

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



**Nový patogen obojživelníků – *Batrachochytrium*
salamandrivorans: základní popis, ohrožení a způsob
ochrany**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Konzultant: Ing. David Lastra González

Bakalant: Zuzana Veselská

2020

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zuzana Veselská

Environmentální vědy
Aplikovaná ekologie

Název práce

Nový patogen obojživelníků – Batrachochytrium salamandrivorans: základní popis, ohrožení a způsob ochrany

Název anglicky

New amphibian pathogen – Batrachochytrium salamandrivorans – description, threats to amphibians and conservation measures

Cíle práce

Chytridiomykóza je vážné onemocnění obojživelníků, způsobující poškození a ztráty funkčnosti jejich pokožky. Původcem této choroby jsou chytridiomycetní houby – Batrachochytrium dendrobatidis (dále jen Bd) a teprve nedávno objevený druh B. salamandrivorans (Bsal), napadající ocasaté obojživelníky. Na rozdíl od Bd, recentně objevený druh Bs působí masové úhyny evropských ocasatých jak ve volné přírodě (Nizozemí), tak v chovech (UK, Německo).

Cílem této je na základě práce s literaturou shrnout aktuální informace o druhu Bsal, konkrétně vyhotovit jeho základní popis a princip působení na obojživelníky, stávající rozšíření a dopady, způsoby diagnózy a opatření k ochraně ohrožených druhů. Vlastním výstupem práce bude rámcový návrh ochrany ocasatých obojživelníků v souvislosti s tímto patogenem na území ČR.

Metodika

Půjde o standardní práci s vědeckou literaturou s využitím databází těchto článků (např. WoS, Scopus).

Doporučený rozsah práce

cca 30 stran + přílohy dle potřeby

Klíčová slova

chytridiomykóza, mlouk skvrnitý, čolci, nemoci obojživelníků, ochrana obojživelníků

Doporučené zdroje informací

- Baláž V., Vojar J., Civiš P., Šandera M. & Rozínek R. 2014b: Chytridiomycosis risk among Central European amphibians based on surveillance data. *Diseases of Aquatic Organisms* 112: 1–8.
- Baláž V., Vörös J., Civiš P., Vojar J., Hettyey A., Sós E., Dankovics R., Jehle R., Christiansen D. G., Clare F., Fisher M. C., Garner T. J. W. & Bielby J. 2014a: Assessing Risk and Guidance on Monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through Identification of Taxonomic Selectivity of Infection. *Conservation Biology* 28(1): 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. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 9031–9036.
- Fischer C. F., Garner T. W. J. & Walker S. F. 2009: Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *The Annual Review of Microbiology*, 63: 291–310.
- Longcore J. E., Pessier A. P. & Nichols D. K. 1999: *Batrachochytrium dendrobatidis* gen et sp. nov., a chytrid pathogen to amphibians. *Mycologia*, 91(2): 219–227.
- 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 USA* 110(38): 15325–15329.
- Sabino-Pinto J., Bletz M., Hendrix R., Perl R. G. B., Martel A., Pasmans F., Lötters S., Mutschmann F., Schmeller D. S., Schmidt B. R., 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.
- Spitzen-van der Sluijs A., Spikmans F., Bosman W., de Zeeuw M., van der Meij T., Goverse E., Kik M., Pasmans F. & Martel A. 2013: Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia* 34(2): 233–239.
- 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.

Předběžný termín obhajoby

2019/20 LS – FŽP

Vedoucí práce

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

David Lastra González

Elektronicky schváleno dne 13. 3. 2020

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 15. 3. 2020

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 22. 03. 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Jiřího Vojara, Ph.D., a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze 30. 6. 2020

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Jířimu Vojarovi Ph.D. za odborné rady, ochotu a lidský přístup.

V Praze 30. 6. 2020

.....

ABSTRAKT

Chytridiomykóza je závažné onemocnění obojživelníků způsobující poškození a ztrátu funkčnosti jejich pokožky. Původcem této choroby jsou chytridiomycetní houby – *Batrachochytrium dendrobatidis* a teprve nedávno objevený druh *B. salamandrivorans*, který poškozuje pouze ocasaté obojživelníky. Patogen pochází z jihovýchodní Asie, kde po miliony let bez výrazných dopadů koexistoval na hostitelských druzích ocasatých obojživelníků. Do Evropy se rozšířil v důsledku neregulovaného mezinárodní obchodu se zvířaty. Poprvé byl zaznamenán ve volné přírodě v Nizozemí a Belgii, následně pak v Německu a Španělsku. Ve většině případů zde působí letálně na autochtonní populace ocasatých obojživelníků, zejména mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*). Hlavní prioritou ochrany obojživelníků v souvislosti s *B. salamandrivorans* je nastavit preventivní opatření pro zamezení šíření patogenu. Znalost biologie, ekologie a rozšíření patogenů i hostitelských druhů je základem účinné ochrany. Stejně tak jako vydání a dodržování legislativních nařízení a opatření, které by měly vést k zamezení šíření patogenů.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Chytridiomykóza, mlok skvrnitý, čolci, nemoci obojživelníků, ochrana obojživelníků

ABSTRACT

Chytridiomycosis is a serious disease of amphibians, causing damage and loss of functionality of their skin. The cause of this disease is chytrid fungi – *Batrachochytrium dendrobatidis* and only recently discovered species *B. salamandrivorans*, which damages only urodelans. The pathogen originates from Southeast Asia, where for millions of years it coexisted on hosts of salamanders and newts (Urodela) without significant effects. It has spread to Europe as a result of unregulated international trade of animals. It was first detected in the wild in the Netherlands and Belgium, followed by Germany and Spain. In most cases, it is lethal to the autochthonous populations of urodelans, especially for the fire salamanders (*Salamandra salamandra*). The main priority for the protection of amphibians in related of *B. salamandrivorans* is to set preventive measures to avoid the spread of the pathogen. The knowledge of biology, ecology and the spread of pathogens and host species is the basic for effective protect. As well as issuing valid and complying with legislative regulations and measures that should lead to the prevention of the spread of pathogens.

KEY WORDS:

Chytridiomycosis, *Salamandra salamandra*, newts, amphibian diseases, protect of amphibians

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle práce	12
3. Rešerše.....	13
3.1 Přehled nemocí a patogenů obojživelníků.....	13
3.2 Chytridiomykóza	15
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	16
<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	18
Původ a šíření patogenu	18
Současné rozšíření ve světě a v Evropě	20
Rozšíření v ČR	24
Symptomy onemocnění.....	25
Diagnóza	27
Léčba.....	29
Náchylnost k onemocnění	31
Možnosti prevence a ochrany.....	32
4. Návrhy opatření	36
4.1 Výchozí stav a podmínky	36
4.2 Vlastní návrhy	41
5. Závěry.....	43
6. Přehled literatury	44

1. Úvod

Obojživelníci patří celosvětově mezi nejohroženější obratlovce (Vié et al. 2009; IUCN 2015)¹. Na přelomu 80. a 90. let minulého století bylo intenzivně upozorňováno na jejich první významnější poklesy početnosti (Barinaga 1990; Blaustein & Wake 1990; Wake 1991), které byly následně potvrzeny na globální úrovni (Houlahan et al. 2000; Stuart et al. 2004). V současné době je popsáno 8196 druhů obojživelníků, z nichž je 88 % žab, 9 % ocasatých a 3 % červorů (stav k 30. 6. 2020, zdroj AmphibiaWeb 2020). Dle celosvětových červených seznamů (ČS), které vydává Mezinárodní unie na ochranu přírody (IUCN 2015), je 41 % obojživelníků ohrožených. Kolem 80 % sledovaných populací má tendenci klesat (Baillie et al. 2010). V České republice žije 21 druhů obojživelníků. Žádný z nich není uveden jako ohrožený v celosvětovém (IUCN 2015) ani v evropském (Temple & Cox 2009) ČS. Avšak dle platné národní legislativy² je 19 našich druhů zařazeno mezi zvláště chráněné.

Ohrožení obojživelníků má celou řadu příčin, které často působí nepřímo a ve vzájemných vazbách (Blaustein & Dobson 2006; Pounds et al. 2006). Mezi nejzávažnější příčiny ohrožení obojživelníků patří zejména destrukce jejich biotopů a změna využívání krajiny (Dodd Jr. & Smith 2003; Ficetola & Bernardi 2004). Collins & Storfer (2003) zařadili negativně působící faktory do dvou základních skupin: vlivy přímé, jako například zánik biotopů a změny v krajině (Dodd Jr. & Smith 2003; Ficetola & Bernardi 2004), fyzická likvidace, vliv dopravy (Fahrig et al. 1995; Hels & Buchwald 2001) a invaze predátorů, či kompetitorů (Funk & Dunlap 1999; Kiesecker 2003). Tyto faktory se považují za předvídatelné a často působí přímo i bez ostatních vlivů. Naopak faktory, které se řadí do druhé skupiny, působící často nepřímo a většinou spolu s dalšími faktory jsou: změny klimatu a působení UV záření (Cummins 2002; Carey & Alexander 2003), kontaminace toxickými látkami (Greulich & Pflugmacher 2003), či infekční choroby a patogenní houby (Carey et al. 1999). Jde o vlivy, které nejsou zdaleka tak probádané. Stejně jako jejich předpoklad vzájemných interakcí a synergického působení. Kontaminanty životního prostředí včetně pesticidů,

¹ Pro srovnání, z plazů je za ohrožené považováno 19,4 % druhů (Cox & Temple 2009), z ptáků 13 % (BirdLife International 2015) a ze savců 15,2 % (Temple & Terry 2007).

² Dle Přílohy č. 3 vyhlášky č. 395/1992, kterou se provádí zákon č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů.

polycyklických aromatických uhlovodíků, hnojiva a nízkého pH jsou vlivy, které synergicky působí s ultrafialovým zářením (UV-B). Škodlivé látky obsažené v atmosféře jsou vystaveny UV-B záření, které pravděpodobně zvyšuje jejich toxicitu (Blaustein et al. 2003). UV-B je stresor, který oslabuje obranyschopnost zvířat a činí je náchylnější k jiným antropogenním stresorům (Tevini 1994). Tato synergicky působící reakce negativně ovlivňuje vývoj obojživelníků (Blaustein et al. 2003).

Jednou z nejvýznamnějších příčin, působící synergicky s dalšími faktory (klimatické změny, kontaminace), jsou nemoci obojživelníků. Patří mezi ně houbové choroby a Iridioviry (Carey et al. 2003; Collins & Storfer 2003). Nejzávažnější je onemocnění pokožky obojživelníků, chytridiomykóza, objevená koncem 90. let minulého století. Původcem této choroby jsou chytridiomycetní houby: *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*, Berger et al. 1998; Longcore et al. 1999) a recentně objevená *B. salamandrivorans* (*Bsal*, Martel et al. 2013). Chytridiomykóza byla roku 2001 zapsána na seznam nemocí divoce žijících zvířat (Wildlife Disease List) Světové organizace pro zdraví zvířat (The World Organisation for Animal Health) jako první nemoc obojživelníků (Johnson & Speare 2003).

Patogen *Bd* byl donedávna jediný chytridiomycetní taxon, o kterém bylo známo, že dokáže infikovat obratlovce jako hostitele a způsobuje devastující onemocnění obojživelníků (Bloom et al. 2013). Ovšem pouze do té doby, než se objevily v roce 2008 první zprávy o nalezení mrtvých jedinců mloků skvrnitých (*Salamandra salamandra*) v Nizozemí (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013). Následně bylo prokázáno, že za dramatickými poklesy početností mloků (až o 96 % mezi roky 2010 až 2013) stojí nově objevený patogen *Bsal* (Martel et al. 2013). Patogen pravděpodobně vznikl v Asii, kde po miliony let bez negativních dopadů koexistoval na hostitelských druhích ocasatých obojživelníků (Martel et al. 2014). *Bsal* se přirozeně vyskytuje ve východní Asii (Thajsko, Vietnam (Laking et al. 2017), Čína (Yuan et al. 2018) a Japonsko (Goka et al. 2009)), odkud byl díky obchodu s obojživelníky následně rozšířen do volné přírody i chovů řady evropských zemí – Nizozemí, Belgie, Německa, Spojeného království a Španělska (Martel et al. 2013; Spitzen-van der Sluijs et al. 2013; Cunningham et al. 2015; Sabino-Pinto et al. 2015; Spitzen-van der Sluijs et al. 2016; Fitzpatrick et al. 2018; Lastra González et al. 2019). Patogen *Bsal* má výrazné negativní dopady nejen na mloky, ale i na většinu evropských ocasatých (Martel et al.

2014) a je účinně šířen bujným obchodem s obojživelníky v rámci EU i odolnějšími druhy (některé žáby), které slouží jako vektor (Mutschmann 2015).

V souvislosti s infekčními patogeny obojživelníků je třeba adekvátních opatření, založených na znalosti biologie, ekologie i rozšíření těchto patogenů. Dle rozhodnutí komise EU ze dne 28. února 2018 pro taxonomický řád ocasatí (*Caudata*) byly pro obchod členských států EU upraveny veterinární podmínky. Následující povinnosti členských států EU je podávání každoroční zprávy, kde by měly být vypsány případy s potvrzeným i nepotvrzeným výskytem *Bsal* a další informace, které jsou relevantní pro testování, ošetřování, či manipulaci. Zásilky mloků by se měly do Unie dovážet pouze tehdy, pokud splňují veškeré požadavky a příslušný veterinární orgán členského státu zajistí podrobení karantény. Ochranná veterinární opatření stanovená v rozhodnutí komise EU má být dočasné povahy a měla být použita alespoň do 31. prosince 2019.

I přesto že patogen *Bsal* nebyl v USA zatím detekován (Muletz et al. 2014; Bales et al. 2015), byla vydána preventivní opatření. Kanadská vláda aktivně pracuje na snížení rizika zavedení *Bsal* prostřednictvím kontroly dovozu a prozkoumáváním nouzových opatření podobných těm, které jsou zvažovány v USA (Gray et al. 2015). Rovněž Švýcarský federální úřad pro bezpečnost potravin a veterinární úřad (FSVO) zavedl úplný zákaz dovozu všech druhů mloků rodu *Salamandra* do země (Gray et al. 2015).

Komerční obchod s drtivou většinou druhů obojživelníků na světě postrádá regulaci (Rosen & Smith 2010). Zahrnuje širokou škálu chovaných a volně žijících druhů pocházejících z několika zemí. Tento obchod dohromady čítá několik miliónů obojživelníků ročně (Yuan et al. 2018). Omezení pohybu související s obchodem s mloky představuje klíčové opatření ke zmírnění rizika, která by měla zamezit šíření do dosud nedotčených oblastí a populací, zejména vpádu invazivních patogenů do volně žijících populací (Auliya et al. 2016).

Z výše uvedeného je zřejmé, že oba patogeny, zejména pak *Bsal*, představují významnou hrozbu pro naše obojživelníky. Základem jejich ochrany jsou nástroje účinné prevence proti jejich zavlečení do nových míst a současně výzkum jejich rozšíření i ekologie spojených s následnou osvětou. Problém se totiž netýká pouze volně žijících populací obojživelníků. Ty bývají často infikovány až následně z kontaminovaných chovů nezodpovědných chovatelů (Havlíková et al. 2015).

2. Cíle práce

Z výše uvedených důvodů také vznikla tato práce, jejíž **literární rešerše** je zaměřená na základní popis a ekologii recentně objeveného druhu *Bsal*, dále pak na možnosti jeho detekce, dále prevence a léčby v případě napadení jedinců.

V rámci vlastní **praktické části** jsou diskutovány konkrétní návrhy ochrany volně žijících populací i obojživelníků v zajetí v souvislosti s tímto patogenem. Text by měl shrnout současné poznatky o patogenu včetně využití nástrojů pro zamezení jeho šíření. Tyto poznatky budou dále šířeny v rámci osvěty mezi chovateli i veřejností prostřednictvím tematických internetových stránek.

V následujících bodech jsou shrnuty témata předkládané bakalářské práce:

- Základní popis recentně objeveného *Bsal*.
- Možnosti detekce – metoda PCR.
- Rozšíření patogenu ve světě.
- Léčba onemocnění.
- Konkrétní návrhy opatření v rámci legislativy EU.

3. Rešerše

V rámci rešerše se budu věnovat přehledu a základnímu popisu nejzávažnějších nemocí a patogenů obojživelníků. Následně navážu na nejzávažnější onemocnění – chytridiomykózu, způsobené patogeny *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) a *B. salamandrivorans* (*Bsal*). Stěžejní částí bude širší a podrobnější charakteristika druhu *Bsal*, ve které bude uveden původ a rozšíření patogenu, jak ve světě, tak v Evropě a v České republice. Zmíněné budou také projevy chytridiomykózy a možnosti její detekce, léčby a eventuální prevence i ochrany. Znalost biologie, ekologie patogenů a jejich rozšíření je základem účinné ochrany, jejíž návrh bude součástí praktické části práce.

3.1 Přehled nemocí a patogenů obojživelníků

Mezi vážné nemoci obojživelníků patří **ranaviróza**. Způsobují ji ranaviry z čeledi *Iridoviridae*, které napadají studenokrevné obratlovce – ryby, plazy a obojživelníky (Hyatt et al. 2000). V případě skokana hnědého ve Velké Británii dokonce ohrozili celou jejich populaci (Cunningham et al. 1996; Gray et al. 2009). Ranaviry jsou považovány za vznikající patogeny. Důvodem je zvyšující se počet nakažených jedinců a rozáhlé geografické šíření patogenu (Daszak 2000). Ranaviróza se stává velkou hrozbou pro studenokrevné obratlovce (Chinchar 2002; Williams et al. 2005) a předpokládá se, že ranaviry jsou částečně odpovědné za globální poklesy populací obojživelníků (Chinchar 2002). Mezinárodní obchod se zvířaty (např. se skokanem volským, *Lithobates catesbeianus*), společně s chovem ryb, jsou spojovány se šířením těchto virů (Schloegel et al. 2009; Schloegel et al. 2010; Brunner et al. 2015). Ranaviry patří do skupiny globálně se vyskytujících patogenů, byly nalezeny na všech kontinentech kromě Antarktidy (Duffus et al. 2015).

Čeď Iridoviridae je rozdělena do pěti rodů, z nichž tři jsou považovány za závažnější z hlediska infekční závažnosti u akvatických a semiakvatických živočichů – *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* a *Ranavirus*. Ranaviry v hostitelských tělech napadají vnitřní orgány (ledviny, játra, slezinu, trávicí trakt) a způsobují krvácení do mozku a odumírání tkáně (Whittington & Reddacliff 1995; Williams 2005). Mezi další klinické příznaky patří apoptóza (tj. odstranění nepotřebných, poškozených buněk) v hostitelských buňkách (Chinchar 2002). Jedná se o obalené a neobalené viry,

kteří mají dvouvláknové DNA a jsou přítomny ve sladké i slané vodě (Chinchar et al. 2017).

K dalšímu onemocnění patří houbové choroby – saprolegnióza a chytridiomykóza (viz kap. 3.2). **Saprolegnióza** je plísňové onemocnění, jejíž vodní formy (zejména *Saprolegnia ferax*) napadají vejce a larvy (Robinson et al. 2003) obojživelníků a narušují průběh metamorfózy (Uller et al. 2009), což vede ke zvýšené úmrtnosti dospělců (Altwegg & Reyer 2003). Oomycety jsou přirozeně přítomné ve sladké vodě a v půdě, oba typy se vykazují saprofytickým a parazitickým způsobem života (Romansic 2007). Druhy rodu *Saprolegnia* infikují řadu hostitelů a vyvolávají saprolegniózu u ryb, což se silně odráží na ekonomice v odvětví akvakultury (Vanwest 2006).

Zoospory se dokáží volně pohybovat ve vodě a uchytit se na jedinci, avšak častějším způsobem bývá přenos přímým kontaktem (Robinson et al. 2003). Oslabená vajíčka jsou na rozdíl od životaschopných vajíček náchylnější k infekci. Zooviry se však mohou rychle rozšířit na sousední zdravá vajíčka a způsobit embryální smrt, jakožto bylo příkladem u běžně se vyskytujícího evropského druhu – skokana hnědého (*Rana temporaria*) (Robinson et al. 2003). Výskyt plísně je ovlivněn nadmořskou výškou, čím je nadmořská výška vyšší, tím je větší přítomnost plísně (Muir et al. 2015). Také pH má na plíseň určitý vliv. Druhy *Saprolegnie* byly izolovány v prostředí s významně vyšším pH (Muir et al. 2015 ex Hartog et al. 1986). Významnou vlastností je prostorová variabilita druhového složení *Saprolegnia*. Jako příkladem lze zmínit druh *S. ferax*, který zapříčinil různá stadia umírání u ropuchy západoamerické (*Anaxyrus boreas*) (Kiesecker et al. 2001). Saprolegnióza byla zaznamenána ve Spojených státech a v Evropě (Kiesecker et al. 2001; Uller et al. 2009; Ortiz-Santaliestra et al. 2011; Perroti et al. 2013).

Mezi další onemocnění napadající obojživelníky řadíme parazitózu – **myiázu**, kterou způsobuje *Lucilia bufonivora*. Jedná se o zelenavou mouchu – bzučivku (čeleď Calliphoridae), která klade vajíčka na kůži žab, zejména ropuch (Arias-Robledo et al. 2019b). Vylíhlé larvy putují do nosních otvorů žáby, kde se přiživují na tkáni jedince. V místech nozder vznikají rozsáhlé prohlubně, v nichž jsou přítomny bělavé larvy much, a žába hyne. V mrtvém těle se larvy začínají kuklit (Goddard 2020). *Lucilia bufonivora* je jediným druhem svého rodu (*Lucilia*), který běžně napadá evropské obojživelníky (Arias-Robledo et al. 2019a). Až donedávna se předpokládalo, že je ona

bzučivka geograficky omezená na palearktické druhy, nicméně Tantawi & Whittwort (2014) zaznamenali exempláře i v Kanadě. Druh byl tedy dosud zaznamenán ve Velké Británii, Evropě a v Severní Americe (Arias-Robledo et al. 2019a).

3.2 Chytridiomykóza

Jde o v současnosti nejvýznamnější onemocnění obojživelníků. Původce této choroby jsou chytridiomycetní houby *Batrachochytrium dendrobatidis* (Berger et al. 1998; Longcore et al. 1999), napadající všechny skupiny obojživelníků (Berger et al. 1998), a recentně objevený *B. salamandrivorans* (Martel et al. 2013), jež napadá pouze ocasaté obojživelníky (Martel et al. 2014).

Druhy *Bd* a *Bsal* se řadí do třídy Chytridiomycetes, řádu Rhizophydiales, rodu *Batrachochytrium*. Oba druhy chytridiomycetních hub jsou relativně primitivní, postrádají hyfy a produkují bičíkovité pohyblivé zoospory, které se vyskytují zejména ve vodním, nebo vlhkém prostředí a parazitují řasy, rostliny, prvoky a bezobratlé (Mutschmann 2015).

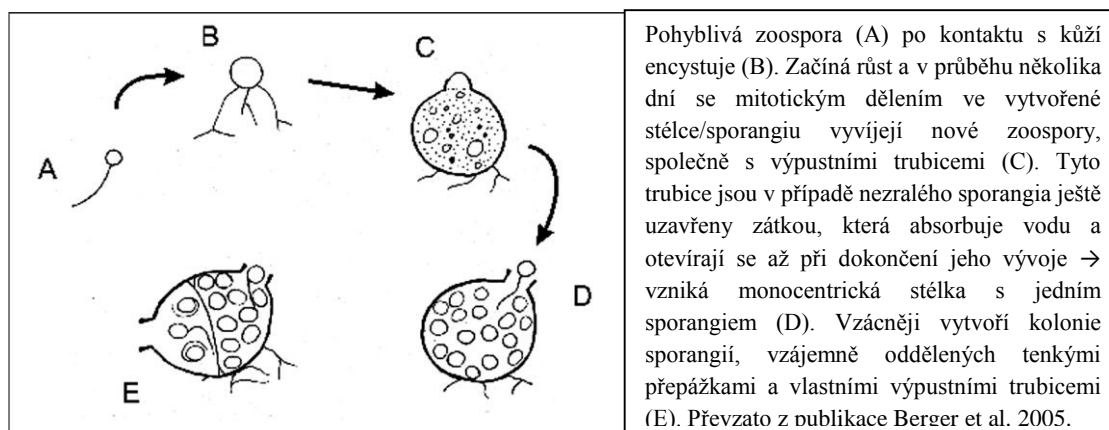
Onemocnění způsobuje poškození a ztráty funkčnosti pokožky obojživelníků (Berger et al. 1999). U dospělých ocasatých obojživelníků (zejména mloků) je známá jejich citlivost na onemocnění. Larvální stádium mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) je vůči nemoci odolné (Van Rooij et al. 2015). Ačkoliv u pulců není infekce smrtelná, destrukce keratinizovaných struktur ústních částí může vést k podvýživě a vývojovým poruchám, navíc může nepříznivě ovlivnit celkový stav pulce (Mutschmann, 2015). Patogenita je odlišná jak v rámci druhů, tak v rámci jedinců. Reakce hostitelů se může pohybovat od odolného, přes tolerantní až k vysoce vnímavému (Van Rooij et al. 2015). Zatímco někteří odolní či tolerantní obojživelníci jsou schopni udržovat úroveň infekce bez smrtelných následků, a tím pádem fungují jako patogenní rezervoár, u ostatních citlivějších jedinců může propuknout vážná smrtící nemoc (Searle et al. 2011). Například ropuška starostlivá (*Alytes obstetricans*) je druh, který je velice citlivý na infekci způsobenou *Bd*. Důsledkem toho byl experimentálně infikován chorobou *Bsal*. Ropuška nevykazovala žádné známky klinických příznaků a došlo ke zjištění, že je vůči onemocnění zcela imunní (Martel et al. 2013). Klinický výsledek infekce je značně závislý na životní kondici jedince, míře patogenní virulence a determinanty prostředí (Van Rooij et al. 2015).

Batrachochytrium dendrobatidis

Chytridiomykóza způsobená patogenem *Bd* se významně podílí na úbytku obojživelníků a je jedním z nejvíce ohrožujících faktorů. Byla zaznamenána v Austrálii, Novém Zélandu, Evropě, Africe a Jižní, Střední i Severní Americe (Berger et al. 2005). Retrospektivně bylo zjištěno, že patogen *Bd* se objevil v 70. letech minulého století v Austrálii a Americe, kde způsobil katastrofické úbytky a vymírání celých populací obojživelníků (Berger et al. 2015).

Bd se vyskytuje ve dvou základních formách – jako kulovité přisedavé zoosporangium či pohyblivá zoospóra (Longcore et al. 1999). Zoospóra se pak usadí na povrchu kůže, kde encystuje (tj. vstřebá svůj bičík, vytvoří buněčnou stěnu a rhizoidy, jimiž se přichytí k povrchu substrátu). Poté vytvoří přisedlá zoosporangia, která nadále vytváří nové pohyblivé zoospory opouštějící sporangium skrze jednu nebo více papil. Tento růstový cyklus trvá až 4–5 dní při optimálních teplotách (22 °C) a živných podmínkách (Johnson & Speare 2003; Berger et al. 2005; **obr. 1**).

Obrázek 1 – Fáze životního cyklu *Batrachochytrium dendrobatidis*. (Berger et al. 2005).



Plíseň je charakterizována svým nepohlavním rozmnožováním a parazitujícím průběhem (James et al 2009). Napadá keratinizované kožní vrstvy pomocí svých zoospor (Piotrowski et al. 2004). Ty mají kulovitý tvar, avšak zoospory čerstvě vylezlé ze sporangia mohou mít někdy mírně protáhlý tvar (Longcore et al. 1999). Jsou vybaveny jediným zadním bičíkem, který jim umožňuje se pohybovat (2 cm za 24 hod) ve vodním prostředí. Zoospory mohou v příznivém prostředí přežít až sedm týdnů (Johnson & Speare 2003). Důsledkem přizpůsobení k vodnímu prostředí jsou plísně náchylnější k vysychání. U *Bd* se prokázalo, že po dobu tří dnů bez přístupu k vodě došlo ke stoprocentnímu úmrtí veškerých infekčních stádií (Mutschamnn 2015).

Nejenom vysychání, ale i teplotní tolerance je klíčová k úspěšnému rozmnožování a přežití tohoto patogenu. U *Bd* se zjistilo, že je relativně intolerantní vůči teplotě. Optimální teplota pro růst těchto organismů v kulturách je 17 až 25 °C a při teplotách pod 10 a nad 28 °C se vývoj postupně zpomalí nebo zcela zastaví (Piotrowski et al. 2004).

Rozšíření a dopady *Bd*

Patogen *Bd* je v současnosti přítomen téměř všude, kde se vyskytují obojživelníci (Fisher et al. 2009). Disponuje schopností infikovat různé skupiny obojživelníků včetně žab, ocasatých a beznohých, na rozdíl od *Bsal* (Olson et al. 2013). Zároveň patří mezi běžně se vyskytující patogen u jedinců žijících v zajetí (Berger et al. 1998; Longcore et al. 1999). Tato plíseň má široký rozsah hostitelů a byla schopna napadnout více než 500 druhů obojživelníků na šesti kontinentech – Severní a Jižní Amerika, Afrika, Evropa, Asie a Oceánie (Austrálie a Nový Zéland). Patogen má širokou oblast výskytu, byl nalezen jak v nížinách, tak ve vysokohorských polohách v peruánských Andách 5000 m. n. m (Seimon et al. 2007). V rámci Evropy byla plíseň nalezena na území 20 států (včetně ČR) u bezmála 30 % volně žijících druhů (Baláž et al. 2014). Mezi bezprostředně ohrožené oblasti patří Austrálie, Střední a Severní Amerika či jižní Evropa, kde došlo k hromadnému šíření nákazy a následné vysoké úmrtnosti mnoha druhů, nicméně situace se nezdá být kritická v Subsaharské Africe, Asii, Brazílii a v severní Evropě (Van Rooij et al. 2015; Berger et al. 2016).

K nejdramatičtějším poklesům začalo docházet koncem 70. let 20. století především v odlehlých chráněných horských oblastech Austrálie a Střední Ameriky (Berger et al. 2015). Zřejmou příčinou poklesu populace se zdála být ztráta stanoviště popsána Stuartem et al. (2004). Nicméně byly podány silné důkazy o tom, že *Bd* je primární příčinou masového úhynu a poklesu populace obojživelníků (Skerratt et al. 2007). Na konci roku 1993 patogen zdecimoval celou populaci paropuchy ostronosé (*Taudactylus acutirostris*) (Laurance et al. 1996) a zapříčinil masové úhyny populací žab deštného pralesa v Panamě a v Queenslandu (Berger et al. 1998). Onemocnění mělo za následek vyhynutí dvou australských druhů, a to tlamorodky zázračné (*Rheobatrachus silus*) a tlamorodky větší (*Rheobatrachus vitellinus*). Naposledy byly viděny roku 1981 a 1985 (Berger et al. 2015). Potencionálními hostitelskými reservoáry mohou být také vodní ptáci (Garmyn et al. 2012) a raci (McMahon et al. 2013). U belgických hus se zjistilo, že se plíseň dokáže přichytit na keratinizované

části prstů a dokonce se i množit (Garmyn et al. 2012). U infikovaných jedinců lze pozorovat anorexii, apatii, záchvaty, křeče a poruchu koordinace pohybu. Ta spočívá ve ztrátě vzpřímeného reflexu a neobvyklého držení těla s prodlouženými zadními nohama. U kůže se přítomnost patogenu projevuje změnou barvy, zdrsněním, hyperkeratózou (tj. abnormální rohovatění kůže) a nadměrným opadáváním kůže (Mutschmann 2015).

Vlivem šíření chytridiomykózy se začaly populace stovek druhů obojživelníků celosvětově zmenšovat, v horším případě zcela zanikat. Chytridiomykóza je nyní považována za nejničivější nemoc s obrovským dopadem na biologickou rozmanitost obratlovců (Skerratt et al. 2007). Dále se věnuji recentně objevenému patogenu – *Bsal*, který pro naše druhy ocasatých představuje přímou hrozbu.

Batrachochytrium salamandrivorans

Dále se věnuji recentně objevenému patogenu – *Bsal*, který pro naše druhy ocasatých představuje přímou hrozbu.

Původ a šíření patogenu

Předpokládá se, že plíseň *Bsal* pochází z jihovýchodní Asie (Thajsko, Vietnam, Japonsko), kde po miliony let koexistovala na hostitelských tělech mloků (Laking et al. 2017). *Cynops pyrrhogaster*, *Cynops cyanurus* a *Paramesotriton deloustali* jsou tři druhy asijských ocasatých, u kterých experiment naznačil, že mohou být potencionálními reservoáry pro šíření plísně v Evropě. Reservoár byl definován jako pasivní hostitel, ve kterém jsou přítomny život neohrožující patogenní organismy. Slouží jako zdroj infekce pro ostatní jedince (Keane & O'Toole 2003). Navíc u čolka ohňobřichého (*Cynops pyrrhogaster*) se prokázala schopnost přenášet přímým kontaktem *Bsal* na mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*). U zkoumaných exemplářů se infekce projevovala až pět měsíců s typickými příznaky, které měly tendenci se stále opakovat, nebo byl zdroj infekce kompletně odstraněn. U jednoho asijského druhu pamloka (*Salamandrella keyserlingii*) se dokonce prokázala absolutní rezistentní schopnost vůči plísňovému onemocnění (Fitzpatrick et al. 2018). Na rozdíl od něho, pro rody *Taricha* a *Notophthalmus* má plíseň letální účinky. Rody sice nemají vysoké druhové zastoupení (sedm druhů), ale za to disponují rozsáhlou disturbancí a značnou hojností (Martel et al. 2014).

Rozšířenější studie zabývající se detekcí *Bsal* v jihovýchodní Asii, konkrétně v severním Vietnamu, došla k poznatku, že *Bsal* je mnohem rozšířenější v celé populaci mloků, než jeho sesterský druh *Bd*. Z 11 provincií se plíseň se vyskytovala ve 14 lokalitách z celkových 55 testovaných lokalit, přičemž prevalence infekce se mezi provinciemi nebo druhy nelišila, až na jedinou výjimku – *Paramesotriton hongkongensis* měl oproti ostatním druhům vysokou míru prevalence (Laking et al. 2018).

Dle Blooi et al. (2015) je teplotní optimum pro *Bsal* 15–20 °C. Přesto většina infikovaných jedinců byla nalezena v rybnících, či potocích o teplotě vody mezi 20–25 °C, největší teplotní extrém dosahoval až 26,4 °C. Výsledek výzkumu nám značí širší teplotní rozpětí pro přežití plísně, než tomu bylo doposud známo (Laking et al. 2017).

V jižní Číně byla zjištěna přítomnost patogenu v širokém taxonomickém, geografickém a environmentálním rozsahu. *Paramesotriton hongkongensis* a *Cynops orientalis* jsou druhy, které jsou zatíženy jak intenzivním obchodem, tak častým výskytem *Bsal*. Na internetovém obchodě se nejvíce vyskytují rody *Cynops*, *Pachytrion*, *Tylototriton* a *Paramesotriton*, které zároveň také spadají do skupiny rodů, u kterých se nejčastěji projevila nákaza. Předpokládaná prevalence *Bsal* u mloků, které podléhají obchodu, jsou 3 %. Odhaduje se, že do Spojených států za poslední desetiletí dorazilo nejméně 66 000 *Bsal* pozitivních mloků (Yuan et al. 2018).

Obojživelníci a plazi patří mezi zvířata, se kterými se nejčastěji obchoduje (Nijman 2010). Tento fakt vzbuzuje obavy z možného dopadu na volně žijící populace, životní podmínky zvířat, šíření invazivních druhů a výskyt infekčních chorob (Arena et al. 2012). Analýzy ukázaly, že celkový obchod USA je tvořen pouze několika druhy, naneštěstí se jedná o chov a obchod zejména druhů invazivních. Jednalo se například o druh *Cynops orientalis*, který byl z Číny importován v počtu více než 2,3 miliony jednotlivců do Spojených států v letech 2001–2009 (Herrel & van der Meijden 2014). Vyhodnocení souvisejících rizik je přesto velice obtížné z důvodu nedostatku kvantitativních dat o obchodu. Důvodem je intenzivní a neregulovaný obchod v nechráněných oblastech (Schlaepfer et al. 2005).

Vzhledem k diskontinuitě globální distribuce *Bsal* je zřejmé, že do Evropy musel být zprostředkován člověkem. V důsledku globalizace a obchodu s obojživelníky byl

patogen nedávno zavlečen do původní evropské populace obojživelníků, kde v současnosti způsobuje úbytek biologické rozmanitosti (Martel et al. 2014).

Současné rozšíření ve světě a v Evropě

Vzhledem k vysoké náchylnosti mloků a současnému rozšíření této plísně v Evropě, představuje *Bsal* bezprecedentní hrozbu biologické rozmanitosti mloků na západní straně palearktické oblasti (Van Rooij et al. 2015). Nedávné testování ocasatých na *Bsal* odhalil přítomnost plísně u volně žijících populací v Nizozemí, Belgii, Španělsku a Německu (Martel et al. 2013; Spitzen-van der Sluijs et al. 2016; Fitzpatrick et al. 2018). U zvířat chovaných v zajetí se objevil v Německu, Velké Británii, Belgii, Nizozemí a Španělsku (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013; Cunningham et al. 2015; Sabino-Pinto et al. 2015; Fitzpatrick et al. 2018).

Nizozemsko a Belgie

Nizozemí patří mezi první evropskou zemi, do které se z jihovýchodní Asie začal rozšiřovat smrtelný patogen *Bsal*. Tato země je hraniční oblastí rozšíření mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*), na její nejjihnější části se vyskytovaly dvě původní populace a jedna nepůvodní (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013). Od roku 1971 byla monitorována největší populace („Bunderbos“). Výsledná data poukázala na vysokou populační hustotu, celá populace odhadem čítala až několik stovek jedinců (Gubbels 2009). V rámci sítě ekologického monitorování byly všechny tři populace pozorovány každoročně od roku 1997 (Goverse et al. 2006). Monitoring populací odhalil opakující se nálezy mrtvých dospělců bez vnějších známek zranění na širokých cestách (**obr. 2**).

Obrázek 2 - Uhynulý mlok skvrnitý bez vnějších příznaků (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013).



Nehybná těla jedinců byla poprvé zaznamenána roku 2008 a následně od roku 2010 docházelo k prudkým poklesům v počtu pozorovaných jedinců. Z počátku nebyly patrné příčiny náhlého masivního úhynu a nebylo jasné, zda se tak stalo v důsledku chytridiomykózy, ranavirózy či degradaci stanovišť (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013).

Spitzen-van der Sluijs et al. (2013) provedli studii, zabývající se analýzou tohoto záhadného poklesu a objasnění jeho příčin. Ukázalo se, že klimatická data (průměrná denní teplota, denní srážky, vlhkost) získaná během výzkumu, signifikantně neovlivňovala počet pozorovaných jedinců, a proto byla vyloučena z další analýzy. I přesto byl zpozorován významný pokles všech populací v časovém rámci 1997–2012 (monitoring převzat z i předešlých let) a celková velikost populace klesla o 96 %. Podrobné patologické vyšetření kadáverů bohužel nebylo možné z důvodu pokročilého stádia rozložení těl mloků a provedené testy nepřinesly přesvědčivé výsledky o příčině smrti. Avšak přiklání se k teorii, že nejpravděpodobnější možnou příčinou může být patogenní agens, či intoxikace v kombinaci s jinými příčinami.

Martel et al. (2013) nakonec tento záhadný pokles objasnili. Tým vědců našel, izoloval a charakterizoval nově objevenou houbu – *Bsal*. Plíseň byla izolována z kůže mloků z postižené populace v Bunderbosu. Na nakažených tělech mloků (*Salamandra salamandra*) byly patrné kožní léze a projevy anorexie, apatie a ataxie. Přítomnost plísně byla nakonec potvrzena mikroskopickým vyšetřením kožních lézí pomocí transmisního elektronového mikroskopu. Pomocí metody PCR (polymerázová řetězová reakce) a qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) se všechny infikovaná zvířata testovala na širokou škálu dalších infekčních chorob, nicméně jiný patologický nález prokázán nebyl. Pro demonstraci smrtelné vlastnosti *Bsal* vědci experimentálně infikovali pět jedinců. Zhruba po dvou týdnech všichni nakažení podlehli. Metodou PCR se potvrdila přítomnost plísně. Objevené kožní ulcerace se navíc shodovaly s ulceracemi nalezených u volně žijící populace.

Sousedící Belgie se řadí hned mezi druhou evropskou zemi, kde došlo k vypuknutí a šíření plísně *Bsal*. Na konci prosince 2013 se objevilo první ohnisko v belgickém Eupenu, což je přibližně 30 kilometrů jižně od prvního ohniska v Nizozemí. O rok později v dubnu se objevilo další ohnisko v Robertville, které se nachází o 30 km jižněji od druhého ohniska (Martel et al 2014). V Belgii i Nizozemsku se připravují

plány, zaměřené zejména na zvyšování povědomí veřejnosti a vypracování akčních plánů pro případ nouze (Gray et al. 2015).

Německo

Vědci byli roku 2015 informováni od německého soukromého chovatele, věnující se chovu obojživelníků již několik let, ohledně vysoké úmrtnosti spojené s výskytem kožních ulcerací. Soukromý chov obsahoval na 200 jedinců představující čtyři odlišné druhy z různých koutů světa – mlok alžírský (*Salamandra algira*) – severní Afrika, mlok korsický (*Salamandra corsica*) – ostrov Korsika, mlok levantský (*Salamandra infraimmaculata*) – Blízký východ a mlok skvrnitý (*Salamandra salamandra*) – Evropa. K úmrtnosti došlo u všech chovaných druhů, přesto se u všech jedinců neobjevily typické příznaky chytridiomykózy. Nezávislé studie jednoznačně dokázaly, že se jedná o první důkaz zanesení vysoce patogenního *Bsal* do Německa nalezené v soukromém vlastnictví chovatele ve středním Německu – Hesensku. Původ *Bsal* ve vyšetřovaném chovu není znám, plíseň mohla být zavedena prostřednictvím mloků, kteří byli získáni z vnějšího zdroje nejasného původu o rok dříve, kdy docházelo k několika úmrtí neznámých příčin. Záludným oříškem se stal pro vědce fakt, že patogen nezpůsobil hromadnou úmrtnost mnohem dříve (Sabino-Pinto et al. 2015).

Spitzen-van der Sluijs et al. (2016) mezi lety 2010–2016 shromáždili vzorky volně žijících populací mloků a čolků v oblasti Eifel v západním Německu (blízko hranic Nizozemska a Belgie), Belgie a Nizozemí. Výběr místa odběru vzorků se zakládal na hlášení o úmrtí obojživelníků, preventivním sledování náchylných populací anebo se jednalo o geograficky podobné lokality místům ohnisek. V Německu se vzorky odebíraly na šesti dalších místech, ovšem každá lokalita byla vzdálená více než 100 km od nejbližšího známého ohniska nákazy. Odebírání vzorků bylo prováděno pomocí vatové štětičky a přítomnost *Bsal* byla detekována prostřednictvím PCR. Z celkových 55 zkoumaných lokalit se patogen *Bsal* potvrdil na 14 lokalitách. Mezi nakažené druhy se řadil mlok skvrnitý, čolek horský a čolek obecný. Výsledky ukázaly, že rozptyl šíření může být až 10 000 km² napříč Německem, Belgií a Nizozemskem. Bylo zjištěno, že rozšíření patogenu *Bsal* u volně žijících populací se soustřeďuje zejména na oblast Eifel v západním Německu.

Velká Británie

Velká Británie zaznamenala detekci tohoto patogenu během rutinního testování mloků chovaných v zajetí. Druhy, u kterých se infekce projevila, pocházely z dovozu z Asie. Všechna zvířata byla vzata do karantény, kde podlehla infekci, nebo byla usmrcena. (Cunningham et al. 2015). Výzkum z roku 2011 zahrnoval 2409 odebraných vzorků u divoce žijící populace. Vzorky byly odebrány z rybníků po celé Velké Británii. Nicméně ani jeden vzorek neprokázal přítomnost patogenu. Dodatečná studie mezi lety 2013–2017 stále neprokázala přítomnost *Bsal* u volně žijících populací. Vzorky se odebíraly neinvazivní metodou pomocí vatové štětičky a detekce byla provedena pomocí qPCR (Cunningham et al. 2019). Cunningham et al. (2019) ve své studii využívá archivních vzorků a monitoruje onemocnění k vyhodnocení pravděpodobnosti výskytu *Bsal* u volně žijících populací s cílem informovat o strategiích zmírnění šíření patogenu a pohotovostním plánováním. Výsledky studie ukázaly, že pravděpodobnost přítomnosti patogenu je velmi malá, procentuálně méně, než 3,3 %. Což znamená, že se patogen v rybnících vůbec nevyskytuje, nebo se vyskytuje ve velice malé míře.

Španělsko

U ocasatých bylo shledáno pozitivními pro *Bsal* sedm z jedenácti testovaných chovů, včetně prvního nálezu u zvířat chovaných v zajetí ve Španělsku (Fitzpatrick et al. 2018). Testování u divoce žijících populací se uskutečnilo na místě v severním Španělsku, které je vzdálené více než tisíc kilometrů od předchozí známé oblasti výskytu *Bsal* v Evropě. Jednalo se o dvě španělské provincie (Kantábrie a Asturie), kde se převážně izolovaně od lidské populace vyskytovali *Bsal* pozitivní jedinci. Nakažených jedinců bylo dohromady pět, z nichž se čtyři nacházeli v korytech na pití určená hospodářské zvěři a jeden nakažený byl nalezen v okrasném jezírku na soukromé zahradě, 30 km od nejbližšího zaznamenaného případu. Lokality, u kterých se infekce prokázala, byly vzdálené více než 1 000 km od jakékoliv oblasti s potvrzeným výskytem *Bsal* (Lastra González et al. 2019). Ačkoliv infikované druhy žijící v zajetí by mohly představovat nebezpečnou cestu šíření *Bsal* do volné přírody (Sabino-Pinto et al. 2018), nedostatečné opatření a dohled nad patogenem u chovaných obojživelníků je Achillovou patou, zejména pro Španělsko. Invazivní druhy slouží jako vektor patogenů pro původní populace. Předpokládá se, že byl soukromým chovatel vypuštěn nepůvodní druh (*Triturus anaticus*), který následovně zapříčinil

zavlečení patogenu do volně žijící populace (*Triturus marmoratus*, *Salamandra salamandra*, *Calotriton arnoldi*) a jejich následné poklesy (Martel et al. 2020).

USA

Severní Amerika je globální „hotspot“ pro biologickou rozmanitost mloka, zahrnuje bezmála 50 % všech žijících druhů na světě, ale zároveň se potýká s nadměrně špatně regulovaným a intenzivním obchodem s mloky (Yap et al. 2015). Zejména Mexiko a Appalačské pohoří jsou společným domovem pro více než 100 druhů (čeled' *Plethodontidae*), které pojí vysoká citlivost na *Bsal*, a tím pádem i vysoká míra ohrožení. Obě tyto oblasti, spolu s pacifickým severozápadem, jsou známé pro své regionálně endemické a reliktní druhy mloků. Při zavlečení *Bsal* do Severní Ameriky by se mohli projevit závažné ekologické, tak i ekonomické dopady, včetně možného vyhynutí druhů. (Gray et al. 2015).

I přes četné nálezy patogenu u chovaných obojživelníků v Evropě se situace ve Spojených státech se zdá být zatím klidná. Průzkumy totiž nepotvrdily přítomnost patogenu jak u volně žijících živočichů, tak ani u zvířat chovaných v zajetí (Klocke et al. 2017). Což se zdá být v rozporu s poznatkem, kdy devět jedinců ze tří různých chovů (jeden chov ve Velké Británii a dva v Německu) podlehl plísňovému onemocnění. Jejich úmrtnost byla ovlivněna přítomností několika ocasatých obojživelníků pocházejících z Evropy, Severní Ameriky a z východní části Střední Ameriky (Fitzpatrick et al. 2018).

Rozšíření v ČR

Pět výše uvedených evropských zemí s potvrzeným výskytem plísni jsou žhavými kandidáty pro aktivní sledování přítomnosti a dynamiky *Bsal* (More et al. 2018). Vztahuje se zejména na státy s rozšířeným obchodem s obojživelníky a rozsáhlou komunitou exotických chovatelů domácích zvířat, jako je Německo a Španělsko. Tyto země jsou společně s Českou republikou hlavními dovozci živých asijských ocasatých obojživelníků v EU (UNEP-WCMC 2016; Baláž et al. 2018).

Česká republika je zemí s vysokou druhovou diverzitou ocasatých (Sillero et al. 2014), navíc sdílí západní hranice s Německem, kde byla dříve prokázána *Bsal* (Sabino-Pinto et al. 2015). Nejrizikovější je zřejmě hlavní město s rozsáhlou komunitou chovatelů exotických zvířat a prodejen s domácími mazlíčky, navíc se zde pravidelně konají velké exotické veletrhy teraristických živočichů (Havlíková et al. 2015).

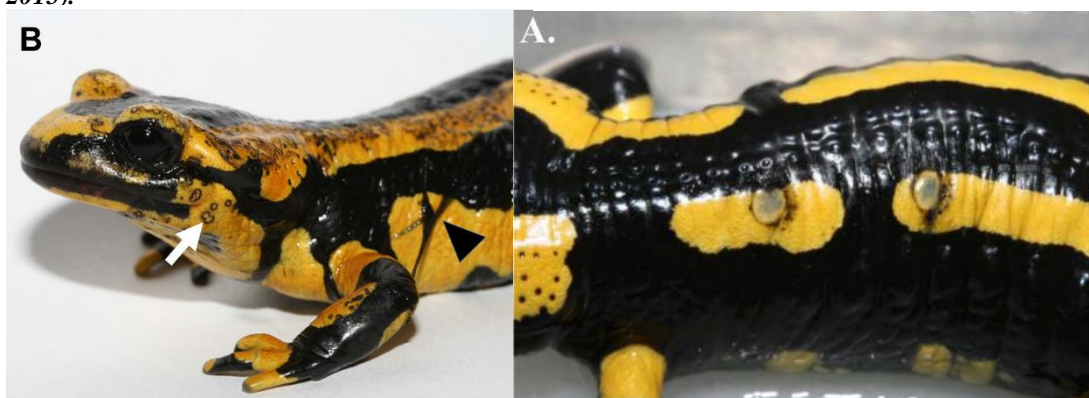
V Praze a v jejím okolí se vyskytují populace volně žijících původních druhů, mezi které patří: mlok skvrnitý (*Salamandra salamandra*), čolek obecný (*Lissotriton vulgaris*), čolek horský (*Ichthyosaura alpestris*) a čolek velký (*Triturus cristatus*) (Šťastný et al. 2015). Jedná se o druhy, u kterých byla prokázána citlivost na *Bsal* (Martel et al. 2013, 2014; Cunningham et al. 2015; Spitzen-van der Sluijs et al. 2016). Velká města a jejich okolí pravděpodobně představují oblasti s vysokým rizikem pro volně žijící populace obojživelníků. A proto byla Praha vybrána jako potenciální oblast prvního ohniska *Bsal* u divoce žijící populace českých obojživelníků (Baláž et al. 2018). Vzhledem ke známé informaci, že *Bsal* je šířen prostřednictvím obchodu s domácími mazlíčky (Martel et al. 2014), byly zkoumané také populace ocasatých obojživelníků chované v zajetí. Dohromady se testovalo 324 vzorků na oba dva známé typy chytridiomykózy. Vzorky se odebíraly celkově z devíti lokalit. Byly odebírány na území města anebo pocházely z oblasti kolem Prahy. Ostatní vzorky zkoumané v zajetí chovaných ocasatých pocházely z pražské zoologické zahrady. Mezi zkoumané druhy patřily: mlok skvrnitý, čolek obecný a čolek horský. Všechny testované vzorky přinesly falešně pozitivní výsledek pro přítomnost *Bsal*. Tento výsledek však nemusí čistě vzato znamenat, že *Bsal* v České republice není přítomen. Závěry mohly být ovlivněny nedostatečným počtem odebraných (Baláž et al. 2018).

Symptomy onemocnění

Mezi klinické příznaky patří nadměrné odpadávání kůže, viditelné kožní ulcerace, neobvyklé držení těla (Gray et al. 2015), anorexie, ataxie, apatie a smrt (Martel et al. 2013). Kožní ulcerace způsobené *Bsal* se mohou vyskytovat na jakémkoliv místě na těle (hlava, tělo, končetiny a ocas) (**obr. 3.**, **obr. 4**). K ulceracím se může připojit také krvácení (Van Rooij et al. 2015).

Obrázek 3 - Kožní léze (bílá šipka) a stopy po opadu kůže (černá šipka) na *Salamandra salamandra fastuosa* (Sabino-Pinto et al. 2015).

Obrázek 4 - Viditelné kožní ulcerace na *Salamandra salamandra* (Bloom et al. 2015).



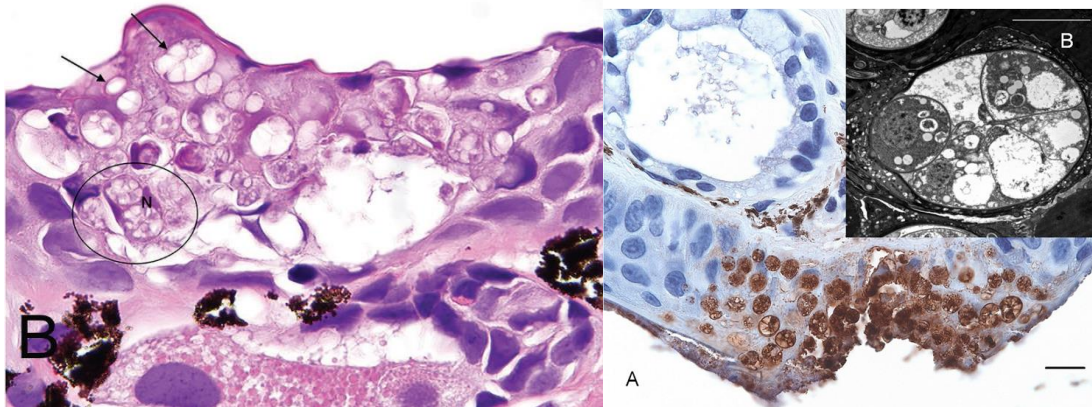
Přítomnost *Bsal* u divoce žijící populace může snadno zůstat bez povšimnutí, protože se léze vyvíjejí pouze ke konci poslední fáze choroby (Martel et al. 2013). Dá se také povšimnout nepravidelného, či ochablého plavání (White et al. 2016).

Příznaky infekce jsou často pozorovány 5 až 15 dní po vystavení se kontaktu s patogenem. Degradace povrchu pokožky spojené s narušenými funkcemi pokožky (homeostáza elektrolytů, poměry tekutin, výměna plynů, či bariéra obranných látek) vede k usmrcení v rozmezí dvou až tří týdnů od doby vystavení se přítomnosti patogenu (Martel et al. 2013; Martel et al. 2014). Běžně se vyskytují zároveň sekundární bakteriální infekce, či infekce způsobené jinými fungálními patogeny (Mutschmann, 2015). Patogen disponuje dvěma způsoby napadení jedince. Jedná se o konstantní virulenci a přítomnost encystovaných spor, které jsou odolné vůči prostředí. Stálá virulence je podporována skutečností, že plíseň produkuje nejenom pohyblivé zoospory, ale také druhý typ agresivních encystovaných spor, které způsobují rozsev a odolnost infekce. Zatímco zoospory aktivně plavou ke svému hostiteli, encystované spory se dokáží vznášet mezi vzduchem a vodou a jsou schopny rychle přilnout ke kůži, či dokonce na keratinizované části nohou vodního ptactva (Stegen et al. 2017).

Pokožka živočichů je rozdělená do několika vrstev a převážná většina je tvořena 1 typem buňky – keratinocyty. Během nakažení dochází k odumírání kůže ve více ložiskách a připojuje se k tomu také ztráta rozlišení mezi kožními vrstvami tvořené keratinocyty. To vše je spojené s nesčetným vnitrobuněčným a mimobuněčným výskytem houbové stélky typu chytrid. Mnohočetné léze se vyskytují v místech kožní eroze, či ulcerace. V nově se vytvářecích lézích po okrajích již vzniklých, starších lézí může být houbová stélka pozorována v rámci cytoplasmy keratinocytů, která vytlačuje na okraj buněčná jádra (**obr. 5, obr. 6**) (White et al. 2016).

Obrázek 6 - *Bsal* způsobující úplné odumírání keratinocytů s tvorbou mnohých houbových stélek, které tvoří přepážky (šipky). V uzavřeném kruhu můžeme vidět uvnitř keratinocytu 2 houbové stélky, které obklopují jádro buňky a tím způsobují její odumírání (White et al. 2016).

Obrázek 5 - Viditelné kožní léze pomocí imunohistochemického barvení kůže (A). Koloniální stélka uvnitř keratinocytu, můžeme vidět uvnitř keratinocytu 2 houbové stélky, zobrazeno pomocí transmisní elektronové mikroskopie (B) (Martel et al. 2013).



Diagnóza

Infekce *Bsal* může být diagnostikována klinickým vyšetřením, mikroskopií, PCR, izolací a kulturou (Hyatt et al. 2007; Baláž et al. 2017). Transmisní elektronová mikroskopie (Berger et al. 2002) a imunohistochemie může být také použita pro demonstraci intraepidermálních struktur (Hyatt et al. 2007). Podobně jako u *Bd*, základní histologické vyšetření (Berger et al. 1999) jako takové nemůže být používáno jako diagnostický test k rozlišení plísně. Detekce probíhá na základě odebraných vzorků pomocí metody PCR. Odběr vzorků se může provádět několika způsoby: provést stěry pomocí speciální vatové štětičky, ustříhnutí prstů, odejmutí kůže z uhynulého jedince nebo určení za pomoci amplifikace specifických částí DNA ze vzorků vody (Baláž et al. 2017). Hyatt et al. 2007 doporučil otření vatovou štětičkou jako nejvhodnější způsob odběru vzorků hned z několika důvodů: uchování DNA, minimální riziko kontaminace vzorku, efektivní způsob v rámci laboratorních i terénních podmínek a celkově nejcitlivější a nejméně invazivní způsob odběru vzorku pro následné zkoumání. Výtěr by měl být zaměřený na ventrální stranu a vatovou štětičkou by se mělo přejet 10–15x. Vatové štětičky by se měly skladovat v suchu a v dodaných nádobách. Invazivnější metodou je odběr vzorků u pulců, usmrcují se

etherem a odeberou se jim ústní partie. Možná ještě drastičtější metodou je odstřihávání koncové části třetího prstu pravé zadní nohy (Berger et al. 1998).

Během odebírání vzorků by se měla udržovat náležitá hygienická pravidla. Při každé manipulaci se zvířetem by se měly použít jednorázové latexové rukavice, které zabráňují křížové kontaminaci (Goka et al. 2009). Před vstupem do potencionálně zamořeného místa je potřebné si opláchnout boty a vybavení 5% bělícím činidlem, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci mezi lokalitami (Longcore et al. 2007). K zabránění možné křížové kontaminaci mezi vzorky uchovávané ve stejné nádobě se dá předejít tak, že před odběrem se každý jednotlivý vzorek opláchne 70% ethanolem (Cheng et al. 2011). Po odebrání by jednotlivé vzorky měly být odděleně konzervovány v 75% EtOH, nebo formalínu a skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Bai et al. 2010).

Za rychlý a spolehlivý test se považuje polymerázová řetězová reakce (**PCR**), která dokáže rozpoznat DNA zkoumaného patogenu (Annis et al. 2004). Metoda PCR umožňuje namnožit konkrétní úsek DNA na miliony kopií, se kterými se může dál pracovat. Zkoumanou část DNA (templát) izolují primery – krátké oligonukleotidy, které se nalepí k úsekům ohraničující zájmové místo. K amplifikaci DNA dochází během tří fází střídání teplot – denaturace ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$), annealing ($35\text{--}65\text{ }^{\circ}\text{C}$) a polymerace ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$). Reakce probíhá v cyklech a dochází k syntéze miliónů kopií určité části DNA (Schultze 2001).

Nicméně přesnější metodou je kvantitativní polymerázová řetězová reakce (**qPCR**) v reálném čase neboli metoda real-time PCR (Boyle et al. 2004; Hyatt et al. 2007). Rozdíl spočívá ve fragmentační analýze. U klasické PCR detekujeme až výsledný produkt, ale u qPCR sledujeme přírůstky během každého cyklu (Hyatt et al. 2007). Děje se tak na základě fluorescenčně značených PCR fragmentů, které dokáže přečíst kapilární sekventátor a zobrazuje několik fragmentů naráz, navíc barevně rozdělených (Logan et al. 2004).

Podmínky amplifikace použité v real-time PCR pro *Bd* (Boyle et al. 2004) jsou totožné i pro *Bsal*, s výjimkou zvýšení teploty během teplotní fáze annealing na $60\text{--}62\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Bloo et al. 2013). Hodnota GE (genomic equivalent) je měrnou jednotkou pro intenzitu nákazy a vyjadřuje počet zoospor na jeden stěr. Infekce s hodnotou 1000 GE se obvykle považuje za letální (Vredenburg et al. 2010). Při experimentu byla zaznamenaná limitní hodnota *Bsal* 0,1 GE měřená metodou PCR real-time, která byla

zaznamenána rovněž u *Bd* (Boyle et al. 2004). Schopnost metody PCR real-time detekovat dva patogeny na tak nízkých hladinách je ideální pro časnou detekci patogenů při environmentálním screeningu a diagnostice chytridiomykózy (Bloom et al. 2013).

Martel et al. (2013) navrhuji diagnostické druhově specifické primery (STerF a STerR) pro amplifikaci ribosomální RNA patogenu *Bsal*. Během experimentu se podařilo amplifikovat RNA ze všech vyšetřených pozitivních tkání. Zásadní bod nastal ve chvíli, kdy primery neamplifikovaly žádný jiný z devíti testovaných kmenů spadajících do tří linií *Bd*, u kterých je známo, že způsobují infekce po celé Evropě. Vzniká nová neinvazivní metoda pro detekci způsobené *Bsal*, která se dá aplikovat jak u žijících zvířat, tak z archivovaných vzorků.

Vnořená PCR analýza (**nested PCR**) prokázala větší citlivost pro detekci *Bd*, než real-time PCR (Goka et al. 2009; Bai et al. 2012). A proto vzniká studie, která se snaží detekovat *Bsal* pomocí vnořené PCR analýzy. Výsledné testy citlivosti nakonec prokázaly, že vnořená PCR analýza může detekovat *Bsal* s pouhou hodnotou 0,01 GE a došlo k závěru, že vnořený PCR test je ještě citlivější, než real-time PCR (Zhu et al. 2013 ex. Bloom et al. 2013).

Léčba

Metody léčby jsou prozatím v počátcích. Níže vypsané metody slouží jako doporučené postupy pro léčbu onemocnění způsobenou *Bsal*. Za nejčastěji používanou léčbu se považuje teplotní ošetření (Bloom et al. 2013), nebo ošetření v kombinaci s vorikonazolem, polymyxinem E a teplotou. Zmíněné způsoby eliminovali chytridiomykózu způsobenou *Bsal* u divoce žijících zvířat a také u experimentálně infikovaných jedinců. (Bloom et al. 2015).

Předpokládalo se, že teplota určuje dynamiku infekce způsobenou *Bsal*, a proto by se mohlo na infikované jedince aplikovat **tepelné ošetření**. Bloom et al. (2015) zkoumal dopad teploty prostředí na infekci a dynamiky onemocnění u mloků skvrnitých. Ke kolonizaci a výrazně rychlejšímu namnožení *Bsal* docházelo v rozmezí teplot 15–25 °C a při vystavení vyšší či nižší teplotě docházelo ke zpomalení šíření patogenu, nebo došlo přímo k jeho záhubě. Infikovaní jedinci byli vystaveni teplotě 25 °C po dobu 10 dnů, což vedlo k úplnému zániku infekce a vyléčení všech experimentálně infikovaných jedinců. Tím pádem bylo dokázáno, že tento léčebný protokol výrazně

podpořil tvrzení, že dynamika infekce způsobená *Bsal* je výrazně ovlivňována teplotou prostředí a že tepelné ošetření je schůdná možnost pro odstranění infekce. V případě opětovného výskytu onemocnění byla zvířata vystavena opětovně teplotě 25 °C po dobu 10 dnů. Tato teplota se ovšem blíží kritickému tepelnému maximu několika ocasatých (Bury 2008), což znamená, že tato léčba je druhově omezená (Blooi et al. 2015). Dynamika nemoci má řadu dalších ovlivňujících faktorů, patří mezi ně virulence patogenu, citlivost hostitele, či faktory životního prostředí (Blooi et al. 2015). *Bsal* má nižší teplotní preference, než příbuzná plíseň *Bd* (Piotrowski et al. 2004) a důvod tohoto rozdílu v dynamice nemoci mezi chytrydiomycetními houbami není doposud znám (Martel et al. 2013).

Tento objev vyvrátil jiný výzkum, který dokazuje, že *Bsal* může mít vyšší teplotní toleranci, než bylo doposud známo (Laking et al. 2017). Na místech potencionálního reservoáru *Bsal* (Vietnam) probíhal výzkum, který sledoval přítomnost *Bsal* a *Bd* u osmi druhů patřících do rodu pačolků (*Paramesotriton*) a trnočolků (*Tylototriton*). Většina infikovaných jedinců byla nalezena ve vodních nádržích o teplotě vody mezi 20–25 °C a největší teplotní extrém dosahoval až 26,43 °C. Na infikovaných zvířatech nebyly nalezeny známky souvisejících s onemocněním, a tím pádem je možné, že šlo o potencionální hostitelské reservoáry (Laking et al. 2017).

Mezi další účinnou metodu léčby se považuje užití **antimykotik** v kombinaci s tepelným ošetřením. Výhodou této metody léčby je možnost užití u většiny druhů ocasatých, protože tepelné ošetření dosahuje snášlivé teploty. Vědci se snažili použít stejný léčebný antimykotický protokol, jako pro příbuznou plíseň *Bd* (Martel et al. 2011), nicméně terapeutický účinek nebyl účinný. Selhání bylo částečně způsobeno různou minimální inhibiční koncentrací (MIC) antimykotik u *Bsal* a *Bd*.

Existují tři hlavní způsoby používané pro testování interakcí mezi sloučeninami v antimykotické aktivitě: E-test (Kontoyiannis et al. 2000), „time-kill“ test (Keele et al. 2001) a diluční metody (Lewis et al. 2002). Pro testování potencionální synergie mezi antimykotickými sloučeninami byla použita diluční metoda ředěná tzv. geometrickou řadou, která je snadněji proveditelná a interpretovatelná (Blooi et al. 2015). V laboratorních podmínkách dochází k inhibici růstu *Bsal* po aplikaci vorikonazolu, polymyxinu E, itrakonazolu a terbinafinu, nikoli však florfenikolu. Synergické účinky mezi polymyxinem E a azolovými antimykotiky (vorikonazolem nebo itrakonazolem) signifikantně snížily kombinované MIC nutné k inhibici růstu

Bsal. Lokální léčba infikovaných mloků (*Salamandra salamandra*) se samostatně podaným vorikonazolem nebo itraconazolem, či v kombinaci s polymyxinem E při teplotě okolo 15 °C během 10 dnů snížila množství plísně, ale nedošlo k odstranění infekce. Lokální léčba infikovaných zvířat v kombinaci polymyxinu E a vorikonazolu při teplotě okolo 20 °C vedlo k odstranění infekce. Tento léčebný protokol byl odzkoušen na přirozeně a experimentálně infikovaných mlocích, u kterých se dostavil pozitivní výsledek v podobě odstranění infekce u všech nakažených mloků (Bloo et al. 2015). Antimykotická léčba s využitím itraconazolu se považuje za nejlepší metodu léčby (Woodhams et al. 2016).

Sekundární bakteriální infekce u obojživelníků mající slabší imunitu jsou způsobeny oportunními gramnegativními bakteriemi (Mader 2006). Histologické vyšetření vzorků kůže infikovaných mloků často odhalily závažné bakteriální přerůstání kůže v souvislosti s onemocněním *Bsal* (Martel et al. 2013). Proto je baktericidní aktivita polymyxinu E vůči gramnegativním bakteriím obrovskou výhodou pro léčbu lézí (Bloo et al. 2015).

Strategií pro zvládnutí nemoci je mnohem více. Například odstranění patogenního rezervoáru, změna prostředí prostřednictvím redukce zápojů pro intenzivnější výhřevnost a manipulace se zoosporami. V případě *Bsal* nejsou tyto metody proveditelné nebo nejsou efektivní v mokřadních biotopech obývaných obojživelníky, zejména v nedotčených oblastech (Woodhams et al. 2016). Relativně nová strategie využívá přirozené nepřátele plísní, které sídlí přímo na kůži obojživelníků. Jedná se o symbiotické mikrobioty, které jsou schopny inhibovat rozšiřování a usazování patogenů. Vesměš jde o novou aplikaci probiotik, či jiných prospěšných bakterií, které poskytují hostiteli ochranu před patogenem. Mechanismy, kterými bakterie podporují rezistenci vůči chorobám, nejsou dobře známy. Některé bakterie jsou schopné podporovat imunitu hostitele a další přímo soupeří s invazivními patogeny. Takový boj mezi mikroby často vede k vylučování toxinů a malých molekul antibiotik (Woodhams et al. 2016).

Náchylnost k onemocnění

Důsledkem chytridiomykózy čelí obojživelníci také dopadům **stresu na imunitní systém**. Přírodní stresory (nutriční deficit, vytlačování, dravci) zvyšují hladinu kortikosteroidů, avšak to neznamená, že zdravý hostitel je zranitelnější vůči chorobě (Rollins-Smith 2017). Samotné ranaviry a *Bd* jsou významnými spouštěči

fyziologického stresu (Rollins-Smith 2011). Během příznaků nemoci může zvýšená hladina kortikosteroidů narušit imunitní obranu, a tím pádem zhoršit stav onemocnění. Dlouhodobý stres vyvolán ať už nemocí, či environmentálními faktory může snížit imunitu zvířete (Rollins-Smith 2012). Rollins-Smith (2017) ve své studii naznačuje, že vrozené a adaptivní obranné systémy zprostředkované lymfocyty mohou být u juvenilů několik měsíců po metamorfóze ohroženy. Mezi ovlivňující faktor patří špatné životní podmínky během vývoje. V důsledku nevyhovujících podmínek se nedospělí jedinci stávají náchylnější vůči nemocem. Během metamorfního období je vývoj imunitních funkcí přerušen. Celý systém se nastartuje až po metamorfóze, kdy se počet lymfocytů začne pohotově zvyšovat a imunitní systém je připraven se bránit.

Mnoho obojživelníků má také dobře vyvinuté granulární žlázy (jedovaté žlázy) schopné produkovat antimikrobiální peptidy – AMP (König et al. 2015). Jedná se o látky, které plní důležitou obrannou funkci v první linii proti bakteriím, houbám, virům a jiným patogenům kteří by mohli proniknout skrz kůži (Rollins-Smith 2009). Kupříkladu schopnost AMP inhibovat zmiňované ranaviry a *Bd* (Rollins-Smith 2011). Vlivem rozruchu, či zranění se aktivuje sympatický nervový systém, adrenergní receptory jsou stimulovány (Rollins-Smith 2017 ex Holmes & Balls 1978) a obsah žláz se uvolní na povrch kůže (Rollins-Smith 2017). Dokonce i mírné simulované poplašné vypětí indukuje uvolňování značného množství defenzivních peptidů u drápatky vodní (*Xenopus laevis*) a skokana levhartího (*Rana pipiens*) (Ramsey et al. 2010). Důsledkem akutního krátkodobého stresu dojde k uvolňování katecholaminů (hormony zajišťující spojení mezi neuronem a buňkou, jež produkuje protilátky). Jedná se o přirozenou odpověď imunitního systému, která zabraňuje proniknutí patogenům skrze kůži (Rollins-Smith 2017).

Možnosti prevence a ochrany

Environmentální a klimatické změny patří mezi ohrožující faktory pro populace obojživelníků (Bloo et al. 2015). Nicméně v poslední době se ukázalo, že největší hrozbou je lidská činnost v podobě rozšiřování chytridiomykózy mezinárodním obchodem se zvířaty (Mutschmann 2015). Při nedodržování hygienických předpisů a bezpečnostních praktik představuje tento obchod potenciální cestu pohybu patogenů přes mezinárodní hranice. Nebezpečné je to zejména u zvířat, která nesou patogeny bez zjevných příznaků choroby (Spitzen-van der Sluijs et al. 2011). Kromě kontrol obchodů s domácími zvířaty je nezbytně nutný dohled nad patogenem pro případné

stanovení strategie zásahu v postižených oblastech a pro stanovení preventivních opatření (Lastra González et al. 2019).

Vývoj strategií k omezení šíření a dopadů těchto patogenů je prioritou, která překračuje hranice politiky, ekonomiky, vědy a zdraví a spadá do působnosti lékařské, veterinární, zemědělské a do ochrany přírody (Garner et al. 2016). Bohužel vývoj terénních postupů pro zvládnání boje proti nemoci zaostává a management ochrany volně žijících obojživelníků zůstává jako neprozkoumané téma (Woodhams et al. 2011; Scheele et al. 2015; Skerrat et al. 2016). Uplatnění ochranných programů je finančně limitováno, a proto je důležité kriticky posoudit veškeré aspekty strategie ochrany, aby nedocházelo k promarnění investic (Converse et al. 2016; Skerrat et al. 2016). Garner et al. 2016 předpokládá, že ideální strategie bude: (I) bezpečná, legální a etická, (II) efektivní a spolehlivá, (III) proveditelná napříč hostitelskými druhy, společenstvy a prostředí, (IV) jednoduchá k provedení a (V) za nízké náklady. Podle plánů by se měl zachovat maximální poměr rozmanitosti druhů obojživelníků napříč jejich rozšíření. To znamená, že při uskutečnění plánů bude nutné počítat se ztrátami jednotlivých populací a druhů (Garner et al. 2016).

V boji proti chorobě by měl být zohledněn mnohostranný přístup, který pohlíží i na etapu vzniku patogenu (doba před proniknutím, invazivní vpád, epidemie, stabilizace) (Langwig et al. 2015). Současné přístupy zahrnují prevenci pro krátkodobé řešení (Woodhams et al. 2011; Skerratt et al. 2016), ale pokud je cílem neutralizace hrozby nemoci u volně žijících populací, prioritou by mělo být zkoumání dlouhodobých udržitelných plánů (Garner et al. 2016). Ovšem použití již vyvinutých léčebných protokolů není ve volné přírodě tak jednoduché. Potíž spočívá v tom, že obojživelníci postižení chytridiomykózou se pohybují na pozemních, stromových, vodních a podzemních stanovištích, které se mohou překrývat. Navíc četnost hostitelské populace značně kolísá (Garner et al. 2016).

Ke zmírnění dopadů chytridiomykózy v přírodě byly vyzkoušeny a zveřejněny čtyři různé strategie: translokace/znovuzavedení obojživelníků (Muths et al. 2014), posílení hostitelského mikrobiomu pomocí probiotik (Vredenburg et al. 2011), léčba jednotlivců antimykotiky (Hudson et al. 2016) a kombinace antimykotické léčby s chemickou dezinfekcí okolního prostředí (Borroto-paéz et al. 2015). Klíčovým bodem pro úspěšnost strategie translokace/znovuzavedení je pochopení interakce hostitel – patogen a znalost biologie hostitele a patogenu v krajině (Garner et al. 2016).

Pokusy repatriace obojživelníků postižené chytridiomykózou byly provedeny v Evropě, Severní Americe, Karibiku a v Africe, ale žádná z nich nevedla k úspěšnému výsledku (Rija et al. 2011; Woodhams et al. 2011; Muths et al. 2014). I když většina výsledků byla spojena s opětovným výskytem chytridiomykózy u reintrodukovaných druhů, příčina selhání nemohla být jasně stanovena (Muths et al. 2014). To je důležité zjištění, protože chytridiomykóza může být sekundárním onemocněním vlivem jiných ohrožujících procesů, což by znamenalo, že zaměření na plíseň bylo nesprávné (Fellers et al. 2007; Rija et al. 2011). Neschopnost jednoznačně identifikovat příčinu ukazuje relativní nezralost vědy v reintrodukcii obojživelníků (IUCN 2013).

Pravděpodobně nejúčinnějším opatřením ke zmírnění šíření nemoci je ustanovení nových obchodních předpisů, které omezují obchod s ocasatými obojživelníky, jako tomu bylo nařízeno v USA (White et al. 2016). Mezinárodní manipulace s obojživelníky hraje významnou roli při vzniku a šíření patogenů. I přes tento fakt je kontrola chytridiomykózy a dalších chorob v komerčním obchodu ve značné míře přehlížena (Martel et al. 2014). Světová organizace pro zdraví zvířat (OIE) je hlavní mezinárodní institucí, která má právo stanovit určité regulace. Do působnosti organizace spadá i ochrana volně žijících živočichů, nicméně výsledky jsou zatím nedostatečné. *Bd* sice byl uveden do seznamu OIE, nicméně organizace už dále nerealizovala zavedení kontrol při obchodu s obojživelníky mezi členskými státy EU (Schloegel et al. 2010).

Jako jeden z mnoha preventivních kroků spočívá v nastavení pravidel ohledně manipulace s volně žijícími zvířaty a chovaných v zajetí. Žádný dospělec by neměl být přemístován z jedné populace do druhé, stejně tak jako nepropouštět obojživelníky chované v zajetí do volné přírody (Mutschmann 2015). Jeden z nejdůležitějších prvků prevence a ochrany spočívá v dodržování ustanovených hygienických pravidel. Při práci s obojživelníky v terénu by měli všichni používat jednorázové latexové rukavice (Goka et al. 2009). Ty by měly být vyměňovány s každým manipulovaným vzorkem a ukládány do plastových sáčků a bezpečně likvidovány. Další nutností je čištění a dezinfekce bot a terénního vybavení před opuštěním pracovního prostoru (Mutschmann 2015). Nejlepší a nejjednodušší metodou dezinfekce je 10% roztok chlorového bělidla (Young et al. 2007). Tepelné ošetření a sušení oděvů a použitého vybavení po dokončení sběru vzorků je také účinným prostředkem pro dekontaminaci.

Všichni nově držení obojživelníci by měli být drženi v karanténě po dobu nejméně šest až osm týdnů (Mutschmann 2015). Všichni jedinci by měli být také vyšetřeni na klinické příznaky nemoci a nešťastníkům, kteří uhynou během karantény, by měla být provedena pitva. Pro uchování vzorků se doporučují plastové boxy z důvodu snadného čištění a dezinfekce. Plastové nádoby my měli být dekontaminovány dvakrát týdně v autoklávu, nebo pomocí 10% roztoku chlorového bělidla. Veškerý environmentální materiál, který byl ve styku s obojživelníky (půda a voda) by měl být považován za kontaminovaný, a proto musí být řádně zlikvidován jako biologicky nebezpečný odpad. Před likvidací je také doporučeno zahřívání na 60 °C po dobu pěti minut (Young et al. 2007).

V literatuře se diskutuje o několika strategiích zmírňování dopadů choroby, ačkoli nebyly testovány v terénu. Hromadí se důkazy, že alespoň některé druhy jsou schopny reagovat na napadení chytridiomykózy prostřednictvím imunitní obrany (Brannelly et al. 2016; Savage & Zamudio 2016). Výsledkem jsou dva nejvíce diskutované návrhy (Kilpatrick 2006). První koncept je založen na myšlence, že se nechá uskutečnit přirozený výběr a přežití bude záviset na obranyschopnosti jedinců. Obojživelníci budou vystaveni tváří v tvář patogenu a repatriace bude uskutečněna tak, aby byla podpořena vytrvalost populace. Druhá strategie se zakládá na selektivním chovu odolných nebo tolerantních jedinců, kteří budou uvolněni do volné přírody (Venesy et al. 2012). Obě strategie se snaží vytvořit rezistentní nebo tolerantní populace a jsou založeny na předpokladech imunitní odpovědi hostitelů (Mutschmann 2015).

Je zřejmé, že je nezbytné pokračovat v bádání genetického základu rezistence obojživelníků. Kontrola infekce u obojživelníků a pochopení interakce patogenu a obojživelníka jakožto hostitele budou klíčovými faktory při zmírňování dopadu chytridiomykózy (Van Rooij et al. 2015). Navzdory po několik let zkoumané interakci mezi hostitelem obojživelníkem a patogenem nebyla doposud objevena žádná účinná metoda ke snížení dopadu chytridiomykózy. Každá navrhovaná strategie má svoje výhody a nevýhody, ale když dojde ke kombinaci těchto metod je velmi pravděpodobné, že bude mít větší úspěšnost (Mutschmann 2015).

4. Návrhy opatření

4.1 Výchozí stav a podmínky

Všechny následující návrhy vychází ze současných znalostí a platných nařízení a rozhodnutí EU. Pro Českou republiku (ČR) jakožto členským státem EU platí prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2018/320 ze dne 28. února 2018 o ochranných opatřeních pro obchod s mloky uvnitř EU. Tato opatření se nevztahují pro transfer mloků v zájmovém chovu. Tento proces zařizuje nařízení (EU) č. 576/2013. Pro ČR to znamená, že při obchodu z ČR do jiného členského státu a dovozu do ČR se musí dodržet karanténní opatření na našem území a následně musí být nahlášeno a registrováno příslušné krajské veterinární správě. Karanténa by měla splňovat dané náležitosti jako např. dezinfikovatelné povrchy, dohled nad mloky, patřičné nakládání s odpadem a odpadními vodami, náležité testy a ošetření mloků atd. Zásilka by měla být opatřena veterinárním osvědčením, které se ztotožňuje se vzorem stanoveným v rozhodnutí Komise. Veškeré finanční náklady za odběr vzorků, příslušné testování a vyšetření během karantény si musí provozovatel či dovozce musí hradit sám (SVS 2020).

V souladu s článkem 31 nařízení č. 178/2002 byl Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) požádán Evropskou komisí, aby přezkoumal a shromáždil dostupné údaje o *Bsal* a určit, zda je *Bsal* nemoc s možným negativním dopadem pro volně žijící mloky a mloky chované v zajetí v Evropské unii. EFSA byla konkrétně požádána o poskytnutí vědecké a technické pomoci týkající se: I. posouzení potenciálu ohrožení zdraví mloků žijící ve volné přírodě a zajetí, II. účinnost a proveditelnost zákazu obchodu přes hranice EU (včetně obchod uvnitř EU), III. Platnost a spolehlivost dostupných diagnostických metod pro detekci *Bsal* a IV. možné alternativní metody a proveditelné opatření ke zmírnění rizika nákazy a zajištění bezpečného mezinárodního a evropského obchodu s mloky a jejich výrobky.

Fylogenetickou analýzou bylo prokázáno, že houba skutečně pochází z určitých částí z Asie, a proto někteří aktéři vyzvali evropské zastoupení v oblasti zdraví zvířat k okamžitému opatření Evropské unie, zejména tedy okamžitý zákaz dovozu mnoha druhů mloků z Asie do EU (Baláž et al. 2017). Vědecká pracovní skupina Evropské unie (**The Scientific Working Group of the European Union**) v červnu roku 2016 rozhodla, že by měl být pozastaven dovoz asijských mloků do Evropy a toto

rozhodnutí implementovat do přílohy B evropského nařízení č. 338/97. Ale kvůli administrativním problémům a neuvědomujíc si naléhavost zastavit tuto hrozbu není toto rozhodnutí účinné až do teď (UNEP-WCMC 2016). Dle souhrnné zprávy týkající se události pořádanou Stálým výborem pro rostliny, zvířata a bezpečnosti potravin, že není vhodné přistupovat k příslušným krokům a opatření v EU. Namísto toho vydal Výbor závěr, že je nanejvýš důležité informovat a vzdělávat všechny relevantní aktéry a zúčastněné strany o potřebných opatření týkající se biologické bezpečnosti a ochrany na místní úrovni ohrožených populací a úzce spolupracovat s orgány životního prostředí a podporovat výzkum, který by měl obohatit vědeckou společnost o více informací ohledně patogenu. Na tento fakt také narážela organizace EFSA, která varovala, že z důvodu nedostatku vědeckých publikací o *Bsal* může nastat riziko vznikajících mezer v nařízení ohledně opatření a doufá, že tyto mezery doplní budoucí výzkum (Evropská komise 2016). Evropská komise si dala za jeden ze svých cílů přezkoumat strategii EU v oblasti biologické rozmanitosti v roce 2020. V dokumentu se vyskytuje krátký popis *Bsal*, nicméně se už neudává jak se s danou problematikou vypořádat (BISE 2020).

Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (CITES) reguluje mezinárodní obchod prostřednictvím licenčního systému a předpisů z důvodu omezení nadměrného využívání pro komerční účely. Účelem úmluvy je zastřešit všech 27 členských států EU (a zbytek smluvních stran) pod jednoznačně určená pravidla, a zamezit tak komerční obchod s ohroženými volně žijícími druhy a živočichy vycívenými v zajetí nebo člověkem vypěstovanými druhy rostlin a to takovým způsobem, aby nedošlo k ohrožení přežití daného druhu. Z 8182 druhů obojživelníků (stav k 15. 6. 2020, zdroj AmphibiaWeb 2020) uznaných vědeckou komunitou je v současnosti uvedeno pouze 222 druhů ve všech třech dodatcích úmluvy (Kontrolní seznam druhů CITES, platný od 26. listopadu 2019). Což znamená, že mezinárodní obchod je sledován ve velice malém měřítku a nezohledňuje regulaci obchodu u více než 97 % druhů obojživelníků.

Od 26. listopadu 2019 vešla v platnost rozšíření Mezinárodní úmluvy CITES o několik druhů obojživelníků. Hlavním faktorem změny byl obchod s domácími mazlíčky a rozšiřující se chytridiomykóza. Mezi nově zapsané rody obojživelníků patří pačolek (*Paramesotriton*) a trnočolek (*Tylototriton*), u kterého byly i přímo zapsány druhy, a to: trnočolek Čangův (*Echinotriton chinhaiensis*) a *Echinotriton maxiquadratus*. Nově

zavedená regulace mezinárodního obchodu je pro obojživelníky velice přínosná, a to proto, že tato dvojice rodů byla nejen zatížena intenzivním obchodem, ale také se u nich často vyskytovala chytridimykóza způsobená *Bsal* (MŽP 2019). Rody byly zapsány do CITES II (přílohy B podle předpisů EU), což znamená, že spadají do skupiny živočichů, kteří by mohli být ohroženi, pokud nebude mezinárodní obchod přísně regulován a zároveň je jak dovoz, tak vývoz možný pouze na základě zvláštního povolení (tzv. permity CITES), které musí být předloženy celním orgánům. Důraz je zejména kladen na zemi vývozu (Kontrolní seznam CITES 2019).

Světová organizace pro zdraví zvířat (OIE) uvedla v roce 2017 infekci způsobující *Bsal* do seznamu nemocí obojživelníků podléhající oznamovací povinnosti (seznam nemocí OIE, 2020). Probíhající globální expanze *Bd* a *Bsal* a jejich nepříznivý dopad na místní druhy a populace je nezbytným zdrojem informací, který je třeba, aby organizace OIE zohlednila a zaktualizovala své stávající standardy jako například zpřísnění biologických bezpečnostních opatření během obchodní trasy (Auliya et al. 2016 ex Schloegel et al. 2010). Nedávná dohoda mezi OIE a CITES ohledně spolupráce o globálních otázkách zdraví zvířat je důležitým krokem vpřed, ovšem záleží i na budoucím naplnění jejích cílů. Dohoda si klade za cíl chránit druhy uvedené na seznamu CITES, biologickou rozmanitost a podniknout příslušné kroky ohledně chorob volně žijících živočichů (viz dohoda CITES a OIE 2015, přístupné od 10. dubna 2016).

Závažným problémem je skutečnost, že celní správa spadající pod organizaci WCO (World Customs Organization) postrádá specifické označení pro obojživelníky ve svém systému. Neexistence zmíněného označení umožňuje obchodujícím stranám převážet libovolně obojživelníky bez povšimnutí pohraniční kontroly. To znamená, že i nadále bude velice obtížné vysledovat obchodní toky evropských obojživelníků a tedy prakticky ani nebude možné provádět příslušná opatření jako dodržování mezinárodních norem týkajících se obchodu, dopravy, kontroly nemoci, hygienických opatření a povinné karantény (Auliya et al. 2016). Výsledek zmíněné věci je takový, že obojživelníci spadají do kategorie „ostatní“, nebo jsou řazeni do kategorie „tropické ryby“ (Gerson et al. 2008). Tento nedostatek vesměs znemožňuje koordinovat jakýkoliv obchod s druhy, nebo dokumentovat počty dovážených obojživelníků do EU. Ačkoliv druhy zapsané na seznamu CITES jsou regulovány na základě povolení

od vyvážejících a dovážejících zemí, tak i přesto mohou být druhy ze seznamu pašovány legální cestou přes mezinárodní hranice (De Paula et al. 2012).

Asociace pro rybolov a volně žijící zvířata (AFWA) představila 19. června 2018 ve Washingtonu „Plán okamžité reakce na *Bsal*“. Tento akční plán poskytuje biologům potřebné kroky, které lze podniknout a minimalizovat negativní dopady a zároveň maximalizovat šanci na zadržení nemoci u chovaných a volně žijících mloků. Forma plánu vznikla za spolupráce AFWA – Výboru pro ochranu obojživelníků a plazů a „Pracovní skupinou *Bsal*“. Pracovní skupinu *Bsal* zahrnuje účast pracovníků z Kanady, Mexika a USA a koordinuje výzkum a diagnostiku, dohlíží na stav věci, přináší odpovědi, stará se o správu dat, tvoří podporu při rozhodovacích procesech a komunikace ohledně *Bsal* (AFWA 2018).

Bernská úmluva je zaměřena na ochranu evropských planě rostoucích rostlin, volně žijících živočichů a přírodních stanovišť. Pověření výkonu této činnosti má na starost Rada Evropy. Stálý výbor Bernské úmluvy vydal doporučení č. 176 (2015) týkající se prevence a kontroly *Bsal*. Doporučení ukládá všem smluvním stranám povinnost zavést koordinovaný monitoring patogenu, vytvořit akční plány pro preventivní účely zamezení šíření nemoci a založit jasně daný systém sloužící ke kontrole těchto činností a pravidelně o nich podávat zprávu. Tato pravidla by se měla dodržovat do té doby, dokud nebudou Evropskou unií navržena nezbytná preventivní opatření proti zavlečení *Bsal* prostřednictvím obchodu se zvířaty (Bernská úmluva 2015). Obchodní omezení jsou v souladu s široce uplatňovaným přístupem předběžné opatrnosti a pomůže předcházet zavedení patogenů, jako je *Bsal* (UNEP-WCMC 2016).

Nedávné **rozhodnutí Evropské unie č. 2018/320** provádí opatření proti šíření *Bsal* prostřednictvím obchodu s mloky. Zavádí pravidla ohledně zákazu, či omezení dovozu mloků do EU, dodržovat hygienické a obecně používané postupy, identifikace a následné ošetřování nakažených jedinců chovaných v zajetí a pro ochranu divoce žijících mloků se vyvarovat vypuštění infikovaných jedinců do volné přírody, vytvořit pohotovostní týmy pro pasivní dohled. Dle rozhodnutí by mělo dojít k zavedení organizovaného protokolu ohledně detekce *Bsal* v celé EU, zlepšení shromažďování údajů ohledně početnosti mloka a jeho rozšíření, posílení činnosti pasivního dohledu a pracovat na zvyšování povědomí jak odborníků, tak veřejnosti (More et al. 2018).

Pokud jde o účinnost a proveditelnost zákazu pohybu (včetně obchodu uvnitř EU a dovozu z mimoevropských zemí) obchodu s ocasatými, jak asijských, tak neasijských druhů, se vyvozuje závěr, že účinnost zákazu pohybu závisí hlavně na: objemu (obsahu) zásilky, znalosti příslušného druhu (vnímavého druh), na které se musí zákaz pohybu vztahovat, včasné detekci prostřednictvím sledování vysoce rizikových oblastí a omezení nelegálního obchodu (Baláž et al. 2017).

Několik postižených zemí a země, které přepokládají vpád *Bsal* přijaly rozmanité a kontrolující preventivní opatření pro vypořádání se krátkodobými či dlouhodobými důsledky u volně žijících mloků a mloků chovaných v zajetí (Baláž et al. 2017; More et al. 2018). Jeden z příkladů z těchto zemí je například USA, kde zakázali dovoz několika druhů mloka. *Bsal* se v USA zatím nevyskytuje, nebo zatím nebyl detekován.

Opatření USA

Výskyt těchto fungálních patogenů v Severní Americe podpořil myšlenku, že prevence vůči zavlečení je nejlepší způsob, jak zabránit šíření a pokud se patogenu stejně podaří proniknout je nezbytná rychlá reakce (Frick et al. 2010). Okamžitá reakce však musí být i politická a nezavedení okamžitých opatřovacích kroků vede k vyvolávání problémů ve snaze snížit riziko zavlečení *Bsal* do USA (Yap et al. 2015).

Vznikající hrozba, kterou způsobuje *Bsal* mlokům po celém světě vede k závažným obavám, proto se koalice organizací neváhala obrátit na Správu Spojených států pro ryby, planě rostoucí rostliny a volně žijící živočichy (U. S. Fish and Wildlife Service, USFWS) s žádostí, aby agentura podnikla nouzové kroky a zabránila zavlečení *Bsal* do USA. A proto USFWS usnesla prozatímní pravidla podle zákona Lacey Act (18 USC 42-ISFWS 2016). Tato pravidla nabyly účinnosti 28. ledna roku 2016 a omezují mezinárodní a mezistátní pohyb 20 rodů mloků (White et al. 2016). Aktuální předpisy Správy Spojených států pro ryby, planě rostoucí rostliny a volně žijící živočichy umožňují ukládat dovozní omezení živočišným druhům, které by mohly potenciálně ohrozit původní druhy, avšak předpisy nezahrnují regulaci týkajících se mikroorganismů, respektive patogenů.

Mezi další mezerou v zákoně patří nedostatečné opatření ohledně dovozu volně žijících zvířat. Zatímco u dovážených domestikovaných zvířat vyžaduje ministerstvo zemědělství USA platné veterinární osvědčení (pokud se jedná o druh, který je potenciální hostitel uvedený na seznamu Světové organizace pro zdraví zvířat –

OIE), tak u volně žijících živočichů není vyžadován žádný důkaz o přepravě nenakažených zvířat (Gray et al. 2015).

I přesto Amerika zůstává v pohotovosti a v případě zavlečení *Bsal* do USA existuje nástin strategického plánu. Několikačlenná skupina zabývající se ochranou obojživelníků a plazů (Partners in Amphibian and Reptile Conservation, PARC) vytvořila v lednu roku 2015 pracovní tým specializovaný na mezinárodní onemocnění, který si klade za jeden z hlavních cílů – rozvoj strategického plánu při zavlečení *Bsal*. Americká vědeckovýzkumná vládní agentura zkoumající geografii, přírodní zdroje a přírodní katastrofy (United States Geological Survey, USGS) uspořádala v červnu roku 2015 „*Bsal* workshop“ s cílem vyvinout objektivní rozhodovací proces, který bude řídit odezvu na *Bsal*. Klíčovým výsledkem bylo zorganizování Národní Pracovní Skupiny *Bsal* pro USA, která byla složena z Technické Poradenské Komise (Technical Advisory Committee, TAC) a ze sedmi specializovaných pracovních skupin (Gray et al. 2015).

4.2 Vlastní návrhy

Celosvětový obchod s obojživelníky je jedním z iniciátorů šíření nových nemocí obojživelníků (Martel et al. 2014) a zvyšujícího se rizika vyhynutí mnoha druhů (Stuart et al. 2004). Toto navyšující se riziko by mělo vést k potřebě pochopit, jak se druhy přesouvají v rámci zemí a kontinentů a mezi nimi. Současně je okamžitá potřeba prošetřit mezery a nedostatky evropské legislativy týkající se mezinárodního obchodu se zvířaty. Mělo by se jednat o posílení a regulaci stávajících právních předpisů v oblasti biologické bezpečnosti a implementaci stávajících zákonů o volně žijících živočiších na vnitrostátní a mezinárodní úrovni. Za nedostatek se dá považovat, že v nedávném rozhodnutí Evropské unie č. 2018/320 chovatelé vlastníci soukromé chovy obojživelníků, jakožto koneční spotřebitelé, nebyli do legislativy zahrnuti (Martel et al. 2020).

Vzhledem ke složitosti taxonomie a nedostatku důkazů týkajících se citlivosti na patogen u ostatních druhů bude zákaz na úrovni taxonomického řádu účinnější a proveditelnější, než zákaz pro daný druh (Baláž et al. 2017). Pokud jde o možné alternativní metody a proveditelná opatření ke zmírnění rizika, aby byla zajištěna bezpečná mezinárodní úroveň a obchod s mloky a jejich produkty v EU, dospělo se k těmto závěrům: 1) povinná karanténa pro dovezené mloky (*Salamanders*), 2) přijetí

právních předpisů, které vyžadují testování zvířat před uskutečnění obchodu pro prokázání přítomnosti *Bsal*, 3) omezení obchodu s mloky, 4) sledování obchodu všech druhů, 5) hygienické postupy/biologická bezpečnost před a během obchodování, 6) šíření osvěty veřejného povědomí (Baláž et al. 2017).

I přestože se jedná o jedno z nejvíce obchodovaných zvířat (obojživelníci), současné právní předpisy EU nejsou dostatečné k tomu, aby zabránily nadměrné poptávce a importu, který vede k následnému zavedení patogenu do oblastí volně žijících zvířat. Mezery v legislativě můžeme pozorovat při samotném počátku obchodování. Pohraniční kontrole chybí specifické označení pro určení třídy obojživelníků. Tento nedostatek vede k neurčení druhů, nebo naopak dochází k promíchání druhů mezi sebou, které navíc mohou být přepravovány ve stejných nádobách, vede nedodržování povinnosti doložení testování o zdravotním stavu zvířete, které uvádí CITES (Auliya et al. 2016). Evropská komise by měla tento problém co nejrychleji vyřešit, jinak nebude možné sledovat, jaké druhy obojživelníků se převáží přes hranice a zda nejsou infikovaní.

World Customs Organisation's harmonised system a CITES by se měly snažit zahrnout do dodatků více druhů a zároveň omezit či pozastavit mezinárodní obchod s ohroženými druhy. Komerční obchod by za žádnou cenu neměl ohrozit budoucí přežití obojživelníků.

Opatření mohou být i nelegislativní povahy. Například zvyšování povědomí širší veřejnosti – osvěta může být zprostředkována prostřednictvím odborných článků, internetových stránek, nebo také pořádáním přednášek pro širokou veřejnost. Nadále je důležité dbát hygienických pokynů pro zlepšení biologické bezpečnosti, používat osvědčené postupy nebo realizovat průzkumy populací mloka a zaznamenávat do přehledného protokolu změny s důrazem na zvýšenou úmrtnost a výskytu *Bsal*. Spojení několika opatření ke zmírnění rizika šíření zlepšuje celkovou účinnost.

5. Závěry

- Patogen *Batrachochytridium salamandrivorans* (*Bsal*) způsobuje s polečně se sesterským druhem *B. dendrobatidis* (*Bd*) vysoce nebezpečné onemocnění obojživelníků – chytridiomykózu. Na rozdíl od *Bd* napadá *Bsal* pouze ocasaté obojživelníky.
- Patogen *Bsal* pochází z jihovýchodní Asie, kde nepůsobí původním druhům potíže. K zavlečení do Evropy došlo prostřednictvím obchodu s mloky. Roku 2013 byla izolována a identifikována v Nizozemí, kde místní populace mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) klesla o 96 %.
- Patogen se rozšířil do několika evropských zemí – Nizozemí, Belgie, Německo Španělsko a Velká Británie. U volně žijících populací je přítomen v Nizozemí, Belgii, Španělsku a Německu a u zvířat chovaných v zajetí se objevil v Německu, Velké Británii, Belgii, Nizozemí a Španělsku.
- V ČR zatím patogen nedetekován, avšak hrozí zavlečení ze sousedního Německa, kde byl potvrzen. Praha a její okolí představují nejrizikovější oblasti pro zavlečení patogenu do volně žijících populací.
- K infikování dochází buď přímým kontaktem, či kontaktem se zoosporami na kontaminovaném substrátu. Patogen disponuje dvěma druhy sporami – pohyblivé zoospory ve vodním prostředí a encystované spory pohybující se mezi vzduchem a vodou.
- Mezi klinické příznaky patří viditelné kožní ulcerace (může se přidat i krvácení), opadávání kůže, neobvyklé držení těla, ochablý způsob plavání, anorexie, ataxie a smrt. Za nejčastěji používanou léčbu se považuje teplotní ošetření, nebo ošetření v kombinaci s vorikonazolem, polymyxinem E a teplotou. Za další způsoby léčby se považuje užití antimykotik v kombinaci s tepelným ošetřením.
- Možnosti prevence a ochrany spočívají v dodržování legislativních opatření, dbání hygienických pravidel a v organizovaném monitoringu populací. Hlavní výzvou je předejít zavlečení infikovaných druhů do populace volně žijících zvířat.
- Návrhy spočívají v časném prošetření mezer a nedostatků evropské legislativy týkající se mezinárodního obchodu se zvířaty. Potřeba šířit informace mezi chovatele a širokou veřejnost

6. Přehled literatury

- Altwegg R., Reyer H. (2003):** Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* 57: 872–882.
- Alworth L. C., Harvey S. B. (2007):** IACUC Issues Associated with Amphibian Research. *Institute for Animal Research Journal* 48: 278–289.
- AmphibiaWeb, ©2020:** Information on amphibian biology and conservation (online) [cit.2020.06.30], dostupné z <<http://amphibiaweb.org>>.
- Anderson P. K., Cunningham A. A., Patel N. K., Morales F. J., Epstein P. R., Daszak P. (2004):** Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 535–544.
- 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: 420–428.
- Arena P. C., Steedman E., Warwick C. (2012):** Amphibian and Reptile Pet Markets in the EU: an Investigation and Assessment (online) [cit.2020.04.05], dostupné z <[http://faada.org/userfiles/ARPM2012_v122\[2\].pdf](http://faada.org/userfiles/ARPM2012_v122[2].pdf)>.
- Arias-Robledo G., Stark T., Wall R., Stevens J. R. (2019a):** The toad fly *Lucilia bufonivora*: its evolutionary status and molecular identification. *Medical and Veterinary Entomology* 33: 131–139.
- Arias-Robledo G., Stevens J. R., Wall R. (2019b):** Spatial and temporal habitat partitioning by calliphorid blowflies. *Medical and Veterinary Entomology* 33: 228–237.
- Association of Fish and Wildlife Agencies, © 2018:** Bsal Rapid Response Plan Now Available (online) [cit.2020.06.22], dostupné z <<https://www.salamanderfungus.org/wp-content/uploads/2018/06/News-Release-Bsal-Rapid-Response-Plan-Now-Available.pdf>>.
- Auliya M., García-Moreno J., Schmidt B. R., Schmeller D. S., Hoogmoed D. S., Fisher M. C., Pasmans F., Henle K., Bickford D., Martel A. (2016):** The global amphibian trade flows through Europe: the need for enforcing and improving legislation. *Biodiversity and Conservation* 25: 2581–2595.
- Bai C. M., Garner T. W., Li Y. M. (2010):** First evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: discovery of chytridiomycosis in introduced American bullfrogs and native amphibians in the Yunnan Province, China. *Ecohealth* 7: 127–134.
- Bai C. M., Liu X., Fisher M. C., Garner T. W. J., Li Y. M. (2012):** Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China. *Diversity and Distributions* 18: 307–318.
- Baillie J., Griffiths J., Turvey S., Loh J., Collen B. (2010):** Evolution Lost: Status and Trends of the World's Vertebrates. *Zoological Society of London*, London.

- Baláž V., Vojar J., Civiš P., Andera M., Rozínek R. (2014):** Chytridiomycosis risk among Central European amphibians based on surveillance data. *Diseases of Aquatic Organisms 112*: 1–8.
- Baláž V., Gortázar Schmidt Ch., Murray K., Carnesecchi E., Garcia A., Gervelmeyer A., Martino L., Guajardo I. M., Verdonck F., Zancanaro G., Fabris Ch. (2017):** Scientific and technical assistance concerning the survival, establishment and spread of *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) in the EU. *EFSA Journal 15*: 4739.
- Baláž, V., Solský, M., González, D. L., Havlíková, B., Zamorano, J. G., Sevilleja, C. G., Torrent, L., Vojar, J. (2018):** First survey of the pathogenic fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in wild and captive amphibians in the Czech Republic. *Salamandra54*: 87–91.
- Bales E. K., Hyman O. J., Loudon A. H., Harris R. N., Lipps G., Chapman E., Roblee K., Kleopfer J. D., Terrell K. A. (2015):** Pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, but not *B. salamandrivorans*, detected on eastern hellbenders. *PLoS ONE 10*: e0116405.
- Barinaga M. (1990):** Where have all the froggies gone? *Science 247*: 1033–1034.
- Berger L., Speare R., Daszak P., Green D. E., Cunningham A. A., Goggin C. L., Slocombe R., Ragan M. A., Hyatt A. D., McDonald K. R., Hines H. B., Lips K. R., Marantelli G., Parkes H. (1998):** Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences 95*: 9031–9036.
- Berger L., Speare R., Hyatt A. (1999):** Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. *Declines and disappearances of Australian frogs. Environment Australia, Canberra 1999*: 23–33.
- Berger L., Hyatt A. D., Olsen V., Hengstberger S. G., Boyle D., Marantelli G., Humphreys K., Longcore J. E. (2002):** Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms 48*: 213–220.
- Berger L., Hyatt A. D., Speare R., Longcore J. E. (2005):** Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms 68*: 51–63.
- Berger L., Roberts A. A., Voyles J., Longcore J. E., Murray K. A., Skerratt L. F. (2016):** History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. *Fungal Ecology 19*: 89–99.
- Bern Convention, ©2015:** Bern Convention institutions - Meetings 2015, 35th Standing Committee meeting (online) [cit.2020.06.20], dostupné z <<https://www.coe.int/en/web/bern-convention/-/35th-standing-committee-meeting>>.
- BirdLife International (2015):** European Red List of Birds. *Office for Official Publications of the European Communities*, Luxembourg.

- BISE, ©2020:** Mid-term review of the EU biodiversity strategy to 2020 (online) [cit.2020.06.23], dostupné z <https://biodiversity.europa.eu/mtr/biodiversity-strategy-plan/target-5-details/#_ftn19>.
- Bishop P. J., Angulo A., Lewis J. P., Moore R. D., Rabb G. B., Garcia Moreno J. (2012):** The Amphibian Extinction Crisis—what will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan? (online) [cit.2020.06.21], dostupné z <<http://sapiens.revues.org/1406>>.
- Blaustein A. R., Wake D. B. (1990):** Declining amphibian populations: A global phenomenon? *Trends in Ecology & Evolution* 5: 203–204.
- Blaustein A. R., Andrew R., Romansic J. M., Kiesecker J. M., Hatch A. C. (2003):** Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity Distributions* 9: 123–140.
- Blaustein A. R., Dobson A. (2006):** Extinctions: a message from the frogs. *Nature* 439: 143–144.
- 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. (2015):** Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Scientific Reports* 5: 8037.
- Borroto-paéz R., Bosch R. A., Fabres B. A., García O. A. (2015):** Introduced amphibians and reptiles in the Cuban Archipelago. *Herpetological Conservation and Biology* 10: 985–1012.
- Boyle D. G., Boyle D. B., Olsen V., Morgan J. A. T., 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.
- Brannelly L. A., Hunter D. A., Skerratt L. F., Scheele B. C. Lenger D., McFadden M. S., Harlow P. S., Berger L. (2016):** Chytrid infection and post-release fitness in the reintroduction of an endangered alpine tree frog. *Animal Conservation*: 19: 153–162.
- Brunner, J. L., Storfer, A., Gray, M. J. & Hoverman, J. T. (2015):** Ranavirus Ecology and Evolution: From Epidemiology to Extinction. GRAY, Matthew J. a V. Gregory CHINCHAR, ed. *Ranaviruses*. Springer International Publishing, 2015: 71–104.
- 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.

- Candido M., Tavares L. S., Alencar A. L. F., Ferreira C. M., Queiroz S. R. A., Fernandes A. M., Sousa R. L. M. (2019):** Genome analysis of *Ranavirus frog virus 3* isolated from American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in South America. *Scientific Reports* 9: 2045–2322.
- Carey C., Cohen N., Rollins-Smith L. (1999):** Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental & Comparative Immunology* 23: 459–472.
- Carey C., Alexander M. A. (2003):** Climate change and amphibian declines: is there a link? *Diversity and Distributions* 9: 111–121.
- Carey C., Bradford F. D., Brunner J. L., Collins J. P., Davidson W. E., Longcore J. E., Ouellet M., Pessier A. P., Schock D. M. (2003):** Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Pensacola.
- CITES, ©2019:** Checklist of official listed CITES species (online) [cit.2020.06.17], dostupné z <<http://checklist.cites.org/#/en>>.
- Colling A. F. (2007):** Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 73: 175–192.
- Collins J. P., Storfer A. (2003):** Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9: 89–98.
- Converse S. J., Bailey L. L., Mosher B. A., Funk W. C., Gerner B. D., Muths E. (2016):** A model to inform management actions as a response to chytridiomycosis-associated decline. *EcoHealth* 14: 144–155.
- Cortéz-Goméz A. M., Ruiz-Agudelo C. A., Valencia-Aguilar A., Ladle R. J. (2015):** Ecological functions of neotropical amphibians and reptiles: a review. *Universal Scientific* 20: 229–245.
- Cummins C. (2003):** UV-B radiation, climate change and frogs—the importance of phenology. *Annales Zoologici Fennici* 39: 1–7.
- Cunningham A. A., Langton T. E., Bennett P. M., Lewin J. F., Drury S. E., Gough R. E., Macgregor S. K. (1996):** Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 351: 1539–57.
- Cunningham A. A., Beckman K. M., Perkins M., Fitzpatrick L., Cromie R., Redbond J., O’Brien M. F., Ghosh P., Shelton J., Fisher M. C. (2015):** Emerging disease in UK amphibians. *Veterinary Record* 176: 468–468.
- Daszak P. (2000):** Emerging Infectious Diseases of Wildlife. Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* 287: 443–449.
- De Paula C. D., Pacífico-Assis E. C., Catão-Dias J. L. (2012):** *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians confiscated from illegal wildlife trade and used in an ex situ breeding program in Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms* 98: 171–175.

- Dodd C. K. J., Smith L. (2003):** Habitat destruction and alteration: historical trends and future prospects for amphibians. In: R. D. Semlitsch (Ed.) *Amphibian Conservation* (pp. 93–112). Smithsonian Books, Washington and London.
- Duffus A. L. J., Waltzek T. B., Stöhr A. C., Allender M. C., Gotesman M., Whittington M. J., Hick P., Hines M. K., Marschang R. E. (2015):** Distribution and Host Range of Ranaviruses. Gray M. J., Chinchar V. G. ed. Ranaviruses. *Springer International Publishing, 2015: 9–57.*
- Eskew E. A., Todd B. D. (2013):** Parallels in Amphibian and Bat Declines from Pathogenic Fungi. *Emerging Infectious Diseases 19: 379–385.*
- Evropská komise, ©2016: SUMMARY REPORT OF THE STANDING COMMITTEE ON PLANTS, ANIMALS, FOOD AND FEED HELD IN BRUSSELS ON 05 JULY 2016 - 06 JULY 2016 (Section Animal Health & Welfare) (online) [cit.2020.06.23], dostupné z <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/reg_com_ahw_20160705_sum.pdf>.**
- Fahrig L., Pedlar J. H., Pope S. E., Taylor P. D., Wegner J. F. (1995):** Effect of road traffic on amphibian density. *Biological Conservation 73: 177–182.*
- Fellers G. M., Bradford D. F., Pratt D., Wood L. L. (2007):** Demise of repatriated populations of mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) in the Sierra Nevada of California. *Herpetological Conservation and Biology 2: 5–21.*
- Ficetola G. F., Bernardi F. D. (2004):** Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. *Biological Conservation 119: 219–230.*
- Fisher M. C., Garner T. W. J., Walker S. F. (2009):** Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Annual Review of Microbiology 63: 291–310.*
- Fitzpatrick L. D., Pasmans F., Martel A., Cunningham A. A. (2018):** Epidemiological tracing of *Batrachochytrium salamandrivorans* identifies widespread infection and associated mortalities in private amphibian collections. *Scientific Reports 8: 13845.*
- Frost D. R. (2015):** Amphibian species of the World: an online reference. *American Museum of Natural History*, New York.
- Funk W. C., Dunlap W. W. (1999):** Colonization of high-elevation lakes by long-toed salamanders (*Ambystoma macrodactylum*) after the extinction of introduced trout populations. *Canadian Journal of Zoology 77: 1759–1767.*
- 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: e35038.*
- Gerson H., Cudmore B., Mandrak N. E., Coote L. D., Farr K., Baillargeon G. (2008):** Monitoring international wildlife trade with coded species data. *Biological Conservation 22: 4–7.*

- Goddard J., De Jong G., Meyer F. (2020):** Unidirectional en masse larval dispersal of blow flies (Diptera: *Calliphoridae*). *Food Webs* 23: e00137.
- 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.
- González D. L., Baláž V., Solský M., Thumsová B., Kolenda K., Najbar A., Najbar B., Kautman M., Chajma P., Balogová M., Vojar J (2019):** Recent Findings of Potentially Lethal Salamander Fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Emerging Infectious Diseases* 25: 1416–1418.
- Garner T. W. J., Schmidt B. R., Martel A., Pasmans F., Muths E., Cunningham A. A., Weldon C., Fisher M. C., Bosch J. (2016):** Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. *Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371: 20160207.
- Goverse E., Smit G. F. J., Zuiderwijk A., Meij T. V. D. (2006):** The national amphibian monitoring program in the Netherlands and NATURA 2000. *Proceedings of the 13th Congress of the Societas Europaea Herpetologica*: 39–42.
- Gray M. J., Miller D. L., Hoverman J. T. (2009):** Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms* 87: 243–266.
- Gray M. J., Lewis J. P., Nanjappa P., Klocke B., Pasmans F., Martel A., Stephen C., Olea G. P., Smith S. A., Velat A. S., Christman M. R., Williams J. M., Olson D. H. (2015):** *Batrachochytrium salamandrivorans*: The North American Response and a Call for Action. *PLoS Pathog* 11: e1005251.
- Greulich K., Pflugmacher S. (2003):** Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology* 65: 329–336.
- Gubbels R. E. M. B. (2009):** Vuursalamander *Salamandra salamandra*. In: De amfibieën en reptielen van Nederland. *Nederlandse fauna* 9: 87–95.
- Hartog C., Leuven R.S.E.W., Christiaans M.M.C., Heijligers W.H.C. (1986):** Effects of water acidification on the distribution pattern and the reproductive success of amphibians. *Experientia* 42: 495–503.
- 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.
- Hels T. & Buchwald E. (2001):** The effect of road kills on amphibian populations. *Biological Conservation* 99: 331–340.
- 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. *The Herpetological Journal* 24: 103–110.

- Holmes C., Balls M. (1978):** In vitro studies on the control of myoepithelial cell contractions in the granular glands of *Xenopus laevis* skin. *General and Comparative Endocrinology* 36: 255–263.
- Houlahan J. E., Findlay C. S., Schmidt B. R., Meyer A. H., Kuzmin S. L. (2000):** Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404: 752–755.
- Hudson M. A., Young R. P., Lopez J., Martin L., Fenton C., McCrea R., GGriffiths R. A., Adams S. L., Gray G., Garcia G., Cunningham A. A. (2016):** In-situ itraconazole treatment improves survival rate during an amphibian chytridiomycosis epidemic. *Biological Conservation* 195: 37–45.
- Hyatt A. D., Gould A. R., Zupanovic Z., Cunningham A. A., Hengstberger S., Whittington R. J., Kattenbelt J., Coupar B. E. H. (2000):** Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology* 145: 301–331.
- Hyatt A. D., Boyle D. G., Olsen V., Boyle D. B., Berger L., Obendorf D., Dalton A., Kriger K., Hero M., Hines H., Phillott R., Campbell R., Marantelli G., Gleason F., Colling A. (2007):** Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 73: 175–192.
- 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**
- Cheng T. L., Rovito S. M., Wake D. B., Vredenburg V. T. (2011):** Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 9502–9507.
- Chinchar V. G. (2002):** Ranaviruses (family Iridoviridae): Emerging cold-blooded killers. *Archives of Virology* 147: 447–470.
- Chinchar V. G., Hick P., Ince I. A., Jancovich J. K., Marschang R., Qin Q., Subramaniam K., Waltzek T. B., Whittington R., Williams T., Zhang Q., ICTV Report Consortium (2017):** ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae. *Journal of General Virology* 98: 890–891.
- IUCN, ©2013:** Guidelines for reintroductions and other conservation translocations. Version 1.0. *IUCN Species Survival Commission*, Gland, Switzerland.
- IUCN, ©2015:** The IUCN Red List of Threatened Species (online) [cit.2020.01.28], dostupné z <<http://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics>>.
- James T. Y., Litvintseva A. P., Vilgalys R., Morgan J. A. T., Taylor J. W., Fisher M. C., Berger L., Weldon C., du Preez L., Longcore J. E. (2009):** Rapid Global Expansion of the Fungal Disease Chytridiomycosis into Declining and Healthy Amphibian Populations. *PLoS Pathogens* 5: e1000458.
- Johnson M. L., Speare R. (2003):** Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and control implications. *Emerging Infectious Diseases* 9: 922–925.

- Keane M., O'Toole M., Miller-Keane T. (2003):** Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health. *Saunders*, Amsterdam.
- Keele, D. J., DeLallo, V. C., Lewis, R. E., Ernst, E. J., Klepser, M. E. (2001):** Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 41*: 121–126.
- Kiesecker J. M., Blaustein A. R., Belden L. K. (2001):** Complex causes of amphibian population declines. *Nature 410*: 681–684.
- Kiesecker J. M. (2003):** Invasive species as a global problem. Toward understanding the worldwide decline of amphibians. In: R. D. Semlitsch (Ed.) *Amphibian Conservation* (pp. 113–126). Smithsonian Books, Washington and London. Lacey Act (18 U.S.C. 42): The Lacey Act provides authority to the Secretary of the Interior to designate injurious wildlife and ensure the humane treatment of wildlife shipped to the United States, v platném znění.
- Kilpatrick A. M. (2006):** Facilitating the evolution of resistance to avian malaria in Hawaiian birds. *Biological Conservation 128*: 475–485.
- Kilpatrick A. M., Briggs C. J., Daszak P. (2010):** The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution 25*: 109–118.
- Klocke B., Becker M., Lewis J., Fleischer R. C., Muletz-Woltz C. R., Rockwood L., Aguirre A. A., Gratwicke B. (2017):** *Batrachochytrium salamandrivorans* not detected in U.S. survey of pet salamanders. *Scientific Reports 7*: 13132.
- König E., Bininda-Emonds O. R. P., Shawb Ch. (2015):** The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides 63*: 96–117.
- Kontoyiannis D. P., Lewis R. E., Sagar N., May G., Prince R. A., Rolston K. V. I. (2000):** Itraconazole-Amphotericin B Antagonism in *Aspergillus fumigatus*: an E-Test-Based Strategy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44*: 2915–2918.
- 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.
- Langwig K. E., Voyles J., Wilber M. Q., Frick W. F., Bolker B. M., Collins J. P., Cheng T. L., Fisher M. C., Hoyt J. R., Lindner D. L., McCallum H. I., Puschendorf R., Rosenblum E. B., Toothman M., Willis C. K. R., Briggs CH. J., Kilpatrick A. M. (2015):** Context-dependent conservation responses to emerging wildlife diseases. *Frontiers in Ecology and the Environment 13*: 195–202.
- Laurance W. F., McDonald K. R., Speare R. (1996):** Epidemic Disease and the Catastrophic Decline of Australian Rain Forest Frogs. *Conservation Biology 10*: 406–413.

- Lewis, R. E., Diekema, D. J., Messer, S. A., Pfaller, M. A., Klepser, M. E. (2002):** Comparison of Etest, chequerboard dilution and timekill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49: 345–351.
- Logan J., Edwards K., Saunders N. (2004):** Real-time PCR: an essential guide. *Horizon Bioscience*, Wymondham.
- 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.
- Longcore J. R., Longcore J. E., Pessier A. P., Halteman W. A. (2007):** Chytridiomycosis widespread in anurans of northeastern United States. *Journal of Wildlife Management* 71: 435–444.
- Mader D. R. (2006):** Reptile Medicine and Surgery, 2nd edn. *Saunders Elsevier*, St Louis.
- Marantelli G., Humphreys K., Longcore J. E. (2002):** Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* 48: 213–220.
- 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: official publication of the International Society for Human and Animal 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., Farrer R. A., Schmidt B. R., Tobler U., Goka K., Lips K. R., Muletz C., Zamudio K. R., Bosch J., Lötters S., Wombwell E., Garner T. W. J., Cunningham A. A., Spitzen-van der Sluijs A., Salvidio S., Ducatelle R., Nishikawa K., Nguyen T. T., Kolby J. E., Van Bocxlaer I., Bossuyt F., Pasmans F. (2014):** Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* 346: 630–631.
- Martel A., Vila-Escale M., Fernández-Giberteau D., Martínez-Silvestre A., Canessa S., Praet S. V., Pannon P., Chiers K., Ferran A., Kelly M., Picart M., Piulats D., Li Z., Pagone V., Pérez-Sorribes L., Molina C., Tarragó-Guarro A., Velarde-Nieto R., Carbonell F., Obon E., Martínez-Martínez D., Guinart D., Casanovas R., Carranza S., Pasmans F. (2020):** Integral chain management of wildlife diseases. *Conservation Letters* 13: e12707.

- McMahon T. A., Brannelly L. A., Chatfield M. W. H., Johnson P. T. J., Joseph M. B., McKenzie V. J., Richards-Zawacki C. L., Venesky M. D., Rohr J. R. (2013):** Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 210–215.
- Minnis A. M., Lindner R. L. (2013):** Phylogenetic evaluation of Geomyces and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biology* 117: 638–649.
- Mohneke M., Onadeko A. B., Hirschfeld M., Petersen M., Rödel M. O. (2010):** Dried or fried: amphibians in local and regional food markets in West Africa. *TRAFFIC Bulletin* 22:117–128.
- More S., Angel Miranda M., Bicout D., Bøtner, A., Butterworth A., Calistri P., Depner K., Edwards S., Garin-Bastuji B., Good M., Michel V., Raj M., Nielsen S. S., Sihvonen L., Spoolder H., Stegeman J. A., Thulke H. H., Velarde A., Willeberg P., Winckler CH., Baláž V., Martel A., Murray K., Fabris Ch., Munoz-Gajardo I., Gogin A., Verdonck F., Schmid CH. G. (2018):** Risk of survival, establishment and spread of *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) in the EU. *EFSA Journal* 16: 5259.
- Muir A. P., Kilbride E., Mable B. K. (2015):** Spatial variation in species composition of Saprolegnia, a parasitic oomycete of amphibian eggs, in Scotland. *Herpetological Journal* 25: 257–263.
- Muletz C., Caruso N. M., Fleischer R. C., McDiarmid R. W., Lips K. R., Stajich J. E. (2014):** Unexpected Rarity of the Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Appalachian Plethodon Salamanders: 1957–2011. *PLoS ONE* 9: e103728.
- Muths E., Bailey L. L., Watry M. K. (2014):** Animal reintroductions: an innovative assessment of survival. *Biological Conservation* 172: 200–208.
- Mutschmann F. (2015):** Chytridiomycosis in Amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine* 24: 276-282.
- MŽP, ©2019:** CITES kvůli kritickému vymírání zpřísní podmínky mezinárodního obchodu s ohroženými druhy (online) [cit.2020.06.17], dostupné z <https://www.mzp.cz/cz/news_20190903_CITES_zprisni_podminky_mezinarodniho_obchodu_s_ohrozenymi_druhy>.
- Nijman V. (2010):** An overview of international wildlife trade from Southeast Asia. *Biodiversity and Conservation* 19: 1101–1114.

- OIE, ©2015:** World Organisation for Animal Health (OIE) and CITES agree to collaborate on animal health and welfare issues worldwide to safeguard biodiversity and protect animals (online) [cit.2020.06.19], dostupné z <<https://www.oie.int/en/for-the-media/press-releases/detail/article/world-organisation-for-animal-health-oie-and-cites-agree-to-collaborate-on-animal-health-and-welfa/>>.
- OIE, ©2020:** OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2020 (online) [cit.2020.06.19], dostupné z <<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>>.
- 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.
- Ortiz-Santaliestra M. E., Fisher M. C., Fernández-Beaskoetxea S., Fernández-Benítez M. J., Bosch J. (2011):** Ambient Ultraviolet B Radiation and Prevalence of Infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* in Two Amphibian Species. *Conservation Biology* 25: 975–982.
- Peel A. J., Hartley M., Cunningham A. A. (2012):** Qualitative risk analysis of introducing *Batrachochytrium dendrobatidis* to the UK through the importation of live amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* 98: 95–112.
- Perroti M. G., Basanta M. D., Steciow M. M., Sandoval-Sierra J. V., Diéguez-Uribeondo J. (2013):** Early breeding protects anuran eggs from Saprolegnia infection. *Austral Ecology* 38: 672–679.
- Piotrowski J. S., Annis S. L., Longcore J. E. (2004):** Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9–15.
- Plehn M. (1920):** Neue Parasiten in Haut und Kiemen von Fischen, *Ichthyochytrium* u. *Mucophilus* (New parasites in the skin and gills of fishes, *Ichthyochytrium* and *Mucophilus*). *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde Abteilung* 82: 275–281.
- Pounds J. A., Bustamante M. R., Coloma L. A., Consuegra J. A., Fogden M. P. L., Foster P. N., La Marca E., Masters K. L., Merino-Viteri A., Puschendorf R., Ron S. R., Sánchez-Azofeifa G. A., Still C. J., Young B. E. (2006):** Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439: 161–167.
- Prováděcí rozhodnutí komise EU 2018/320,** o některých ochranných veterinárních opatřeních pro obchod s mloky uvnitř Unie a dovoz těchto zvířat do Unie v souvislosti s plísni *Batrachochytrium salamandrivorans*, v platném znění.
- Rachowicz L. J., Hero J.-M., Alford R. A., Taylor J. W., Morgan J. A. T., Vredenburg V. T., Collins J., Briggs C. J. (2005):** The Novel and Endemic Pathogen Hypotheses: Competing Explanations for the Origin of Emerging Infectious Diseases of Wildlife. *Conservation Biology* 19: 1441–1448.

- Ramsey J. P., Reinert L. K., Harper L. K., Woodhams D. C., Rollins-Smith L. A. (2010):** Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity* 78: 3981–3992.
- Rija A. A., Khatibu F. H., Kohi E. M., Muheto R. (2011):** Status and reintroduction of the Kihansi spray toad *Nectophrynoides asperginis* in Kihansi gorge: challenges and opportunities. *In Proc. of the 7th TAWIRI Scientific Conference*, pp. 11–20.
- Robinson J., Griffiths R. A., Jeffries P. (2003):** Susceptibility of frog (*Rana temporaria*) and toad (*Bufo bufo*) eggs to invasion by *Saprolegnia*. *Amphibia-Reptilia* 24: 261–268.
- Rollins-Smith L. A. (2009):** The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochemica et Biophysica Acta* 1788: 1593–1599.
- Rollins-Smith L. A., Ramsey J. P., Pask J. D., Reinert L. K., Woodhams D. C. (2011):** Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integrative and Comparative Biology* 51: 552–562.
- Rollins-Smith L. A., Woodhams D. C. (2012):** Amphibian immunity: staying in tune with the environment. In: Demas G. E., Nelson R. J. (Eds.), *Eco-immunology*. Oxford University Press: 92–143.
- Rollins-Smith L. A. (2017):** Amphibian immunity–stress, disease, and climate change. *Developmental & Comparative Immunology* 66: 111–119.
- Romansic J. M. (2007):** The Effects of Multiple Pathogens on Amphibians in the Pacific Northwest. Oregon State University, Zoology, Oregon. 163 s. (disertační práce). „nepublikováno“. Dep. Archive of Oregon State University.
- Rosen, G. E., Smith, K. F. (2010):** Summarizing the Evidence on the International Trade in Illegal Wildlife. *EcoHealth* 7: 24–32.
- 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: 411–416.
- Sabino-Pinto J., Veith M., Vences M., Steinfartz S. (2018):** Asymptomatic infection of the fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in captivity. *Scientific Reports* 8: 11767.
- Savage A. E., Zamudio K. R. (2016):** Adaptive tolerance to a pathogenic fungus drives major histocompatibility complex evolution in natural amphibian populations. *Proceedings of the Royal Society B* 283: 20153115.
- 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. *Biological Conservation* 25: 965–974.

- Seimon T. A., Seimon A., Daszak P., Halloy S. R. P., Schloegel L. M., Aguilar C. A., Sowell P., Hyatt A. D., Konecky B., Simmons J. E. (2007):** Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. *Global Change Biology* 13: 288–299.
- Scheele B. C., Hunter D. A., Skerratt L. F., Brannelly L. A., Driscoll D. A. (2015):** Low impact of chytridiomycosis on frog recruitment enables persistence in refuges despite high adult mortality. *Conservation Biology* 182: 36–43.
- Schlaepfer M. M., Hoover C., Dodd C. K. J. (2005):** Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *Bioscience* 55: 256–264.
- Schloegel L. M., Picco A. M., Kilpatrick A. M., Davies A. J., Hyatt A. D., Daszak P. (2009):** Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation* 142: 1420–1426.
- 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.
- Schmidt R. B., Claudio B., Lötters S., Steinfartz S. (2017):** Supplementary material from "Dynamics of host populations affected by the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans*". *Royal Society Open Science* 4: c. 3699070.
- Schultze M. (2001):** PCR. *Heredity* 86: 513-514.
- Sillero N., Campos J., Bonardi A., Corti C., Creemers R., Crochet P. A., Crnobrnja-Isailovic J., Denoël M., Ficetola G. F., Goncalves J., Kuzmin S., Lymberakis, P., Pous P., Rodriguez A., Sindaco R., Speybroeck J., Toxopeus A. G., Vieites Vences D. R. M. (2014):** Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles in Europe: open access. *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* 4: 125–134.
- Skerratt L. F., Berger L., Clemann N., Hunter D. A., Marantelli G., Newell D. A., Philips A., Mc Fadden, Hines H. B., Scheele B. C., Brannelly L. A., Speare R., Versteegen S., Cashins S. D., West M. (2016):** Priorities for management of chytridiomycosis in Australia: saving frogs from extinction. *European Journal of Wildlife Research* 43: 105–120.
- 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.

- Spitzen-van der Sluijs A., Spikmans F., Bosman W., Zeeuw M. de, Meij T. van der, Goverse E., Kik M., Pasmans F., Martel A. (2013):** Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia* 34: 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., Marina 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: 1286–1288.
- Stebbins R. C., Cohen N. W. (1995):** A natural history of amphibians. *Princeton University Press*, New Jersey.
- 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 extinctions worldwide. *Science* 306: 1783–1786.
- Stuart S. N., Hoffmann M., Chanson J. S., Cox N. A., Berridge R. J., Ramani P., Young, B. E. (2008):** Threatened amphibians of the world. *Lynx Edicions, IUCN and Conservation International*, Barcelona: IUCN, Gland: Conservation International.
- Šťastný K., Červený J., Rom J., Solský M., Hanel L., Andreska J., Vojar J., Kerouš K. (2015):** Prague. Kelcey J. G., ed. Vertebrates and Invertebrates of European Cities: Selected Non-Avian Fauna. *Springer New York 2015*: 119-153.
- SVS, ©2020:** Veterinární opatření v případě obchodu a dovozu zásilek s mloky (online) [cit.2020.06.30], dostupné z <<https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/mloci/>>.
- Tantawi T. I., Whitworth T. L. (2014):** First record of *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876 (Diptera: Calliphoridae) from North America and key to North America species of the *L. bufonivora* species group. *Zootaxa* 3881: 101-124.
- Temple H. J., Terry A. (2007):** The Status and Distribution of European Mammals. *Office for Official Publications of the European Communities*, Luxembourg.
- Temple H. J., Cox N. A. (2009):** European Red List of Amphibians. *Office for Official Publications of the European Communities*, Luxembourg.
- Tevini M., Behnke H. D., Lüttge U., Esser K., Kadereit J. W., Runge M. (1994):** UV-B Effects on Terrestrial Plants and Aquatic Organisms. *Springer Berlin Heidelberg*.
- Uller T., Sagvik J., Olsson M. (2009):** Pre-hatching exposure to water mold reduces size at metamorphosis in the moor frog. *Oecologia* 160: 9-14.
- UNEP-WCMC (2016):** Review of the risk posed by importing Asiatic species of Caudate amphibians (salamanders and newts) into the EU. SRG 76/10. *UNEP-WCMC*, Cambridge.

- Van Rooij P., Martel A., Haesebrouck F., Pasmans F. (2015):** Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research* 46: 137.
- Van West P. (2006):** *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 20: 99-104.
- Venesky M. D., Mendelson III 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. *Conservation Biology* 26: 586–592.
- Vié J.-C., Hilton-Taylor C., Stuart S. N. (2009):** Wildlife in a Changing World: An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species. Gland, Switzerland: *IUCN*.
- Vredenburg V. T., Briggs C. J., Harris R. N. (2011):** Host pathogen dynamics of amphibian chytridiomycosis: the role of the skin microbiome in health and disease. In Fungal diseases: an emerging threat to human, animal, and plant health (eds L Olson, E Choffnes, D Relman, L Pray). *National Academy Press*, Washington DC.
- Vredenburg V. T., Knapp R. A., Tunstall T. S., Briggs C. J. (2010):** Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9689–9694.
- Wake D. B. (1991):** Declining amphibian populations. *Science (New York, N.Y.)* 13: 8–12.
- Warkentin I. G., Bickford D., Navjot S. S., Bradshaw C. J. A. (2009):** Eating Frogs to Extinction. *Conservation Biology* 23: 1056-1059.
- Whiles M. R., Hall R. O. Jr., Dodds W. K., Verburg P., Huryn A. D., Lips K. R., Kilham S. S., Colón-Gaud C., Rugenski A. T., Peterson S., Conelly S. (2013):** Disease-driven amphibian declines alter ecosystem processes in a tropical stream. *Ecosystem* 16: 146–157.
- White C., Forzan M., Pessier A., Alender M. C., Ballard J. R., Catenazzi A., Fenton H., Martel A., Pasmans F., Miller D., Ossiboff R., Richgels K., Kerby J. (2016):** Amphibian: A Case Definition and Diagnostic Criteria for *Batrachochytrium salamandrivorans* Chytridiomycosis. *Herpetological Review* 47: 207.
- Whittington R. & Reddacliff G. (1995):** Influence of environmental temperature on experimental infection of redbfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Australian Veterinary Journal* 72: 421–424.
- Williams T., Barbosa-Solomieu V., Chinchar, V. G. (2005):** A Decade of Advances in Iridovirus Research. *Advances in Virus Research* 65: 173–248.
- Woodhams D. C., Bosch J., Briggs C. J., Cashins S., Davis L. R., Lauer A., E. Muths, Puschendorf R., Schmidt B. R., Sheafor B., Voyles J. (2011):** Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Front Zool* 8: 1742-9994.

- Woodhams D. C., Bletz M., Kueneman J., McKenzie V. (2016):** Managing Amphibian Disease with Skin Microbiota. *Trends in Microbiology* 24: 161-164.
- Yap T. A., Koo M. S., Ambrose R. F., Wake D. B., Vredenburg V. T. (2015):** Averting a North American biodiversity crisis. *Science* 349: 481–482.
- Young S., Berger L., Speare R. (2007):** Amphibian chytridiomycosis: strategies for captive management and conservation. *International Zoo Yearbook* 41: 1–11.
- Yuan Z., Martel A., Wu J., Van Praet S., Canessa S., Pasmans F. (2018):** Widespread occurrence of an emerging fungal pathogen in heavily traded Chinese urodelan species. *Conservation Letters* 11: e12436.
- Zákon č. 114/1992 Sb.,** o ochraně přírody a krajiny, v platném znění.
- Zhu J., Zhang L., Li W., Han S., Yang W., Qi L. (2013):** Reference Gene Selection for Quantitative Real-time PCR Normalization in *Caragana intermedia* under Different Abiotic Stress Conditions. *PLoS ONE* 8: e53196.