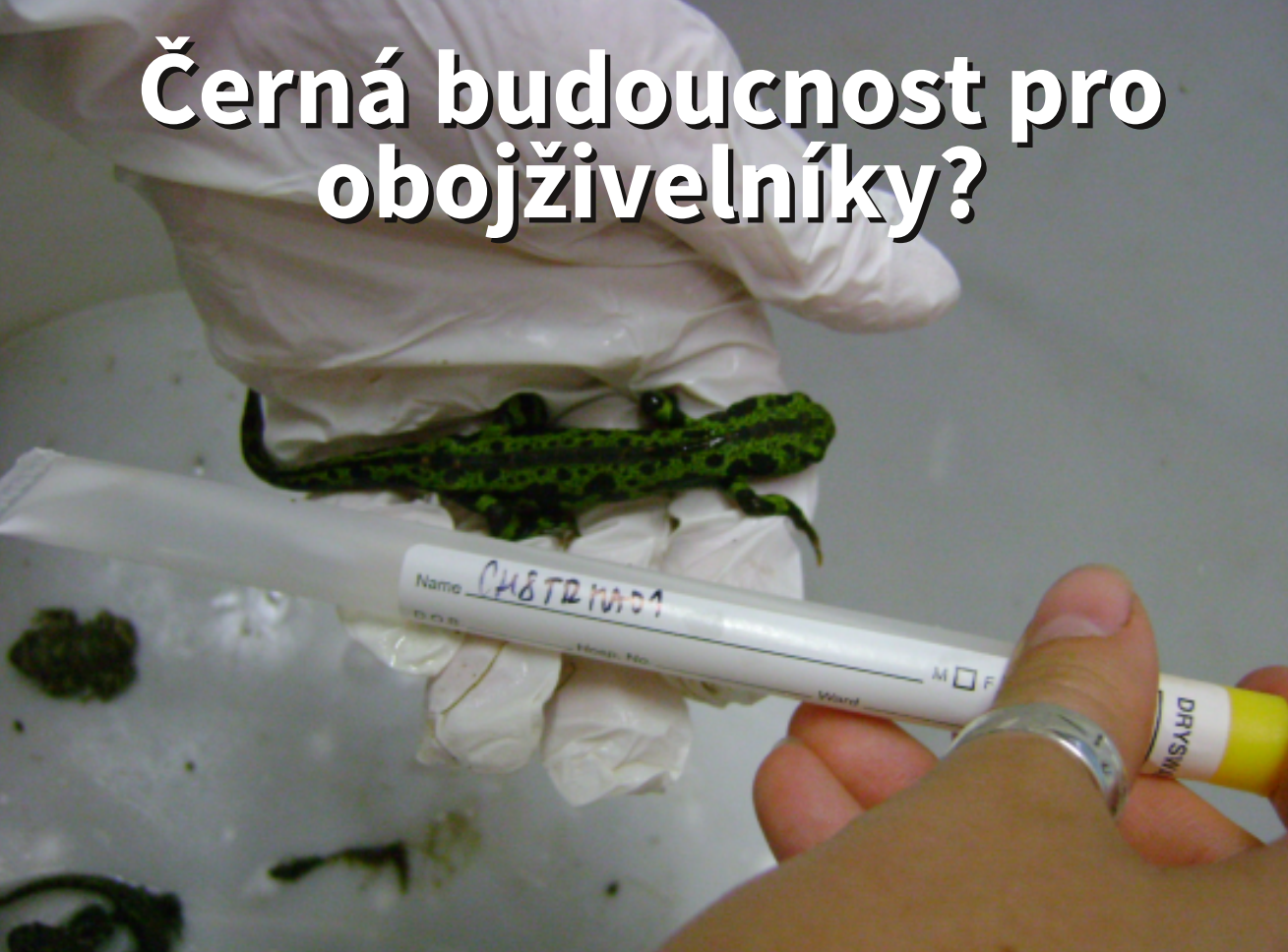
We thank A. MARTEL from Ghent University for providing the genomic standards for *Bsal*, T. GARNER from the Institute of Zoology, Zoological Society of London, for providing the genomic standards for *Bd*, and G. A. KIRKING for useful comments on the manuscript. We also thank all those zookeepers, institutions, private amphibian breeders, and pet shop sellers who cooperated voluntarily and provided amphibians for sampling. The study was supported by the Czech Ministry of Environment and by the University of Life Sciences Prague (grant no. 20164245). The field work was performed on the basis of permission awarded by the Nature Conservation Agency of the Czech Republic.

References

- BALÁŽ, V., J. VOJAR, P. CIVIŠ, M. ŠANDERA & R. ROZÍNEK (2014a): Chytridiomycosis risk among Central European amphibians based on surveillance data. – *Diseases of Aquatic Organisms*, **112**: 1–8.
- BALÁŽ, V., J. VÖRÖS, P. CIVIŠ, J. VOJAR, A. HETTYEY, E. SÓS, R. DANKOVICS, R. JEHL, D. G. CHRISTIANSEN, F. CLARE, M. C. FISHER, T. J. W. GARNER & J. BIELBY (2014b): Assessing risk and guidance on monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through identification of taxonomic selectivity of infection. – *Conservation Biology*, **28**: 213–223.
- BALES, E. K., O. J. HYMAN, A. H. LOUDON, R. N. HARRIS, G. LIPPS, E. CHAPMAN, K. ROBLEE, J. D. KLEOPFER & K. A. TERRELL (2015): Pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, but not *B. salamandrivorans*, detected on eastern hellbenders. – *PLoS ONE*, **10**: e0116405.
- BLETZ, M. C., M. VENCES, J. SABINO-PINTO, Y. TAGUCHI, N. SHIMIZU, K. NISHIKAWA & A. KURABAYASHI (2017a): Cutaneous microbiota of the Japanese giant salamander (*Andrias japonicus*), a representative of an ancient amphibian clade. – *Hydrobiologia*, **795**: 153–167.
- BLETZ, M. C., R. G. B. PERL, B. T. C. BOBOWSKI, L. M. JAPKE, C. C. TEBBE, A. B. DOHRMANN, S. BHUJU, R. GEFFERS, M. JAREK & M. VENCES (2017b): Amphibian skin microbiota exhibits temporal variation in community structure but stability of predicted *Bd*-inhibitory function. – *The ISME Journal*, **11**: 1521–1534.
- BLOOI, M., F. PASMANS, J. E. LONGCORE, A. SPITZEN-VAN DER SLUIJS, F. VERCAMMEN & A. MARTEL (2013): Duplex Real-Time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. – *Journal of Clinical Microbiology*, **51**: 4173–4177.
- BOYLE, D. G., D. B. BOYLE, V. OLSEN, J. A. MORGAN & A. D. HYATT (2004): Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. – *Diseases of Aquatic Organisms*, **60**: 141–148.
- Council of Europe (2015).  Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats, 35th meeting, 1–4 Dec. 2015, Strasbourg, France. – Recommendation No. 176 (2015) on the prevention and control of the *Batrachochytrium salamandrivorans* chytrid fungus. [accessed 23 March 2017]
- CUNNINGHAM, A. A., K. BECKMANN, M. PERKINS, L. FITZPATRICK, R. CROMIE, J. REDBOND, M. F. O'BRIEN, P. GHOSH, J. SHELTON & M. C. FISHER (2015): Emerging disease in UK amphibians. – *Veterinary Record*, **176**: 468.
- GARLAND, S., A. BAKER, A. D. PHILLOTT & L. F. SKERRATT (2010): BSA reduces inhibition in a TaqMan® assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. – *Diseases of Aquatic Organisms*, **92**: 113–116.
- GARNER, T. W. J., B. R. SCHMIDT, A. MARTEL, F. PASMANS, E. MUTHS, A. A. CUNNINGHAM, C. WELDON, M. C. FISHER & J. BOSCH (2016): Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. – *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **371**: 20160207.
- GIMENO, A., M. MEIKL, A. PITT, M. WINKLER & U. G. BERNINGER (2015): Testing of Fire Salamanders around Salzburg for *Batrachochytrium salamandrivorans* within a school project. – *Journal on Protected Mountain Areas Research*, **7**: 72–76.
- HAVLÍKOVÁ, B., J. VOJAR & V. BALÁŽ (2015): First systematic monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in collections of captive amphibians in the Czech Republic. – *Amphibia-Reptilia*, **36**: 27–35.
- LAKING, A. E., H. N. NGO, F. PASMANS, A. MARTEL & T. T. NGUYEN (2017): *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. – *Scientific Reports*, **7**: 44443.
- MARTEL, A., A. SPITZEN-VAN DER SLUIJS, M. BLOOI, W. BERT, R. DUCATELLE, M. C. FISHER, A. WOELTJES, W. BOSMAN, K. CHIERS, F. BOSSUYT & F. PASMANS (2013): *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **110**: 15325–15329.
- MARTEL, A., M. BLOOI, C. ADRIAENSEN, P. VAN ROOIJ, W. BEUKEMA, M. C. FISHER, R. A. FARRER, B. R. SCHMIDT, U. TOBLER, K. GOKA, K. R. LIPS, C. MULETZ, K. R. ZAMUDIO, J. BOSCH, S. LÖTTERS, E. WOMBWELL, T. W. J. GARNER, A. A. CUNNINGHAM, A. SPITZEN-VAN DER SLUIJS, S. SALVIDIO, R. DUCATELLE, K. NISHIKAWA, T. T. NGUYEN, J. E. KOLBY, I. VAN BOCXLAER, F. BOSSUYT & F. PASMANS (2014): Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. – *Science*, **346** (6209): 630–631.
- PARROTT, J. C., A. SHEPACK, D. BURKART, B. LABUMBARD, P. SCIME, E. BARUCH & A. CATENAZZI (2016): Survey of pathogenic chytrid fungi (*Batrachochytrium dendrobatidis* and *B. salamandrivorans*) in salamanders from three mountain ranges in Europe and the Americas. – *Ecohealth*, **14**: 296–302.
- RÓZSA, L., J. REICZIGEL & G. MAJOROS (2000): Quantifying parasites in samples of hosts. – *Journal of Parasitology*, **86**: 228–232.
- SABINO-PINTO, J., M. BLETZ, R. HENDRIX, R. G. B. PERL, A. MARTEL, F. PASMANS, S. LÖTTERS, F. MUTSCHMANN, B. R. SCHMIDT, D. S. SCHMELLER, M. VEITH, N. WAGNER, M. VENCES & S. STEINFARTZ (2015): First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Germany. – *Amphibia-Reptilia*, **36**: 411–416.
- SCHMIDT, B. R., C. BOZZUTO, S. LÖTTERS & S. STEINFARTZ (2017): Dynamics of host populations affected by the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans*. – *Royal Society Open Science*, **4**: 160801.
- SILLERO, N., J. CAMPOS, A. BONARDI, C. CORTI, R. CREEMERS, P. A. CROCHET, J. CRNOBRNJA-ISAILOVIC, M. DENOËL, G. F. FICETOLA, J. GONÇALVES, S. KUZMIN, P. LYMBERAKIS, P. DE POUS, A. RODRÍGUEZ, R. SINDACO, J. SPEYBROECK, B. TOXOPEUS, D. R. VIEITES & M. VENCES (2014): Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. – *Amphibia-Reptilia*, **35**: 1–31.
- SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A., A. MARTEL, J. ASSELBERGHS, E. K. BALES, W. BEUKEMA, M. C. BLETZ, L. DALBECK, E. GOVERSE, A. KERRES, T. KINET, K. KIRST, A. LAUDELOUT, L. F. MARIN DA FONTE, A. NÖLLERT, D. OHLHOFF, J. SABINO-PINTO, B. R. SCHMIDT, J. SPEYBROECK, F. SPIKMANS, S. STEINFARTZ, M. VEITH, M. VENCES, N. WAGNER, F. PASMANS & S. LÖTTERS (2016): Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. – *Emerging Infectious Diseases*, **22**: 1286–1288.
- SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A., F. SPIKMANS, W. BOSMAN, M. DE ZEEUW, T. VAN DER MEIJ, E. GOVERSE, M. KIK, F. PASMANS & A. MARTEL (2013): Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. – *Amphibia-Reptilia*, **34**: 233–239.

- STEGEN, G., F. PASMANS, B. R. SCHMIDT, L. O. ROUFFAER, S. VAN PRAET, M. SCHAUB, S. CANESSA, A. LAUDELLOT, T. KINET, C. ADRIAENSEN, F. HAESEBROUCK, W. BERT, F. BOSSUYT & A. MARTEL (2017): Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. – *Nature*, **544**: 353–356.
- ŠŤASTNÝ, K., J. ČERVENÝ, J. ROM, M. SOLSKÝ, L. HANEL, J. ANDRESKA, J. VOJAR & K. KEROUŠ (2015): Prague. – pp. 119–153 in: KELCEY, J. G. (ed.): *Vertebrates and Invertebrates of European Cities: Selected Non-Avian Fauna*. – Springer, New York.
- VAN ROOIJ, P., A. MARTEL, F. HAESEBROUCK & F. PASMANS (2015): Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. – *Veterinary Research*, **46**: 137.
- VOJAR J., B. HAVLÍKOVÁ, M. SOLSKÝ, D. JABLONSKI, V. IKOVIĆ & V. BALÁŽ (2017): Distribution, prevalence and amphibian hosts of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Balkans. – *Salamandra*, **53**: 44–49.
- YAP, T. A., M. S. KOO, R. F. AMBROSE, D. WAKE & V. T. VREDENBURG (2015): Averting a North American biodiversity crisis. – *Science*, **349**(6247): 481–482.
- ZHU, W., F. XU, C. BAI, X. LIU, S. WANG, X. GAO, S. YAN, X. LI, Z. LIU & Y. LI (2014): A survey for *Batrachochytrium salamandrivorans* in Chinese amphibians. – *Current Zoology*, **60**: 729–735.

Černá budoucnost pro obojživelníky?



Triturus marmoratus

Text a foto: Barbora Havlíková

Za všechno může člověk...

Často opomíjený obojživelníci mají v lidské společnosti nezastupitelné místo. Jelikož jejich potrava zahrnuje převážně hmyz, mohou např. regulovat populace moskytů přenášejících malárii a snižovat populace hmyzu škodícího zemědělcům.^{1,2} Jsou nedílnou součástí ekosystému, v němž fungují jako predátoři i kořist, pulci mnoha druhů jsou důležitými herbivory, filtrátory vody a bioindikátory.² Nejen z těchto důvodů je velmi alarmující celosvětový úbytek obojživelníků. Už od roku 1970 pozorovali vědci náhlý pokles populací volně žijících obojživelníků a úplné vymizení některých druhů.^{3,4,5} Téměř jedna třetina světových druhů obojživelníků (celkem 7,234 druhů obojživelníků k 17. 01. 2014) je ohrožena vyhynutím.⁶ Ztráty biotopů a znečištění životního prostředí se zřejmě podílí na ubývání obojživelníků v nejvyšší míře, nicméně pandemie plísňového onemocnění – chytridiomykózy se rovněž stává celosvětovým problémem.⁷ Plíseň *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) způsobující chytridiomykózu je z hlediska počtu zasažených druhů obojživelníků považována za nejhorší

globálně rozšířený patogen.⁸

Bd vyvolává nadměrné rohovatění kůže, čímž může vážně poškodit kožní dýchání, vstřebávání vody a osmoregulaci.^{9,10} Poškození kožních funkcí může být u mnoha druhů fatální. Nespecifickými projevy chytridiomykózy jsou strnulost v nepřírozené poloze, letargie, nechutenství, ztráta přirozených reflexů a motoriky.^{10,11,12} K šíření choroby přispívá zejména člověk umělými transporty obojživelníků do nových oblastí, přepravou mezi zoologickými zahradami, únikem zvířat z chovných farem a mezinárodním obchodem s obojživelníky k potravinovému, vědeckému a chovatelskému účelům.^{13,14}

„Pod lupou“

V červnu 2012 byl zahájen systematický monitoring původce chytridiomykózy zaměřený na zoologické zahrady, herpetologické stanice, prodejny se zvířaty a soukromé chovatele s cílem zmapovat míru nákazy a zabránit jejímu šíření. Vzorky byly odebírány nedestruktivní metodou kožních stěrů speciálními výtěrkami. Z každého terária bylo

- Bezobratlí
- Ještěři
- Hadi
- Obojživelníci**
- Želvy
- Cestopis
- Chov
- Systematika
- Reportáž



Rana sp. Indie

odchyceno 3 – 5 jedinců stejného druhu, u kterých byl proveden stěr z břicha, boků, vnitřní strany stehen a blan mezi prsty zadních nohou.

S obojživelníky bylo manipulováno velmi šetrně za použití jednorázových gumových rukavic, které byly měněny při každém kontaktu s novým jedincem, aby se zabránilo možné nákaze mezi obojživelníky. Vzorky byly následně analyzovány velmi citlivou a specifickou metodou kvantifikační Real-Time PCR na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. Kromě přímého kontaktu mezi obojživelníky se nákaza šíří i kontaminovanou vodou obsahující zoospory *Bd*.¹⁵ U akvatických druhů (např. *Xenopus laevis*, *Ambystoma mexicanum*) byla letos nově provedena detekce patogenu *Bd* přímo ze vzorků vody, ve které se daný obojživelník nacházel. Vzorky vody byly analyzovány standardní PCR na České zemědělské univerzitě v Praze. Během výzkumu

bylo odebráno přes 600 vzorků od 118 druhů obojživelníků. Z výsledků zatím vyplývá, že se patogen *Bd* v chovech vyskytuje převážně ve formě mírných asymptomatických infekcí, ale objevily se i případy akutních onemocnění včetně úhynů. Výskyt plísňe byl potvrzen u necelých 5 % zkoumaných jedinců ve všech typech umělých chovů, často u druhů vzácných a drahých. Počet nakažených sice není nijak alarmující, nicméně již samotné potvrzení výskytu *Bd* v chovech nesmíme brát na lehkou váhu. Jediný nakažený obojživelník může způsobit zdecimování celého chovu.

Léčba

V případě zaznamenané nákazy se doporučuje léčba zvýšením teploty nad 29 °C po dobu jednoho týdne.^{16,17} To ovšem platí pouze u druhů, které tyto



Phyllobates terribilis

- Bezobratlí
- Ještěři
- Hadi
- Obojživelníci**
- Želvy
- Cestopis
- Chov
- Systematika
- Reportáž



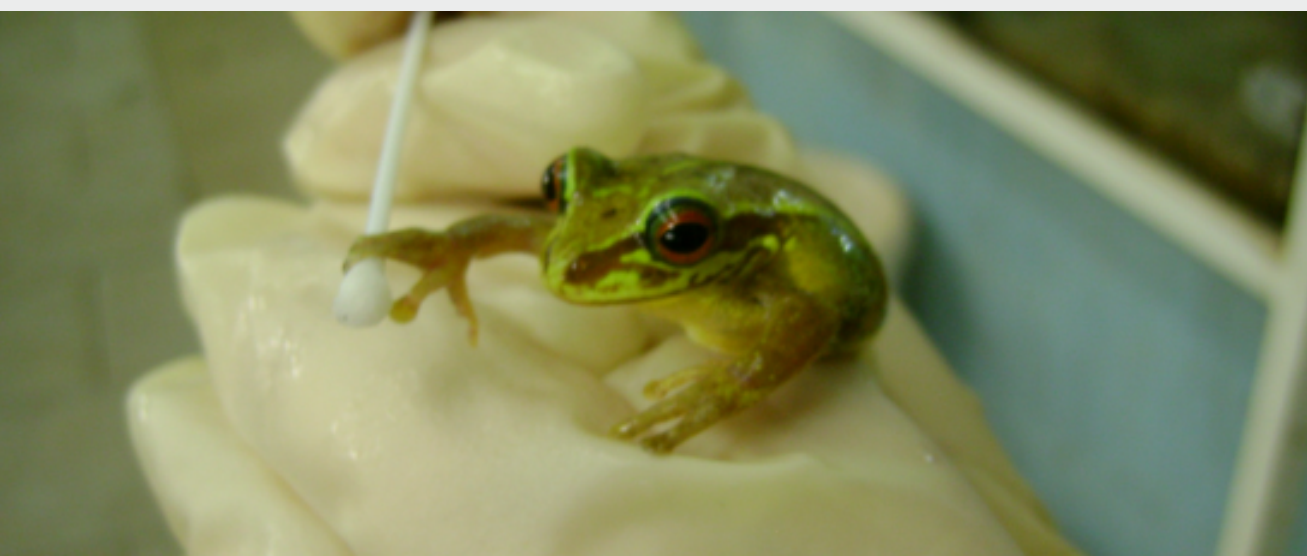
Neurergus kaiserii

podmínky snášejí (druhy z teplých oblastí, druhy s denní aktivitou, heliofilní druhy). U druhů nesnášejících vysoké teploty, při akutních nálezích, nebo pokud už dochází k úhynům, se doporučuje léčba itraconazolem (např. Sporanox® sirup, Janssen Cilag S.p.A., Beerse, Belgie) při koncentraci účinné látky 0.01 %. U akvatických druhů se roztok itraconazolu aplikuje do akvária, nechá se 30 min. působit a opakuje se každý pátý den ve čtyřech cyklech léčby. U terestrických druhů se používají jednorázové kelímky s roztokem léčiva, kam se obojživelník vkládá na 5 min. 11 dní po sobě.¹⁸ Během léčby je nutné dodržovat přísná hygienická a karanténní opatření. Vzhledem k rozdílné citlivosti u jednotlivých druhů a momentální intenzitě zoospor *Bd* nemusí být léčba vždy úspěšná.

Naděje umírá poslední

Chov v zajetí může hrát klíčovou roli při omezování dopadu chytridiomykózy na volně žijící populace obojživelníků.¹⁹ Důležitým cílem profesionálního

chovu obojživelníků v zajetí je možnost poskytnutí zdrojů nových jedinců pro reintrodukcii a vytvoření odolných a zdravých populací, které podpoří ty stávající.²⁰ Je proto nezbytné nadále pokračovat v monitoringu, určit distribuci onemocnění a zajistit kontrolu a ochranu zdravých chovů. Přestože existují spolehlivé metody k testování a rychlé detekci patogenu *Bd*, diagnostická vyšetření nejsou běžnou praxí většiny světových ani tuzemských zoologických zahrad.²¹ Ani legislativa zemí zapojujících se do mezinárodního obchodu s obojživelníky nestanovuje povinné vyšetření zvířat vůči tomuto patogenu. S největší pravděpodobností se tak bude nemoc šířit do dalších oblastí. Obojživelníci odchycení z volné přírody mohou způsobit epidemii v zavedených chovech.²² Vypuštění infikovaných zvířat z umělých chovů může být naopak fatální pro volně žijící populace. Účinné vnitrostátní a mezinárodní karanténní a kontrolní postupy jsou asi jediným efektivním způsobem zabraňujícím šíření chytridiomykózy.²² Čím dříve se provede diagnostika u podezřelých jedinců, tím dříve se může zahájit vhodná léčba a



Litoria thesaurensis

zvyšuje se tak naděje na uzdravení nakažených jedinců, případně celých chovů. Globalizace bez adekvátní karantény, dozoru a antiparazitních programů bude mít za následek vznik dalších

ohnisek nákazy, což povede ke ztrátě biodiverzity.²³ Záchranné programy a schopní chovatelé jsou tak možná poslední nadějí pro mnoho vzácných obojživelníků ohrožených vyhynutím.



Litoria caerulea



Laotriton laeensis

Literatura:

- ¹Cohen M. M. 2001: Frog Decline, Frog Malformations, and a Comparison of Frog and Human Health. *American Journal of Medical Genetics* 104: 101-109.
- ²Mendelson J. R., Lips K. R., Gagliardo R. W., Rabb G. B., Collins J. P. et al. 2006: Confronting Amphibian Declines and Extinctions, *Science* 313.
- ³Blaustein, A. R., Kiesecker, J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 2002; 5: 597-60.
- ⁴Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., Waller, R. W. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 2004; 306: 1783.
- ⁵Mendelson, J. R., Lips, K. R., Gagliardo, R. W., et al. Confronting Amphibian Declines and Extinctions. *Science* 2006; 313.
- ⁶<http://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html>.
- ⁷Baillie, J. E. M., Hilton-Taylor, C., Stuart, S. N. 2004 IUCN Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 2004.
- ⁸<http://irceb.asu.edu/amphibians/pdf/ACAP%20Summit%20Declaration.pdf>, Amphibian Conservation Summit 2005, 17-19 September, Washington DC, 2005.
- ⁹Berger, L., Speare, R., Daszak, P., et al. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1998; 95: 9031-9036.
- ¹⁰Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E., Speare, R. Emerging infectious disease and amphibian population declines. *Emerging infectious disease* 1999; 5(6): 735-748.
- ¹¹Pessier, A. P., Nichols, D. K., Longcore, J. E., Fuller, M. S. Cutaneous Chytridiomycosis in Poison Dart Frogs (*Dendrobates* spp.) and White's Tree Frogs (*Litoria Caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999; 11: 194.
- ¹²Boyle, D. G., Hyatt, A. D., Daszak, P., et al. Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes. *Diseases of aquatic organisms* 2003; 56: 59-64.
- ¹³Weldon, C., du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., Speare, R. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10(12): 2100-2105.
- ¹⁴Garner, T. W. J., Perkins, M. W., Govindarajulu, P., et al. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters* 2006; 2(3): 455-459.
- ¹⁵Daszak P., Cunningham A., Hyatt A. 2000: Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science*, 287: 443-9.
- ¹⁶Longcore, J. E., Pessier, A. P., Nichols, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 1999: 91: 219-227.
- ¹⁷Piotrowski, J. S., Annis, S. L., Longcore, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 2004; 96: 9-15.
- ¹⁸Forzan, M. J., Gunn, H., Scott, P. Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment, and kontrol. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2008; 39(3): 406-411.
- ¹⁹<http://environment.gov.au/biodiversity/threatened/publications/tap/chytrid/index.html>. Department of the Environment and Heritage 2006: Threat abatement plan, Infection of amphibians with chytrid fungus resulting in chytridiomycosis, Commonwealth of Australia. 2006.
- ²⁰Frías-Alvarez, P., Vredenburg, V. T., Familiar-López, M. et al. Chytridiomycosis Survey in Wild and Captive Mexican Amphibians. *EcoHealth Journal Consortium* 2008; 5: 18-26.
- ²¹Peel, A. J., Hartley, M., Cunningham, A. A. Quantitative risk analysis of introducing *Batrachochytrium dendrobatidis* to the UK through the importation of live amphibians. *Diseases of aquatic organisms* 2012; 98: 95-112.
- ²²Nichols D. K., Pessier A. P., Longcore J. E. 1998: Cutaneous chytridiomycosis: an emerging disease? *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians* 269-271.
- ²³Skerratt, L. F., Berger, L., Speare, R. et al. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth Journal Consortium* 2007; 4: 125-134.

Tato studie byla podpořena vnitřním grantem FŽP ČZU v Praze - IGA 20124257

Klíčová slova: druhová pestrost, diverzita, abundance

Chytridiomykóza u obojživelníků chovaných v zajetí

Havlíková Barbora

Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, ČZU v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6;
e-mail: barahavlikova@seznam.cz

Chytridiomykóza je nejhorším zaznamenaným infekčním onemocněním u obojživelníků z hlediska počtu zasažených druhů a může vést až k jejich úplnému vyhytní. *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), patogen způsobující chytridiomykózu, vyvolává nadměrné rohovatění kůže, čímž může vážně poškodit kožní dýchání a osmoregulaci. Šíření choroby je způsobené především lidskou činností: introdukcí obojživelníků z domácích chovů, importem nakažených jedinců do zoologických zahrad, únikem zvířat z chovných farem a mezinárodním obchodem s obojživelníky. Chytridiomykóza je v České republice studována od roku 2008 u volně žijících populací domácích druhů. Tento projekt je zaměřen na obojživelníky chované v zajetí (zoologické zahrady, herpetologické stanice, teraristické prodejny a soukromí chovatelé). Vzorky byly odebírány nedestruktivní metodou pomocí stěrů z pokožky. Monitoring chytridiomykózy byl proveden v 7 zoologických zahradách (Brno, Dvůr Králové, Jihlava, Ohrada, Plzeň, Ústí nad Labem a Zlín) u 43 druhů a 148 jedinců. Dále byly vzorky odebírány v přírodovědecké stanici (15druhů, 30 jedinců), třech zverimexech (8 druhů, 24 jedinců) a u tří soukromých chovatelů (38 druhů, 105 jedinců). Detekce *Bd* patogenu se uskuteční pomocí Taqman real time qPCR, která kromě přítomnosti samotného patogenu odhalí i počet jednotlivých zoospor pomocí hodnoty GE (genomic equivalent). V případě pozitivních nálezů budou navržena hygienická preventivní opatření a bude provedena osvěta.

Klíčová slova: chytridiomykóza; *Batrachochytrium dendrobatidis*; obojživelníci; chov v zajetí.

Monitoring původce chytridiomykózy u obojživelníků chovaných v zajetí

Havlíková Barbora¹, Vojar Jiří¹, Baláž Vojtech²

¹Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, ČZU v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6; e-mail: havlikova@fzp.czu.cz; ²Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého tř. 1/3, 612 42, Brno; email: balazv@vfu.cz

Plíseň *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) je z hlediska počtu zasažených druhů obojživelníků považována za nejhorší globálně rozšířený patogen. Způsobuje kožní onemocnění - chytridiomykózu, při níž dochází k vážnému poškození kožních funkcí, což je u mnoha druhů fatální. K šíření choroby přispívá zejména člověk mezinárodním obchodem s obojživelníky k potravinovým, vědeckým a chovatelským účelům. V loňském roce (2012) byl zahájen systematický monitoring původce chytridiomykózy zaměřený na zoologické zahrady, herpetologické stanice, prodejny se zvířaty a soukromé chovatele, s cílem zmapovat míru nákazy a zabránit šíření onemocnění. Vzorky byly odebírány nedestruktivní metodou, tj. stěry z pokožky a následně analyzovány velmi citlivou a specifickou metodou kvantifikační Real-Time PCR na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. Kromě přímého kontaktu mezi obojživelníky se nákaza rovněž šíří kontaminovanou vodou obsahující zoospory *Bd*. U akvatických druhů (např. *Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltl*, *Ambystoma mexicanum*) byla proto nově provedena detekce patogenu *Bd* přímo ze vzorků vody, ve které se daný obojživelník nacházel. Analýza vzorků vody byla provedena metodou standardní PCR na České zemědělské univerzitě v Praze. Během výzkumu bylo odebráno 636 vzorků stěrů a 38 vzorků vody celkem od 44 druhů obojživelníků. Z výsledků vyplývá, že sledovaný patogen se v České republice v umělých chovech vyskytuje. Výskyt plísně byl zatím potvrzen u 31 jedinců převážně ve formě mírných asymptomatických infekcí, ale objevily se i případy akutních onemocnění. V případě zaznamenané nákazy byla navržena léčba pomocí léků na bázi itraconazolu, která byla většinou úspěšná. U zdravých jedinců byla doporučena druhově specifická hygienická preventivní opatření.

Klíčová slova: chytridiomykóza; *Batrachochytrium dendrobatidis*; obojživelníci; chov v zajetí.

Amphibian chytridiomycosis Symposium



Summary of *Batrachochytrium dendrobatidis* research in the Czech Republic in wild and captive amphibians during the last five years

Vojtěch BALÁŽ¹, Petr CVIŠ², Jiří VOJAR³, Martin SANDERA³, Jan MATĚJ⁴,
Barbora HAVLÍKOVÁ⁵, Roman ROZÍNEK⁵, Trenton GARNER⁶

¹ Department of Biology and Diseases of Wildlife, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 13, 61242 Brno, Czech Republic; balaz@vfu.cz

² Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 16521 Prague 6, Czech Republic

³ Museum of Nature Bohemian Paradise, Prachov 37, 50601 Jičín, Czech Republic

⁴ Karlovy Vary Museum, Nová louka 23, 36001 Karlovy Vary, Czech Republic

⁵ NaturaServis Ltd., Ricarova 66, 50301 Hradec Králové, Czech Republic

⁶ Institute of Zoology, Zoological Society of London, Regent's Park, London, NW1 4RY, United Kingdom

The Czech Republic is inhabited by 13 anuran and 8 caudate species, thus having the richest batrachofauna in Central and Eastern Europe. All native species are protected by law and many receive conservation attention. The exotic amphibians are common in both public and zoo collections. This context gives many opportunities, yet challenging environment for the *Batrachochytrium dendrobatidis* research.

The first effort to study *B. dendrobatidis* in the area was triggered by cooperation with the RACE (Risk Assessment of Chytridiomycosis to European Amphibian Biodiversity) in 2008. At the moment two Czech universities work in close collaboration on the topic and several nature conservation and research bodies are involved in field sampling.

Altogether 1562 samples from wild amphibians were collected between 2008 and 2012, allowing analyses of host specificity and bioclimatic modelling. The distribution of the pathogen in the Czech Republic appears to be almost general, but lowlands and warmer areas seem to be more suitable. The most commonly infected amphibians are from the genera *Pelophylax* and *Bombina* with subadult post-metamorphic individuals being in the greatest risk of acquiring the fungus. Individual cases of mortalities linked with high infection burdens detected by qPCR were observed in *Bombina variegata* and *Bufo viridis*, but several species showed the ability to lose the infection (*Bufo calamita*, *B. viridis*, *Bombina variegata*).

The preliminary results from exotic amphibians showed that over 100 species are found in Czech collections. Dataset of approximately 500 samples proved that cases of infection by *B. dendrobatidis* and fatal chytridiomycosis occur in small private collections as well as in zoos. Obtaining data from “pet trade” proved to be a challenging task, bringing very little data.

The Czech Republic is a great area for chytridiomycosis research and it allows unique comparisons between the present taxa, analysis of bio-geographic, bioclimatic and social context.

Environmental predation of *Batrachochytrium dendrobatidis* determines infection dynamics

M. BLOOT¹, D. S. SCHMELLER², A. MARTEL¹, T. W. J. GARNER³, M. C. FISHER⁴,
F. CLARE^{3,4}, A. LOYAU², F. PASMANS¹

¹ Department of Pathology, Bacteriology, and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Mellebeke, Belgium; mark.bloot@ugent.be

² UFZ—Helmholtz-Centre for Environmental Research, Department of Conservation Biology, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany

³ Institute of Zoology, Zoological Society of London, Regent's Park, London NW1 4RY, United Kingdom

⁴ Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London W2 1PG, United Kingdom

The occurrence pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) is not homogeneous at local and regional scales. Sites which seem appropriate and in vicinity to long-term infected sites, are not always colonized by *Bd*. We hypothesized that the presence of resident microorganisms that prey on *Bd* contributes to explain the observed pattern of *Bd* colonization. The aim of this study was to better understand the interactions of *Bd* with resident microbial communities, with a focus on the impact of microorganisms on *Bd* viability, infection probability and infection intensity in amphibian hosts.

Sites in the Pyrenean mountain range with known history of absence or presence of *Bd* were sampled. The decrease in *Bd* zoospore viability after exposure to the water samples was assessed using a method combining ethidium monoazide with real-time PCR₃. This method was also used to assess the effect of cultures of several freshwater microorganisms on *Bd* viability. Based on the results of these first experiments several microorganisms were selected for *Bd* zoospore ingestion experiments and for a *Bd* infection experiment with *Discoglossus scovazzi* tadpoles in the absence and presence of microorganisms.

We were able to show a significant correlation between the abundance of microorganisms and *Bd* zoospore persistence in the Pyrenean water samples. In pure culture, some but not all microorganisms were highly efficient in killing *Bd*. These highly effective species ingested *Bd* zoospores and prevented *Bd* colonization of tadpoles. In conclusion, environmental microorganisms dictate chytrid infection dynamics.

Původce chytridiomykózy obojživelníků potvrzen už i na Balkáně, je se čeho obávat?

BALÁŽ V. (1), SOLSKÝ M. (2), JABLONSKI D. (3), HAVLÍKOVÁ B. (2), VOJAR J. (2)

(1) Ústav ekologie a chorob zvířet, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie VFU, Brno; (2) Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, ČZU Praha; (3) Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Komenského univerzity, Bratislava

Středomořská oblast patří mezi světová centra současné biodiverzity. Zdejší poloostrovy plnily funkci glaciálních refugií a migračních cest, což se odráží v jejich dnešní druhové a fylogenetické diverzitě. Aktuální krize biodiverzity se projevuje obzvláště výrazně právě v oblastech s vysokou koncentrací druhů a pod největším extinkčním tlakem jsou obojživelníci. Na jejich úbytku se velkou mírou podílí nové choroby, globálně nejvýznamnější jsou chytridiomykóza a ranaviróza. Na jejich účet připadají masové úhyny a lokální extinkce několika druhů žab z Pyrenejského poloostrova. Postiženy byly i endemické druhy středomořských ostrovů a Apeninského poloostrova. Je proto překvapivé, že na Balkánu se chorobám obojživelníků dosud nevěnovala žádná pozornost.

Soubor 466 vzorků sbíraných v Černé Hoře, Albánii a Makedonii byl zpracován pomocí real-time qPCR na zjištění přítomnosti původce žabí chytridiomykózy – *Batrachochytrium dendrobatidis*. Pozitivní výsledek jsme zjistili u 5 z 11 testovaných druhů, celková relativní četnost pozitivních jedinců dosáhla 14% a patogen byl potvrzen na třetině vzorkovaných lokalit. Nejvyšší prevalenci jsme zaznamenali u skokanů rodu *Pelophylax*, nicméně infekce byla dále potvrzena u *Bombina variegata*, *Hyla arborea*, *Lissotriton vulgaris* a *Triturus macedonicus*. Zjištěné intenzity infekce se pohybovaly na nízké až střední úrovni a zvířata nevykazovala klinické příznaky nemoci. Tato situace odpovídá stavu ve střední Evropě. Některé linie *B. variegata* na Balkáně mohou vykazovat vyšší citlivost k chytridiomykóze, podobně jako *Bombina pachypus* v Apeninách nebo *Alytes obstetricans pertinax* ve španělském pohoří Guadarrama.

V rámci dalšího výzkumu budou mezi zjišťované patogeny přidány ranaviry a původce mločí chytridiomykózy *B. salamandrivorans*. Detekce budou prováděny přímo v terénu pomocí přenosného přístroje Genie II metodou LAMP.

Projekt byl podpořen grantem č. 20144269 Grantové agentury FŽP, ČZU v Praze.

(PŘEDNÁŠKA)

vrchov a najbližšieho okolia bolo dosiaľ získaných 2740 dokladov drobných cicavcov 30 druhov. Iba 10 % údajov pochádza z odchytu (12 lokalít). Väčšina dokladov (2453 ex.) pochádza zo zvyškov potravy sovy obyčajnej a výra. Do prehľadu sme zaradili aj druhy, u ktorých prežívanie recentných populácií nebolo potvrdené a je otázne (*): *Erinaceus roumanicus*, *Talpa europaea*, *S. araneus*, *S. minutus*, *S. alpinus*, *Neomys fodiens*, *N. anomalus*, *Crociodura suaveolens*, *Sciurus vulgaris*, *Eliomys quercinus**, *Dryomys nitedula*, *Glis glis*, *Muscardinus avellanarius*, *Sicista betulina**, *Mus musculus*, *Micromys minutus*, *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. uralensis*, *Rattus norvegicus*, *Cricetus cricetus**, *Clethrionomys glareolus*, *Ondatra zibethicus*, *Arvicola terrestris*, *Microtus subterraneus*, *M. taticus**, *M. arvalis*, *M. agrestis*, *Chionomys nivalis**. Faunu cicavcov územia charakterizujú druhy arboreálneho biómu mierneho pásma Európy (*Talpa*, genera *Sorex*, *Neomys*, *Dryomys*, *Glis*, *Muscardinus*, *Microtus*, *Clethrionomys*, *Apodemus* a tiež *Arvicola*). Druhy paleomontánne reprezentuje *Sorex alpinus*, boreomontánne *Sicista betulina*. Druhy nepôvodné a sledujúce činnosť človeka zasahujú do polôh s narušeným lesným pokryvom (*Ondatra*, *Crociodura*, *Micromys*, *M. arvalis*, *A. agrarius*, *A. uralensis*). Synantrópne druhy (*M. musculus*, *R. norvegicus*) osídľujú urbánne a suburbánne ekotopy. Ich vysoký podiel v materiáli vo vzorkách potravy sov poukazuje na to, že výri a sovy hniezdiace na Chočí získavajú časť potravy z odlesnených kotlín. Doklad chrčka z potravy sovy je paralela nálezov z Veľkej Fatry. Dnes sa tam chrček už nevyskytuje, zmizol po nástupe zapojeného listnatého lesa v strednom holocéne. Obdobný osud postihol *Ch. nivalis* a *M. taticus*, ako oreálne prvky naviazané na nelesné stanovišťa nad hornou hranicou lesa.

(POSTER)

Výzkum trojice nejzávažnějších patogenů obojživelníků v České republice

BALÁŽ V. (1), SOLSKÝ M. (2), JELÍNKOVÁ A. (1), HAVLÍKOVÁ B. (2), ROZÍNEK R. (3), VOJAR J. (2)

(1) Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VFU Brno; (2) Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, ČZU Praha; (3) NaturaServis s.r.o., Hradec Králové;

Krize biodiverzity obojživelníků zahrnující zmenšování areálů, úbytek populací až po vymírání druhů je dobře známý fenomén. Kromě destrukce biotopů mají na úbytku velkou roli infekční nemoci, které se šíří obchodem se živými zvířaty. Výzkum se zaměřuje na dosud méně probádané a neznámé patogeny. První tři místa důležitosti si dělí ranaviry a dva druhy rodu hub *Batrachochytrium* – *B. dendrobatidis* a *B. salamandrivorans*. Tyto tři patogeny lze detekovat pomocí real-time qPCR a přímo v terénu jsme začali využívat metodu LAMP.

B. dendrobatidis ve volné přírodě v ČR vykazuje stabilní výskyt bez zaznamenaných masových úhyňů nebo zdokumentovaného poklesu populací infikovaných druhů. Jen

příležitostně vede infekce ve volné přírodě k akutní smrtelné chytridiomykóze. V případě chovů exotických obojživelníků je výskyt *B. dendrobatidis* obdobně častý, u citlivých druhů jsme opakovaně zaznamenali úhyny.

Výzkum ranavirů u obojživelníků je teprve v začátcích, zpracovali jsme pouze 47 vzorků z úhynů z přírody a 41 vzorků ze zajetí. V obou skupinách jsme infekci zaznamenali v jednotlivých případech a s intenzitou na hranici citlivosti metody.

Za účelem detekce *B. salamandrivorans* jsme se zaměřili na nejrizikovější druhy na území Prahy. Zde se setkávají dva zásadní faktory šíření *B. salamandrivorans* - početná komunita chovatelů exotických obojživelníků v těsné blízkosti přírodních lokalit, které hostí populace volně žijících ocasatých. Vzorky jsme sbírali z volné přírody (*Salamandra salamandra*, 118 ks) a v zájmových chovech (28 druhů, 81ks). Výskyt *B. salamandrivorans* jsme v těchto vzorcích dosud nepotvrdily.

Velkou výzvou pro ochranu přírody bude připravit se na krizové scénáře propuknutí nákazy vysoce virulentním patogenem. Pro takovou situaci u nás zatím neexistuje možnost rychlé a efektivní reakce. V případě záznamu podezřelých jedinců nebo neobvyklých úhynů je nutné upozornit autoritu ochrany přírody a ideálně také autory tohoto příspěvku.

(PŘEDNÁŠKA)

Vliv nadmořské výšky na velikost těla u mrchožrouta *Silpha carinata* – lokální adaptace nebo fenotypová plasticita?

BARANOVSKÁ E., KNAPP M.

Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, ČZU Praha

Tělesná velikost patří mezi nejdůležitější znaky všech organismů, jelikož předurčuje další vlastnosti jedinců. Existuje několik geografických pravidel (např.: Bergmannovo nebo konverzní Bergmannovo pravidlo), které popisují proměnlivost velikosti těla vlivem zeměpisné šířky nebo nadmořské výšky. Avšak přesné mechanismy generující geografickou proměnlivost tělesné velikosti hmyzu, nejsou zcela známy. Pravděpodobně jedním z hlavních faktorů, který ovlivňuje velikost těla jedinců, je teplota prostředí. Teplota může přímo ovlivnit fenotyp jedince skrze fenotypovou plasticitu nebo může podmínit adaptace ke konkrétnímu teplotnímu režimu během evolučního času (evoluce průměrného fenotypu nebo teplotních reakčních norem). Hlavním cílem této studie je zjistit, zda geografická variabilita v tělesné velikosti u druhu *Silpha carinata* je zapříčiněna lokální adaptací nebo fenotypovou plasticitou. Druh *S. carinata* je znám značnou geografickou variabilitou ve velikosti těla. Jedinci z nížin dosahují větší tělesné velikosti než brouci z hor. To jsme zjistili i díky přeměření sbírkových exemplářů. Jedinci *S. carinata* ze dvou extrémních populací, jedna z nadmořské výšky 250 m n.m. a druhá z

Chytridiomykóza obojživelníků

Co je to chytridiomykóza?

- závažné infekční onemocnění kůže, způsobené akvatickou plísní *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)
- Bd vážně poškozuje funkce kůže (kožní dýchání)
- chytridiomykóza může vést k úhynům celých chovů

Jaké jsou projevy chytridiomykózy?

- kožní změny (rohovatění, bradavice, zmatření lesklé kůže např. u dendrobátek)
- strnulost v nepřírozené poloze
- letargie
- nechutenství nebo problém se zaměřením kořisti
- hubnutí
- ztráta přirozených reflexů
- ztráta motoriky

Šíření onemocnění

- přímým kontaktem mezi obojživelníky
- vodou
- substrátem



Jak zabránit nákaze, popř. jejímu šíření?

- při koupi nových jedinců dodržovat 14 denní karanténu
- před i po kontaktu s obojživelníkem dodržovat hygienu (mytí rukou, dezinfekce)
- pozorovat jakékoli změny kůže, chování, kondice

Co nabízíme?

- odběr vzorků stěry z kůže obojživelníků speciálními výtěrkami (neinvazivní metoda)
- bezplatná analýza vzorků citlivou metodou Real-Time PCR na Veterinární a farmaceutické univerzitě (VFU) v Brně
- v případě pozitivních nálezů poskytujeme rady ohledně léčby, karantény a prevence dle biologických vlastností konkrétních druhů
- v případě negativních nálezů vystavíme potvrzení z VFU v Brně

Kontakt

Máte-li dotazy, podezření na chytridiomykózu nebo zájem o provedení diagnostiky Vašich obojživelníků, kontaktujte nás na e-mailu: **chytrid@email.cz**.

Pro více informací navštivte chytrid.herp.cz.



Ve spolupráci s Českou zemědělskou univerzitou v Praze, Fakultou životního prostředí a Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně.

Chytridiomykóza obojživelníků

CHOVANÝCH V ZAJETÍ



Barbora Havlíková & Jaroslava Lipšová

Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, Česká zemědělská univerzita v Praze

Plíseň *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) je z hlediska počtu zasažených druhů nejvýznamnějším a v současné době globálně nejrozšířenějším patogenem obojživelníků. Způsobuje infekční onemocnění – chytridiomykózu, která může vést až k úplnému vyhynutí celých druhů. Téměř jedna třetina světových druhů obojživelníků je ohrožena vyhynutím. Chytridiomykóza se tak pro obojživelníky stala třetí největší hrozbou, hned po ztrátě biotopů a znečištění životního prostředí. *Bd* vyvolává nadměrné rohovatění kůže, čímž může vážně poškodit kožní dýchání, vstřebávání vody a osmoregulaci. Nespecifickými projevy chytridiomykózy jsou strnulost v nepřírozené poloze, letargie, nechutenství, anorexie, ztráta přirozených reflexů a motoriky.

ŠÍŘENÍ ONEMOCNĚNÍ

Šíření choroby je způsobené především lidskou činností:

- umělé transporty do nových oblastí
- přeprava mezi zoologickými zahradami
- únik zvířat z chovných farem
- mezinárodní obchod s obojživelníky k potravinovým, chovatelským a laboratorním účelům

Patogen *Bd* se pravděpodobně rozšířil po celém světě v šedesátých letech prostřednictvím obchodu s drápatkami (*Xenopus laevis*) používanými pro těhotenské testy.



CÍLE PROJEKTU

Tento projekt je zaměřený na monitoring chytridiomykózy v umělých chovech obojživelníků.

- odběr vzorků a detekce přítomnosti patogenu *Bd* u obojživelníků v různých typech umělých chovů: zoologické zahrady, herpetologické stanice, prodejny terarijních zvířat, soukromé chovy, apod.
- v případě pozitivních jedinců - navržení léčby s ohledem na jednotlivé druhy a navržení hygienických opatření zabráňujících dalšímu šíření patogenu.

METODIKA

Vzorkování bylo provedeno nedestruktivní metodou kožních stěrů speciálními výtěrkami. S obojživelníky bylo manipulováno velmi šetrně za použití jednorázových gumových rukavic, které byly měněny při každém kontaktu s novým jedincem, aby se zabránilo možné nákaze mezi obojživelníky. Detekce *Bd* patogenu byla provedena kvantifikační Real-Time PCR na Veterinární a farmaceutické univerzitě (VFU) v Brně.



VÝSLEDKY

Z téměř 500 pořízených stěrů vyplývá, že patogen *Bd* způsobující chytridiomykózu se v České Republice v umělých chovech vyskytuje. Plíseň *Bd* byla potvrzena u 24 jedinců ve všech typech chovů, často u vzácných a drahých druhů. Intenzita nákazy se pohybovala v rozmezí 0.4 - 9230.0 GE (GE = genomický ekvivalent, tj. počet jednotlivých zoospor ve vzorku), přičemž minimálně 7 jedinců uhynulo pravděpodobně následkem chytridiomykózy.

LÉČBA

U druhů snášejících vysoké teploty se doporučuje zvýšení nad 29 stupňů po dobu jednoho týdne. Při akutních nálezích nebo u druhů nesnášejících vysoké teploty se osvědčila léčba itraconazolem (sodium itraconazol). U akvatických druhů se aplikuje 0.01% roztok itraconazolu do akvária, nechá se 30 min. působit a opakuje se 5 dní. U terestrických druhů se používají jednorázové kelímky s 0.01% roztokem léčiva po dobu 5 min., 11 dní po sobě.

PREVENCE

- při koupi nových jedinců dodržovat 14 denní karanténu
- před i po kontaktu s obojživelníkem dodržovat hygienu (mytí rukou, dezinfekce)
- pozorovat jakékoli změny kůže, chování, kondice
- léčené jedince držet odděleně od ostatních v karanténní místnosti; dezinfikovat jejich boxy, všechny organický materiál odstranit nebo sterilizovat, desinfikovat vodu před vypuštěním do odpadu

Pro více informací pište
na chytrid@email.cz nebo
navštivte chytrid.herp.cz

Tento projekt vznikl za podpory Interní grantové soutěže 2012, IGA 20124233, ve spolupráci s Českou zemědělskou univerzitou v Praze a Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně.

