

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Ekologie



**Bc. Jiří Svoboda**

Přenos a detekce račího moru v experimentálních podmínkách  
*Transmission and detection of the crayfish plague pathogen  
under experimental conditions*

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Adam Petrusek, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Eva Kozubíková

Praha 2011

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. srpna 2011.

## Poděkování

Člověk si málokdy najde vhodnou příležitost pro poděkování všem lidem, jejichž pomoc na své životní cestě využil. Stalo se dobrým zvykem, že jednou z několika výjimek je doba sepisování diplomové práce. Pravděpodobně nejsem první, koho až překvapilo, jak velké je množství lidí, kterým by se slušelo poděkovat. A to dokonce i v případě, že omezím své vzpomínky pouze na činnosti úzce spojené s touto diplomovou prací.

Předně děkuji, Adame, Tobě, za energii a čas, který jsi mi věnoval navzdory svému mnohdy opravdu velmi nabitému programu. Myslím, že pod Tvým vedením se mi podařilo blížít se poměrně zdatně k limitům svých možností, což je asi výsledek, za který se nemusí stydět ani jeden z nás, ať už to z pohledu přínosu lidskému poznání nebo publikačních výstupů dopadalo jakkoliv. Evo, Tobě děkuju hlavně za to, jak jsi mě uvedla do laboratorního prostředí a provázela mě odbornou stránkou studijního života na fakultě. Byla jsi pro mě opravdu důležitým článkem, který mi přiblížil onen vyšší svět vysoké školy. Svým příkladem jsi mi ukázala, že i smrtelník může opravdu tu výšku úspěšně zdolat, i když laťka to byla i tak velmi vysoká. Kromě školitele a konzultantky mě vědecké práci učili i Javier Diéguez-Uribeondo a María Paz Martín z Královské botanické zahrady v Madridu. Cenné rady a hlavně pomoc s praktickou stránkou pokusů mi hojně poskytovali Pavel Kozák, Miloš Buřič a Antonín Kouba z Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech. Odborné otázky experimentální práce mi pomáhali řešit Trude Vrålstad a Michal Koblížek. Na odchytu raků a provádění experimentů se podíleli i Cristina Gonzalo a Klára Matasová. Technické zázemí i rady k některým částem mé práce laskavě nabídli Ondřej Koukol, Tomáš Fér a Štěpánka Hrdá. Nástrahy každodenní laboratorní práce mi pomáhali zvládat Veronika Kučabová, Eva Dušková, Eva Hamrová, Tereza Konvalinková, Zuzana Kolářová, Kristýna Černá a další. Těžkosti při následném zpracování dat a jejich prezentaci jsem zvládal i díky pomoci Petra Jana Juračky, Martina Krajíčka a Radka Lüftnera. Mnoho formulačních nedostatků a chyb v textu této práce jsem odstranil díky Haně Vaněčkové, Lucii Diblíkové a Kláře Matasové.

Tíhu studentských povinností (nejen při psaní této práce) mi umožnili snášet svou pomocí, povzbuzením či jen milou přítomností mnozí mí kolegové z katedry ekologie. Lidí, je vás hodně a nerad bych na někoho zapomněl, tak mi prosím promiňte, že vás nebudu všechny jmenovat. Pod dojmem zážitků z posledních týdnů, které jsem věnoval psaní této práce, nemohu nevzpomenout vás dva, Lucko, Radku. Vězte, že pokud bych měl možnost vybrat si

lidi do svého budoucího pracovního kolektivu, vás dva bych tam vzal určitě. Za kamarádský přístup a vytvoření fajn atmosféry na kurzech a v pracovně studentů děkuju i Hance, Lence, Martinovi, Martině, Janě, Inés, Martině, Jakobovi, Tondovi, Luce, Kláře, Janě a dalším a dalším.

A když už byli jmenováni snad všichni, se kterými mě pojí fakulta, nabízí se asi vhodný prostor i pro ty, se kterými mě nepojí (jen) fakulta. Jejich role v mém životě je samozřejmě odlišná a vděčnost za ni by měla být projevována hlavně jinde, než na těchto stránkách. Nicméně, bez podpory své rodiny bych tuto práci v této podobě rozhodně nikdy nesepsal. Drazí rodičové a sourozenci, děkuju za to, že jste mě vždycky podporovali a tvořili pro mě tolik důležitý pevný bod ve vesmíru. Víím, že taková charakteristika role v mém dosavadním životě asi není podle vašich představ, ale přesnější vyjádření mě nenapadá. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Hance, Markétě, Veronice, Martinovi a Lukášovi, tedy svým přátelům, kteří mi zůstali nakloněni a pomáhali mi sbírat síly pro studium, ačkoliv jsem si na ně jen zřídka našel čas.

Jak vidno, ono omezení poděkování pouze na lidi, kteří mi pomáhali, abych dokázal sepsat tuto práci, nebylo až tak selektivní – jmenována nakonec byla velká část lidí, kterých si i z čistě osobních a osobnostních důvodů vážím. Proto si po poděkováních dovoluji ještě jednu omluvu. Omlouvám se všem výše jmenovaným, že práce, v níž se v poděkování objevilo jejich jméno, nebyla ještě o něco lepší.

## **Finanční podpora**

Tento diplomový projekt byl v různých svých částech financován výzkumnými záměry Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (MSM0021620828) a Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického Jihočeské univerzity (MSM6007665809), Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK; jsem jedním z řešitelů projektu č. 154110), Evropskou unií financovaným programem SYNTHESYS (projekt ES-TAF-485, jehož jsem byl řešitelem), Fondem mobility Univerzity Karlovy a Nadáním Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových.

## Obsah

Abstrakt .....	5
Abstract .....	6
Úvod .....	7
Cíle práce .....	11
Metody detekce a kvantifikace <i>Aphanomyces astaci</i> .....	12
Metodika.....	19
Akvariijní pokusy .....	19
Izolace DNA z tkání raků .....	23
Izolace DNA z filtrů .....	24
<i>Real-time</i> PCR .....	25
Kontroly kontaminace .....	27
Kvantifikace spor ve vodě akvárií .....	28
Interpretace výsledků detekce patogenu v tkáních raků .....	31
Statistické zpracování dat .....	34
Výsledky.....	37
Detekce <i>Aphanomyces astaci</i> ve tkáních raků.....	37
Detekce a kvantifikace spor <i>Aphanomyces astaci</i> zachycených na filtrech .....	42
Diskuse .....	47
Faktory ovlivňující uvolňování spor z donorů a přenos na recipienty .....	47
Detekce spor <i>Aphanomyces astaci</i> zachycených na filtrech .....	52
Absolutní kvantifikace spor <i>Aphanomyces astaci</i> .....	53
Přetrvávání <i>Aphanomyces astaci</i> v kutikule severoamerických raků.....	56
Závěr.....	57
Seznam zkratk .....	59
Seznam literatury.....	60
Přílohy .....	65

## Abstrakt

*Aphanomyces astaci*, původce račího moru, představuje jednu z nejzávažnějších hrozeb pro původní evropské druhy raků, mezi které patří například rak říční (*Astacus astacus*). Jediným dosud známým způsobem jejich ochrany proti této chorobě je zabránit rozšíření původce račího moru do zbývajících populací. Významným zdrojem nákazy je ve střední Evropě rak pruhovaný (*Orconectes limosus*), původem severoamerický druh raka, který může ve svých tkáních původce račího moru dlouhodobě hostit. V odborné literatuře se objevily různé hypotézy o časovém omezení šíření *A. astaci* ze severoamerických raků, například na období jejich úhynu či svlékání, dosud však bez věrohodné experimentální podpory. Cílem této práce bylo zejména testovat, zda je přenos *A. astaci* ze severoamerických raků omezen pouze na období jejich svlékání či úhynu. Za tímto účelem byly provedeny pokusy o přenos *A. astaci*, ve kterých jako zdroj infekce sloužili raci pruhovaní parazitovaní původcem račího moru a jako recipienti nenakažení raci pruhovaní či raci říční. Dosaženo bylo prvního relativně spolehlivě doloženého přenosu *A. astaci* na raka pruhovaného v experimentálních podmínkách. Celkově však snadněji docházelo k přenosu *A. astaci* na raky říční. Výsledky pokusů jednoznačně dokazují, že spory *A. astaci* se z raků pruhovaných mohou šířit i mimo období jejich svlékání či úhynu, a to v množství dostatečném pro infikování raků říčních. Kvantifikací spor patogenu zachycených filtrováním vody z pokusných akvárií bylo zjištěno, že koncentrace spor uvolněných z raka pruhovaného se v čase řádově mění. Výsledky kvantifikace spor podporují hypotézu, že jednou z příčin zvýšeného uvolňování spor je svlékání raků. Naopak rozsah infekce v kutikule živých raků pruhovaných nejspíše výrazný vliv na množství uvolňovaných spor nemá. Přínos práce spočívá i v zavedení nejnovější metody kvantifikace spor do laboratoří Přírodovědecké fakulty UK. Tato metoda se ukázala jako vhodné doplnění tradičního způsobu detekce pomocí infekčních pokusů a mohla by být užita pro řešení některých z nezodpovězených otázek o přenosu *A. astaci*, které jsou v této práci naznačeny.

Klíčová slova: přenos, detekce, sporulace, *real-time* PCR, *Aphanomyces astaci*, *Orconectes limosus*, *Astacus astacus*.

## Abstract

The crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, is one of the most serious threats to European indigenous crayfish species, e.g., the noble crayfish (*Astacus astacus*). The only way to protect susceptible crayfish species from the disease is to prevent the dispersion of the pathogen to their populations. One of the most important sources of the crayfish plague pathogen in Central Europe is the spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*), a species of North American origin, which can carry the parasite in its cuticle for years. Some literature sources claimed that the pathogen dispersion from the American vectors is restricted to periods of moulting or to the time before and after the crayfish death. However, experimental evidence for such hypotheses was lacking. The main aim of my thesis was to test these predictions, and the alternative scenario that the crayfish plague pathogen can be transmitted from the infected spiny-cheek crayfish also in other periods. For this purpose, experiments were set up to investigate *A. astaci* transmission from infected spiny-cheek crayfish to non-infected spiny-cheek or noble crayfish. As expected, the pathogen was transmitted to noble crayfish much more easily than to the uninfected American host. Nevertheless, we succeeded in the pathogen transmission also among spiny-cheek crayfish, probably for the first time under experimental conditions. The experiments provided a clear evidence that *A. astaci* can be transmitted to susceptible crayfish even if the American host is neither moulting nor dying. I quantified the amount of spores present in the aquarium water by filtering defined volume through filters. The results show that the concentrations of the pathogen spores released from the spiny-cheek crayfish substantially changed during the experiments. The results support the hypothesis that more spores are released during moulting of the host. On the contrary, the effect of the pathogen amount detected in the host tissues was not significant. A new method for *A. astaci* spore detection and quantification was introduced to laboratories of Charles University of Prague and it was confirmed as an approach that can be an addition to infection experiments. The thesis also highlights possible topics for future research.

Key words: transmission, detection, sporulation, *real-time* PCR, *Aphanomyces astaci*, *Orconectes limosus*, *Astacus astacus*.

# Úvod

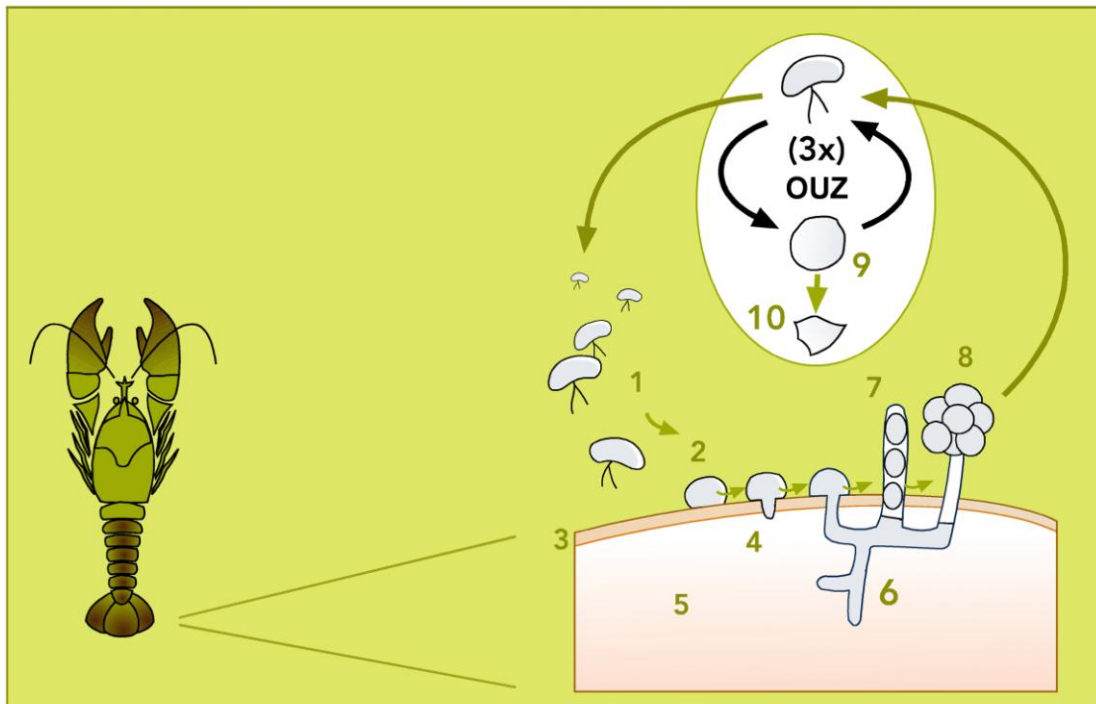
Ústředním tématem této diplomové práce je oomycet *Aphanomyces astaci* a jím působený račí mor. Toto onemocnění představuje jeden z nejvýznamnějších faktorů ohrožujících původní evropské druhy raků jak v komerčních chovech, tak i ve zbývajících volně žijících populacích (Füreder 2006). Proto byl zařazen mezi 100 nejvýznamnějších invazních druhů světa (Lowe a kol. 2004). Na katedře ekologie Přírodovědecké fakulty UK se výzkumu tohoto onemocnění věnuje pozornost již přibližně osm let, jak dokazuje množství recentně publikovaných článků (Kozubíková a kol. 2006; 2007; 2008; 2009; 2011b) i připravovaných rukopisů (Kozubíková a kol. 2011a; 2011c; Svoboda a kol. 2011).

Dosud jediným způsobem, kterým lze omezit škody páchané račím morem v populacích původních evropských druhů raků, je bránit šíření *A. astaci* na nové lokality. Léčení již nakažených jedinců totiž zatím není možné, jak shrnuje například manuál Světové organizace pro zdraví zvířat (OIE 2009). Způsoby prevence šíření navržené v odborné literatuře lze rozdělit na prevenci zavlékání nakažených raků na nové lokality a prevenci přenosu samotných infekčních stadií *A. astaci* (Svoboda 2009). Mimo své hostitele přežívá *A. astaci* pouze ve vodě či ve vlhku (Söderhäll a Cerenius 1999). Proto mohou být volně žijící stadia zavlékána na nové lokality převážením vody mezi povodími nebo na povrchu vlhkých předmětů (Alderman a kol. 1987). Tomu lze předejít dokonalým vysušením, chemickou dezinfekcí či vyloučením přesunů vody a předmětů z lokalit s výskytem *A. astaci* (Stephens 2005). Kvůli náročnosti takových opatření je však velmi důležité vědět, zda musí být aplikována stále, nebo zda se v některých obdobích propagule patogenu ve vodě nevyskytují. To bylo jednou z motivací pro vytyčení ústřední otázky této diplomové práce: „Je šíření volně žijících stadií *A. astaci* závislé na stavu hostitele?“ Pochopení dosud nalezených dílčích odpovědí a konkrétnějších cílů této práce však vyžaduje alespoň základní seznámení s životem původce račího moru.

Životní cyklus *A. astaci* je znázorněn na obrázku 1. Jeho podrobnější popis byl již publikován jak v anglickém, tak v českém jazyce (Cerenius a kol. 1988; Kozubíková a Petrussek 2009), zde shrnu jen základní fakta. Račí mor je důsledkem růstu hyf *A. astaci* v napadených tkáních hostitelů. Hyfy (vlákna) vytvářející mycelium rostoucí v těle raka (5) mohou prorůst epikutikulou (3) a vytvářet vně těla hostitele sporangia s tzv. primárními spory (7). Po uvolnění ze sporangia se primární spory přemění v primární cysty, které se v obvyklých podmínkách shluknou poblíž ústí sporangia (8). Z primárních cyst se uvolní

bičíkaté zoospory (1), které ve vodním prostředí hledají vhodného hostitele. Pokud jej naleznou, vytvoří na jeho povrchu sekundární cystu (2), jež později vyklíčí (4) a založí v tkáních hostitele nové mycelium (6). Protože však mechanismus vyhledávání hostitele není příliš specifický (Cerenius a Söderhäll 1984a), může se stát, že dojde k přeměně v cystu na povrchu nevhodného hostitele nebo substrátu. V takovém případě se z cysty může opět uvolnit zoospora (9) schopná pokračovat v hledání vhodnějšího hostitele. Tento proces se nazývá opakované uvolnění zoospory (na obrázku 1 popsáno zkratkou OUZ) a buňka jej postupně může prodělat i třikrát (Cerenius a Söderhäll 1984b). Opakované uvolnění zoospory zvyšuje pravděpodobnost úspěšného zakončení životního cyklu *A. astaci* přisednutím zoospory na tělo raka. Pokud se tento cíl přesto nenaplní, parazit uhynie (10).

Všechna výše zmíněná volně žijící jednobuněčná stadia, tedy primární spory, primární cysty, zoospory i sekundární cysty, bývají někdy označována souhrnným termínem „spory“ (Strand a kol. 2011). V této práci jej budu používat, jelikož rozlišování jednotlivých stadií spor nebylo pro účely mého výzkumu nutné, neboť všechna zmíněná stadia mohou být přítomna ve vodě s napadeným hostitelem a všechna slouží k šíření parazita. Navíc se poměry jednotlivých stadií v suspenzi během mnou použitých laboratorních postupů měnily, zejména přeměna zoospor v cysty může být snadno vyvolána, mimo jiné změnou teploty, třepáním či prouděním média (Svensson a Unestam 1975; Olson a kol. 1984), které mohou při práci se sporami nastat i nechtěně, například vytažením jejich suspenzí z inkubátorů či pipetováním.



**Obrázek 1:** Životní cyklus *Aphanomyces astaci*. Upraveno dle Diéguez-Uribeonda (2006) se svolením autora. 1 – zoospora, 2 – encystace, 3 – epikutikula, 4 – klíčící cysta, 5 – endokutikula a další tkáň raka, 6 – hyfy (vlákna), 7 – sporangium, 8 – shluk primárních cyst, 9 – sekundární cysta, 10 – uhynulá cysta, OUZ – opakované uvolnění zoospory.

Nedílnou součástí životního cyklu parazita jsou i jeho hostitelé, kterými jsou v případě *A. astaci* raci (Söderhäll a Cerenius 1999). Kromě nich byl zatím růst *A. astaci* pozorován nejspíše jen na krabu čínském (*Eriocheir sinensis*) (Benisch 1940). Původem evropské druhy raků, například rak říční (*Astacus astacus*) nebo rak bahenní (*Astacus leptodactylus*), jsou vůči *A. astaci* velmi citlivé a po napadení se u nich rozvíjí fatální onemocnění račí mor (Unestam 1969a; Alderman a kol. 1987). Na území Evropy se však vyskytují i druhy raků pocházející ze Severní Ameriky, například rak signální (*Pacifastacus leniusculus*), rak pruhovaný (*Orconectes limosus*) a rak červený (*Procambarus clarkii*) (Holdich a kol. 2006). V těchto severoamerických racích bývá růst *A. astaci* omezen na kutikulu a inhibován v důsledku imunitních reakcí raka (Unestam 1969a, 1972, 1975). Protože takový stav nevede k úhynu hostitele, bývá nazýván jako chronická forma, chronická fáze či benigní forma račího moru (Vey a kol. 1983; Söderhäll a Cerenius 1999). Pokud je však imunitní systém severoamerických raků experimentálně oslaben, dochází k rozrůstání hyf *A. astaci* v kutikule i uvnitř těla a raci následkem onemocnění hynou (Unestam a Söderhäll 1977; Persson

a Söderhäll 1983; Persson a kol. 1987). K tomuto přechodu z chronické fáze do akutní fáze či maligní formy, jak se takové projevy nazývají (Vey a kol. 1983; Söderhäll a Cerenius 1999), pravděpodobně dochází i následkem stresu (Cerenius a kol. 1988; Diéguez-Uribeondo a Söderhäll 1993) či poškozením povrchu těla raků (Vey a kol. 1983; Diéguez-Uribeondo a Söderhäll 1993). Mimo experimentální podmínky byly maligní formy infekce severoamerických raků pozorovány jak v komerčních chovech (Viljamaa-Dirks 2008), tak ve volné přírodě (Cerenius a kol. 1988). Obecně však severoameričtí raci přežívají parazitování *A. astaci* mnohem déle než původní evropské druhy raků, a proto mohou působit jako stálý zdroj nákazy, jak bylo prokázáno i v experimentálním prostředí (Vey a kol. 1983; Järvenpää a kol. 1986; Diéguez-Uribeondo a Söderhäll 1993). Ve střední Evropě je velmi významným rezervoárem původce račího moru rak pruhovaný (Kozubíková a kol. 2009; Kozubíková a kol. 2011c).

Původce račího moru je na svého hostitele velmi úzce vázán, mycelium rostoucí v tělech raků je specializováno na parazitický způsob života do té míry, že mimo tkáň hostitelů za normálních okolností nepřežívá (Söderhäll a Cerenius 1999), nejspíš v důsledku interakcí se saprofytickými oomycety a bakteriemi (Cerenius a kol. 2002). Ve volném prostředí se *A. astaci* vyskytuje pouze ve formě spor. Odborná literatura dosud nabízí spíše dílčí poznatky o délce přežívání spor. Nejdelší dobu výskytu cysty udávají Alderman a Polglase (1986), a to osm až dvanáct hodin. Životnost zoospor bývá odhadována v řádu dnů (Olson a kol. 1984; Alderman a Polglase 1986, Unestam 1966). Pro přenos račího moru je však rozhodující spíše suma doby přežití všech po sobě následujících volně žijících stadií. Její maximum dosahuje ve sterilním médiu nejméně dvou měsíců (Unestam 1966). Výsledky infekčních pokusů nicméně ukazují, že suspenze spor jsou schopné infikování hostitelů pouze přibližně jeden týden (Unestam 1969b) a obvyklá délka přežívání spor se odhaduje v řádu dnů (Vogt 1999; Cerenius a kol. 2002; Evans a Edgerton 2002). Pro odpověď na otázku, zda je šíření patogenu z infikovaných raků nějak časově omezeno, je tedy rozhodující načasování uvolňování spor z hostitelů. Podle některých souhrnných článků je uvolňování spor omezeno na pokročilejší stadia nemoci (Söderhäll a Cerenius 1999) či na období úhynu hostitelů (Evans a Edgerton 2002). Avšak jak bylo uvedeno výše, průběh nemoci se liší u evropských a severoamerických druhů, a proto je smysluplné popisovat načasování sporulace parazita z raků těchto dvou skupin odděleně. Z evropských druhů raků se zoospory uvolňují podle některých autorů pouze v období úhynu (Söderhäll a Cerenius 1999) či alespoň pokročilého stadia nemoci (Vogt 1999; Oidtmann a kol. 2002). Ve skutečnosti není tato podmínka příliš

omezující, neboť v tělech evropských druhů raků se patogen rozrůstá poměrně rychle a k úhynu obvykle dochází do několika týdnů od nákazy (Unestam 1969a, 1975; Vey a kol. 1983). I když v literatuře existuje i několik výjimečných pozorování, které se z tohoto pravidla vymykají - dlouhodobé přežívání evropských druhů raků na lokalitách s výskytem *A. astaci* (Viljamaa-Dirks 2008; Svoboda a kol. 2011) či relativně nízká mortalita po vystavení sporám *A. astaci* v experimentálním prostředí (Unestam 1969a). Naopak, druhy raků pocházející ze Severní Ameriky mohou přežívat infekci *A. astaci* mnohem déle. Prokázáno bylo přežívání infikovaných raků po dobu více než jednoho roku (Unestam 1972). Sporulace by z těchto druhů mohla probíhat neustále, jak navrhli Nylund a Westman (2000). V odborné literatuře však bylo již mnohokrát zmíněno, že sporulace z těl severoamerických raků závisí na jejich stavu. Níže uvádím v jednoduchém přehledu několik příkladů stavů raků, které podle různých prací doprovází uvolňování spor.

- úhyn (Diéguez-Uribeondo a Söderhäll 1993; Oidtmann 2000; Oidtmann a kol. 2002; Oidtmann a kol. 2004)
- svlékání (Oidtmann 2000; Oidtmann a kol. 2002; Cerenius a kol. 2003; Oidtmann a kol. 2004; Oidtmann a kol. 2006)
- oslabení imunity (Persson a Söderhäll 1983; Söderhäll a Cerenius 1999; Cerenius a kol. 2003)
- stres (Diéguez-Uribeondo a Söderhäll 1993; Söderhäll a Cerenius 1999; Vogt 1999; Cerenius a kol. 2003).

Detailní prozkoumání citované literatury však ukazuje, že načasování sporulace není objasněno tak dobře, jak by se mohlo podle přehledu zdát. Žádný z článků není věnován vlivu stavu raků na uvolňování spor. Citovaná tvrzení se totiž obvykle nacházejí pouze v úvodu prací řešících jinou problematiku, nebo jde o obecné souhrnné články. Navíc obvykle schází zdroj uváděné informace o období sporulace. Výjimkou jsou pouze dvě experimentální práce (Persson a Söderhäll 1983; Diéguez-Uribeondo a Söderhäll 1993), které však sporulaci mimo jimi uváděné mimořádné stavy (oslabení imunity raků, působení stresu) nevyklučují.

## **Cíle práce**

Hlavním cílem této práce bylo přispět k odhalení procesů sporulace a přenosu račího moru testováním základní hypotézy, že *A. astaci* se na nové hostitele přenáší z parazitovaných severoamerických raků pouze v období jejich úhynu či svlékání. K testování bylo využito

akvarijských pokusů, které jsem provedl ve spolupráci s odborníky z Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech. V prvním roce byly provedeny pokusy o přenos z parazitovaných raků pruhovaných na neinfikované raky pruhované a raky říční. Výsledky těchto prvních experimentů naznačily, že výše formulovaná hypotéza nejspíše neplatí. Cílem dalších pokusů bylo získat věrohodnější data navýšením počtu opakování pokusu a pokusit se testovat hypotézy: 1) Pravděpodobnost přenosu *A. astaci* je větší, dojde-li k úhynu či ke svlékání parazitovaného raka; 2) Pravděpodobnost přenosu *A. astaci* je větší, pokud je infekce v parazitovaném rakovi rozsáhlejší.

Navíc byly pokusy v druhém roce rozšířeny o filtrování vody z akvárií za účelem zachycení spor *A. astaci*. Tyto filtry měly být po optimalizování a kalibraci potřebné metody kvantifikace využity pro otestování hypotézy, že spory *A. astaci* se z hostitelů uvolňují ve stále stejné míře, nezávisle na jejich svlékání či úhynu. Ještě před popis metodiky, která byla použita pro testování vytyčených hypotéz, zařazuji pro dosažení větší srozumitelnosti následujících částí této práce kapitulu shrnující některá základní fakta o metodách detekce a kvantifikace *A. astaci*.

### **Metody detekce a kvantifikace *Aphanomyces astaci***

Původce račího moru může být detekován více metodami, které se liší v nejrůznějších ohledech (Cerenius a kol. 1988; Oidtmann a kol. 2006; Hochwimmer a kol. 2009; Vrålstad a kol. 2009). Z hlediska interpretace výsledných dat jsou rozhodující jejich citlivost a specifita, tedy míra schopnosti detekovat co nejnižší množství patogenu a schopnost detekovat pouze *A. astaci*. Proto v následujícím textu diskutuji vedle základního principu metody vždy i její citlivost a specifitu. Nejprve se věnuji metodám detekce patogenu v tkáních raků, na ně navazují metody detekce spor ve vodě a kapitolu uzavírá popis metody kvantifikace *A. astaci*.

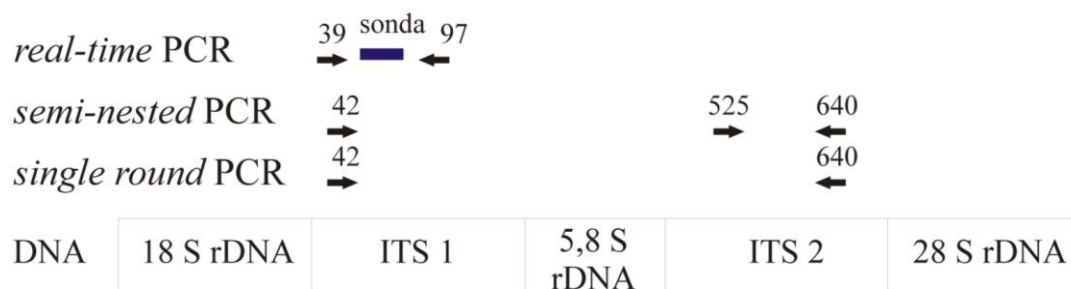
Raci mohou jevit v důsledku napadení parazitem změny ve zbarvení některých částí kutikuly (tmavé melaninové skvrny) či svaloviny (zesvětlení) a citlivé druhy raků mohou měnit své chování – pozorovány bývají například denní aktivita, oslabení únikového reflexu, škrábání vlastního těla, poloha na zádech či paralýza (OIE 2009). Mikroskopické pozorování jejich kutikuly může odhalit hyfy odpovídající morfologicky *A. astaci*, případně mohou být pozorována i další stadia životního cyklu parazita (OIE 2009). Avšak ani podle příznaků, ani podle mikroskopického pozorování nelze druh *A. astaci* s jistotou určit, neboť obdobně

vypadají i další parazitické či saprofytické druhy oomycetů (Cerenius a kol. 1988; Oidtmann a kol. 1999; OIE 2009).

Jednu možnost spolehlivé **detekce *A. astaci* v tkáních raků** představuje kombinace izolace čisté kultury patogenu a infekčních pokusů s citlivými druhy raků, například s rakem říčním (Alderman a Polglase 1986; Cerenius a kol. 1988; Royo a kol. 2004). Specifická této metody je sice optimální, ale její použití vyžaduje minimálně dva až tři týdny, a navíc je citlivost této metody poměrně nízká – ani při optimálních podmínkách se patogen nepodaří izolovat přibližně z jedné třetiny počtu raků prokazatelně zasažených račím morem (Oidtmann a kol. 1999). Dosažení vyšší úspěšnosti totiž brání interakce *A. astaci* s dalšími druhy mikroorganismů a omezený výběr tkání, z nichž bývá patogen izolován (Alderman a Polglase 1986; Oidtmann a kol. 2004; Viljamaa-Dirks a Heinikainen 2006).

Výrazné urychlení a zvýšení citlivosti detekce *A. astaci* v tkáních raků přinesly molekulární metody (Oidtmann a kol. 2004; Oidtmann a kol. 2006; Hochwimmer a kol. 2009; Vrålstad a kol. 2009). Jejich principem je amplifikace specifických úseků genetické informace parazita v DNA izolované z vyšetřovaných raků. Hmotnost tkání, z nichž může být najednou DNA izolována, je velmi omezená. Proto je nutné vybírat pro izolaci DNA jen vzorek některých tkání. Podle dosavadních prací je největší pravděpodobnosti detekce parazita dosaženo při izolaci z ocasní ploutvičky (Oidtmann a kol. 2006; Vrålstad a kol. v tisku), měkkých částí kutikuly ze spodní strany zadečku (Oidtmann a kol. 2006) a oční stopky (Oidtmann a kol. 2004).

Amplifikace specifických úseků genetické informace parazita probíhá pomocí polymerázové řetězové reakce (dále jen „PCR“). Specifitu zajišťují primery vážící se na část nekódující sekvence DNA parazita, konkrétně na takzvané oblasti ITS (*internal transcribed spacer*). Postupně byly pro detekci *A. astaci* využity dvě základní metody PCR: konvenční PCR v kombinaci s agarózovou elektroforézou a kvantitativní *real-time* PCR (dále jen „*real-time* PCR“). Konvenční PCR byla navržena ve více variantách (Oidtmann a kol. 2004; Oidtmann a kol. 2006), z nichž se v naší laboratoři používají nejnovější dvě: tzv. *semi-nested* PCR a *single round* PCR (Oidtmann a kol. 2006). Uvedené metody se liší mimo jiné používanými primery, jak je naznačeno na obrázku 2.



**Obrázek 2:** Schematické znázornění části genetické informace *A. astaci* a primerů používaných při *semi-nested* PCR, *single round* PCR a *real-time* PCR (zkompileováno dle Oidtmann a kol. 2004; Oidtmann a kol. 2006; Vrålstad a kol. 2009).

Základem *single round* PCR je namnožení úseku DNA *A. astaci* o délce 569 nukleotidů za pomoci specifických primerů označovaných čísly 42 a 640 (Oidtmann a kol. 2006). Při *semi-nested* PCR se využívá podobně jako v případě *nested* PCR dvou do sebe „vnořených“ reakcí (tedy druhá reakce využívá produkt první reakce a amplifikuje z něj kratší fragment), ale u *semi-nested* je jeden primer (640) v obou navazujících PCR shodný. Produktem *semi-nested* PCR sledovaného úseku DNA *A. astaci* je fragment o délce 115 nukleotidů. Uvedené primery (42, 525, 640) sice během PCR mohou nasedat i na DNA jiných druhů, ale produkty takových reakcí mívají (zejména u fylogeneticky vzdálenějších druhů) jinou délku, což se projeví odlišnou pozicí fragmentů po následné agarózové elektroforéze.

Základem *real-time* PCR je také množení druhově specifického úseku DNA. První ze dvou dosud navržených variant cílí na část úseku ITS a zahrnuje kromě druhově specifických primerů ještě specifickou sondu MGB (*minor groove binder*) (Vrålstad a kol. 2009). Sonda z případné směsi namnožených fragmentů DNA označuje s vysokou specificitou pouze ty, jež obsahují sekvenci s ní komplementární, jak je naznačeno na obrázku 2. Po připojení sondy na sledovaný, k ní komplementární úsek DNA, dochází k fluorescenci. Intenzita fluorescence tedy roste s přibývajícím počtem kopií sledovaného úseku DNA. Princip kvantifikace spočívá v určení počtu cyklů, které musely proběhnout, aby bylo dosaženo stanovené míry fluorescence v reakční směsi. Naměřený počet cyklů se označuje jako Ct (*cycle threshold*). Druhá varianta *real-time* PCR, která na obrázku není znázorněna, cílí na geny pro chitinázu (Hochwimmer a kol. 2009), dosahuje nižší citlivosti (Tuffs a Oidtmann 2011) a v této práci jí už nebude věnována pozornost. Bude-li tedy v textu užito termínu „*real-time* PCR“, bude jím míněna varianta cílená na ITS dle doktorky Vrålstad a kol. (2009).

**Citlivost** PCR metod bývá popisována pomocí detekčního limitu, což je nejmenší množství DNA vedoucí k pozitivním výsledkům detekce v nejméně 95 % opakování reakce (Vrålstad a kol. 2009). Detekční limit *single round* i *semi-nested* PCR byl stanoven na 100 fg DNA izolované z mycelia *A. astaci* (Oidtmann a kol. 2006), ale zkušenosti Kozubíkové a kol. (2011c) naznačují, že *semi-nested* PCR je citlivější (viz níže). Velikost genomu *A. astaci* sice není známa, nicméně soudě podle velikosti genomů ostatních oomycetů může mít hmotnost přibližně 20 až 250 fg (Kamoun 2003). Detekční limit obou verzí PCR tedy odpovídá zhruba 0,4 až 5 násobku množství DNA *A. astaci* nacházející se v jedné spoře. Vzhledem k tomu, že množství DNA *A. astaci* bude v této práci zmiňováno ještě mnohokrát, budu používat pro průměrné množství DNA *A. astaci* obsažené v jedné spoře označení „C“ a udávat množství DNA *A. astaci* v násobcích C, stejně jako doktorka Vrålstad a kol. (2009). Označení vychází z anglického výrazu *C-value*, které označuje velikost jednoho genomu (Greilhuber a kol. 2005).<sup>1</sup>

V naší laboratoři bývá do jedné PCR reakce obvykle přidávána dvacetina DNA izolované z původního vzorku (10 µl ze 200 µl izolátu), a proto jsou na úrovni limitu izoláty ze vzorků obsahujících 8 až 100 C. Teoreticky tedy může být pomocí obou variant využívajících konvenční PCR spolehlivě detekován *A. astaci* ve vzorcích obsahujících alespoň desítky genomových jednotek. Pro *real-time* PCR byl původně vytyčen limit detekce na 160 fg DNA (Vrålstad a kol. 2009), novější studie naznačuje, že by mohl být limit detekce ještě nižší, cca 50 fg DNA *A. astaci* (Tuffs a Oidtmann 2011). Počítáme-li s genomem o velikosti 20 až 250 fg DNA odpovídá 50 fg DNA 0,2 až 2,5 C. V naší laboratoři bývá do *real-time* PCR přidávána jedna dvacetina izolátu (5 µl z celkových 100 µl izolátu), a proto jsou na úrovni limitu detekce izoláty ze vzorků obsahujících 4 až 50 C. O vyšší citlivosti *real-time* PCR ve srovnání se *single round* PCR vypovídají i výsledky další studie (Tuffs a Oidtmann 2011).

Citlivost metod *real-time* PCR, *semi-nested* PCR a *single round* PCR byla též porovnáována pomocí 460 izolátů DNA z kutikuly raků (každý z jednoho jedince raka pruhovaného nebo raka signálního) získaných z volně žijících populací invazních druhů raků ve střední Evropě (Kozubíková a kol. 2011c). Metody byly podle stoupajícího podílu pozitivních výsledků detekce seřazeny takto: *single round* PCR, *semi-nested* PCR, *real-time*

---

<sup>1</sup> V anglicky psané literatuře bývá pro průměrné množství DNA z jedné spory používán spíše výraz *genomic unit* (Vrålstad a kol. 2009, Strand a kol. 2011), ale jeho překlad v českém jazyce není dosud ustálený.

PCR. Vysvětlením vyššího počtu pozitivních výsledků při *semi-nested* PCR oproti *single round* PCR by mohla být, vedle účinnější amplifikace v důsledku dvou navazujících PCR, její nižší náchylnost k degradaci detekované DNA (Kozubíková a kol. 2011c). Ostatně již dříve byla *semi-nested* PCR ze stejného důvodu doporučována pro detekci z materiálu, který byl před izolací DNA skladován ve zmrzlém stavu, jelikož tento způsob uchování vzorků může vést k fragmentaci DNA (Oidtmann a kol. 2006).

Citlivost uvedených metod (*semi-nested* PCR, *single round* PCR i *real-time* PCR) však může být snížena v důsledku přítomnosti různých inhibitorů reakce v izolátu DNA, odkud se dostávají do reakční směsi PCR. Pro odhalení **inhibice** je možné otestovat vzorky naředěné (Vrålstad a kol. 2009; Strand a kol. 2011), protože by ředěním snížená koncentrace inhibujících látek měla podstatně méně ovlivňovat výsledek reakce. U *semi-nested* PCR a *single round* PCR je možno na inhibici usuzovat, jestliže je výsledek detekce plné koncentrace vzorku negativní a výsledek detekce ředěného vzorku pozitivní, nebo když se intenzita proužků na agarózovém gelu dramaticky odlišuje. Při *real-time* PCR lze kromě takové markantní inhibice odhalit též inhibici slabší, a to porovnáním výsledků kvantifikace plně koncentrovaného a ředěného vzorku. Byla-li totiž reakce plně koncentrovaného vzorku inhibována (či inhibována více než PCR ředěného vzorku), pak je rozdíl jejich výsledků menší, než by měl teoreticky v důsledku ředění být (Vrålstad a kol. 2009). Podrobněji se inhibicí *real-time* PCR zabývali Strand a kol. (2011), kteří experimentálně ověřovali možnosti jejího potlačení. Jejich výsledky ukázaly, že inhibici vzorků z přírodních lokalit nejlépe eliminuje speciální *Taq Man Environmental Master Mix* (Applied Biosystems) nahrazující v reakční směsi původně používaný *Taq Man Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

Obě varianty konvenční PCR i *real-time* PCR detekují všech pět známých geneticky odlišitelných skupin kmenů *A. astaci* (Oidtmann a kol. 2006; Vrålstad a kol. 2009; Kozubíková a kol. 2011c). Druhým kritériem **specificity** je, aby nedocházelo k pozitivním výsledkům v důsledku přítomnosti DNA jiných druhů. V tomto ohledu je *semi-nested* PCR v porovnání se *single round* PCR méně specifická. Pozitivní výsledky detekce *semi-nested* PCR totiž způsobuje i DNA blízce příbuzných druhů *Aphanomyces invadans* a *A. frigidophilus*, byť pouze v případě, že se do PCR dostane extrémně vysoké množství jejich DNA, konkrétně 40 000 až 400 000 násobků velikosti genomu těchto druhů (Oidtmann a kol. 2006). Je tedy poměrně nepravděpodobné, že by byly výsledky standardně získaných vzorků (izolát DNA z maximálně 50 mg kutikuly raka) ovlivněny falešně pozitivními signály

způsobenými těmito druhy (Oidtmann a kol. 2006). Avšak takové nežádoucí ovlivnění výsledků již bylo odhaleno i při použití *single round* PCR, a to ve vzorku s výskytem DNA dosud nepopsaného druhu rodu *Aphanomyces* (Kozubíková a kol. 2009). Naproti tomu *real-time* PCR reagovala i v tomto případě správně, tedy negativně (Kozubíková a kol. 2011c). Tato metoda totiž používanou kombinací primerů a sondy dosahuje vyšší specifity, a ani DNA druhů *A. invadans* a *A. frigidophilus* neovlivňuje její výsledky detekce (Vrålstad a kol. 2009). Avšak nelze vyloučit, že v budoucnu dojde k odhalení dalších příbuzných druhů rodu *Aphanomyces*, které by mohly ovlivňovat výsledky detekce při ještě nižších koncentracích své DNA (Oidtmann a kol. 2006; Kozubíková a kol. 2011c; Tuffs a Oidtmann 2011).

**K detekci spor *A. astaci* ve vodě** je již po desítky let používána metoda založená na infekčních pokusech s citlivými druhy raků (Alderman a Polglase 1986; Cerenius a kol. 1988; Schulz a kol. 2002; Taugbøl 2004). Raci jsou při ní nejprve vystaveni testované vodě a poté je v jejich tkáních detekován *A. astaci* některou z výše uvedených metod. Avšak o infikování nového hostitele rozhoduje kromě přítomnosti spor patogenu i mnoho dalších faktorů, které byly shrnuty například v rešerši Stephense a kol. (2005). Některé z těchto faktorů bývají při pokusech, které zahrnují více paralelních pokusných akvárií, ve všech akváriích na stejné úrovni (druhová příslušnost recipientů, hustota recipientů, přísun potravy, manipulace s raky, teplota vody, salinita vody, stres vyplývající z experimentálních podmínek, kmen *A. astaci*). Mohou se však lišit mezi jednotlivými studii, což brání jednoduchému porovnávání výsledků. Jiné faktory (například koncentrace spor, poškození povrchu těla, svlékání raka, napadení dalšími parazity, kvalita vody) se obvykle liší i mezi jednotlivými pokusnými akvárii.

Nejnovějším způsobem detekce spor *A. astaci* ve vodě je využití molekulárních metod. Ačkoliv první metoda molekulární detekce spor *A. astaci* byla známa již dříve (Oidtmann a kol. 2006), výraznější posun v experimentálních možnostech znamenala až *real-time* PCR umožňující i kvantifikaci spor (Strand a kol. 2011). Primárním výstupem *real-time* PCR jsou hodnoty Ct jednotlivých vzorků. Ty však umožňují pouze relativní porovnání koncentrací sledovaného úseku DNA ve vzorcích měřených zároveň, tj. v rámci jednoho běhu *real-time* PCR. Aby bylo možno porovnávat vzorky z různých běhů či kvantifikovat DNA absolutně, zařazují se do každé reakce tzv. standardy se známým množstvím DNA. Standardy se připravují ředěním izolátu DNA z mycelia *A. astaci*, jehož koncentrace ( $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) byla stanovena spektrofotometricky. Množství sledované DNA ve

vzorcích je pak vypočteno díky naměřeným Ct vzorků a standardů z téhož běhu a bývá vyjadřováno pomocí jednotek PFU (*PCR-forming units*) (Vrålstad a kol. 2009; Strand a kol. 2011). Hodnota PFU je teoreticky vypočítaný minimální počet kopií sledovaného úseku DNA ve vzorku, které sloužily během PCR jako matrice. Při interpretaci vypočtených hodnot je pak kromě limitu detekce užíván i limit kvantifikace, tedy nejnižší koncentrace umožňující kvantifikaci s dostatečně malou variabilitou naměřených hodnot (Vrålstad a kol. 2009). Limit kvantifikace byl v původní práci popisující tuto detekční metodu stanoven na desetinásobek limitu detekce, tedy 50 PFU či 1590 fg DNA (Vrålstad a kol. 2009).

Naměřené hodnoty PFU mohou být pro účely interpretace dat vyjádřeny pomocí stupnice podle doktorky Vrålstad a kol. (2009). Ta rozděluje vzorky podle stoupajícího množství detekované DNA *A. astaci* do kategorií A<sub>0</sub> až A<sub>7</sub> (podrobné vymezení kategorií je v příloze 1). Protože je však tato stupnice poměrně podrobná, budu při hrubějším rozdělení výsledků, které je užitečné zejména při rozhodování o přítomnosti či nepřítomnosti patogenu ve vzorku, rozlišovat výsledky negativní (patogen nebyl detekován, kategorie A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>) a pozitivní (patogen byl detekován, kategorie A<sub>2</sub> až A<sub>7</sub>). Další možností, jak výsledky kvantifikace pomocí *real-time* PCR vyjádřit, je převést naměřené hodnoty PFU na počet násobků velikosti genomu (C). Nejprve je však nutné zjistit, kolik PFU odpovídá genetické informaci obsažené v jedné spoře (1 C). Tato hodnota, nadále označovaná „PFU<sub>spory</sub>“, se stanovuje empiricky pomocí *real-time* PCR izolátů DNA ze známých množství spor (Strand a kol. 2011) a o jejím stanovení bude konkrétněji pojednáno v následující kapitole.

## Metodika

### Akvarijní pokusy

Základem experimentální části mé práce byly akvarijní pokusy o přenos patogenu račího moru mezi raky, které proběhly v letních měsících let 2008 a 2009. Raky z těchto akvárií budu v této práci označovat jako donory a recipienty – donor je jedinec sloužící jako zdroj *A. astaci*, zatímco recipient je jedinec sloužící jako „příjemce“ *A. astaci*, tedy potenciální nový hostitel. Donory byli ve všech pokusech raci pruhovaní, zatímco recipienti náleželi ke druhům rak říční či rak pruhovaný. Obrázek 3 zachycuje jedno z experimentálních akvárií z roku 2008 s rakem říčním. Donor je ukrytý v plastové rouře uzavřené na koncích kovovou mřížkou.



**Obrázek 3:** Experimentální akvárium. V rohu akvária je recipient (rak říční), donor (rak pruhovaný) je v úkrytu zhotoveném z plastové roury a kovové mřížky.

Všichni donoři byli odchyceni v rybníku v obci Smečno (50°11'18" s. š., 14°02'49" v. d.). Přítomnost původce račího moru v tamější populaci raků pruhovaných byla v nedávné době spolehlivě prokázána izolací čistých kultur patogenu (Kozubíková a kol.

2011b) a dále pomocí molekulárních metod (*semi-nested* PCR, *real-time* PCR, sekvenace; Matasová a kol. 2011). Pro potřeby mého experimentu bylo pochopitelně žádoucí, aby v tělech všech donorů byly přítomny hyfy *A. astaci*. Prevalence parazita byla ve Smečně v období let 2006 až 2009 velmi vysoká – patogen byl detekován v tělech 93 z 98 vyšetřovaných raků (Matasová a kol. 2011). Všem 35 donorům byl před zahájením pokusů odstřižen jeden uropod. V téměř všech těchto uropodech byl *A. astaci* detekován, jak je podrobněji uvedeno v příloze 2. Výjimku tvoří negativní výsledek detekce v uropodu jednoho donora. Avšak výsledek detekce patogenu v jeho těle po ukončení pokusu byl pozitivní, přičemž pravděpodobnost vzájemné kontaminace akvárií byla minimalizována a k infikování raků pruhovaných většinou nedocházelo ani po několika týdnech ve společném akváriu s donorem. Patogen tedy s největší pravděpodobností již před zahájením experimentu rostl na jiné části těla dotyčného donora.

Množství DNA patogenu v izolátech z těl donorů odebraných z akvárií po úhynu či ukončení pokusů odpovídalo tisícům až milionům C (příloha 2). Povrch těl raků byl přitom před odběrem tkání důkladně otírán vatovým tamponem, a proto není pravděpodobné, že by takto velké množství DNA parazita mohlo pocházet pouze ze spor přichycených na povrchu těl. Navíc odběr uropodů a těl dělily až tři měsíce, což je doba, která nejspíše přesahuje životnost spor *A. astaci* (Vogt 1999; Cerenius a kol. 2002; Evans a Edgerton 2002). Proto považuji přítomnost hyf *A. astaci* v tkáních všech donorů za prokázanou. Vzhledem k tomu, že šlo o jedince z populace jednoho malého rybníka, sdíleli donoři velmi pravděpodobně stejný kmen *A. astaci*, konkrétně kmen OrI, který je dosud jediným zástupcem skupiny genotypů označené písmenem E (Kozubíková a kol. 2011b).

Raci pruhovaní sloužící jako recipienti pocházeli z lomu Starý Klíčov (49°23'30" s. š., 12°57'51" v. d.). Podle sledování v letech 2005–2009 populace raků pruhovaných v lomu Starý Klíčov nehostí *A. astaci* buď vůbec, nebo jím je nakažen jen velmi malý podíl raků – podle *real-time* PCR byl patogen detekován pouze v jednom ze 132 vyšetřovaných raků, a to ještě pod limitem kvantifikace (Matasová a kol. 2011). Navíc ani v jednom uropodu recipientů druhu rak pruhovaný nebyl *A. astaci* detekován (kategorie A<sub>0</sub>). Před zahájením pokusů tedy *A. astaci* v tělech těchto raků s největší pravděpodobností přítomen nebyl.

Raci říční (sloužící výhradně jako recipienti infekce) byli odloveni z vodní nádrže Světlohorská (49°00'23" s. š., 13°3'44" v. d.). Jejich odchyt a transport zajistili spolupracovníci z Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického, kteří byli oprávněni k experimentální práci s tímto zákonem chráněným druhem. Vzhledem k tomu, že populace

raků říčních při zasažení *A. astaci* obvykle podléhají hromadnému hynutí (Unestam 1975), lze absenci takového masového úhynu v posledních několika letech považovat za přesvědčivý doklad nepřítomnosti původce račího moru v tamější populaci.

Všichni naložení raci (donoři i recipienti) byli po několik týdnů před zahájením experimentů přechovávaní v akváriích tak, že raci pocházející z téže lokality sdíleli jedno akvárium. Přitom byl vyloučen přenos raků či spor *A. astaci* mezi jednotlivými akvárii. Každému jedinci byl před zahájením pokusů sterilními nůžkami odstrižen jeden uropod pro kontrolní analýzy na přítomnost či nepřítomnost patogenu před pokusem. Všem rakům byla změřena posuvným měřítkem délka od vrcholu rostra po konec telsonu a určeno jejich pohlaví, zjištěné údaje shrnuje příloha 3.

Raci byli při zahájení experimentu vkládáni do pěti litrů vodovodní pitné vody, jejíž teplota byla vyrovnána s teplotou místnosti. Během pokusů se podle výsledků každodenních měření teplota vody v akváriích pohybovala mezi 19 °C a 23 °C. Uspořádání pokusů mělo umožnit šíření patogenu z donora na recipienta pouze v rámci jednotlivých akvárií. Raci sdílející akvárium byli odděleni kovovou mřížkou či pletivem, což omezilo jejich fyzický kontakt a zabránilo kanibalismu, ale zároveň umožňovalo proudění vody v celém objemu akvária, které bylo zajištěno pomocí vzduchovacího kamínku. Proti šíření patogenu aerosolem bylo každé akvárium zakryto sklem, které bylo sundáváno jen v nutných případech, a to vždy po zastavení vzduchování. Úkony vyžadující přímý kontakt s akvarijní vodou či raky byly prováděny v rukavicích, které byly měněny mezi prací v jednotlivých akváriích, a nástroje (pinzety, hadičky na případné vypouštění vody) byly před použitím v dalším akváriu dezinfikovány, opláchnuty a dokonale osušeny.

Počty akvárií rozdělené do kategorií podle roku a druhové příslušnosti recipientů shrnuje tabulka 1. V každém roce byla součástí pokusů čtyři kontrolní akvária osazená jedním až třemi raky říčními. Stav raků byl denně kontrolován a v případě úhynu či svlékání některého z raků bylo postupováno podle pokynů shrnutých v tabulce 2. Těla a svlečky raků tedy byly z akvárií odebírány; v případě svleček a uhynulých těl donorů byl tento odběr odložen, aby z nich mohlo dojít k předpokládanému uvolňování spor *A. astaci*. Odebrané svlečky a těla byly oplachovány proudem vodovodní vody, jednotlivě vloženy do čistých uzavíratelných plastových sáčků a přechovávány v -80 °C. Těla raků říčních byla v roce 2008 (kvůli pokusům o kultivaci patogenu v rámci dalšího výzkumu, jenž není součástí této práce) přenesena na maximálně 48 hodin do akvária s čistou vodou. Následně byla těla pitvána a malé části kutikuly byly použity pro kultivace, zatímco zbytek byl zamražen.

**Tabulka 1:** Základní údaje o experimentálním uspořádání. Druhy raků sloužících v pokusných akváriích jako donoři a recipienti jsou specifikovány pro jednotlivé řádky. Kontrolní akvária byla osazena pouze raky říčními.

rok	donor	recipient	počet akvárií	počet kontrolních akvárií a raků
2008	1 rak pruhovaný	1 rak pruhovaný	10	2; 3
		2 raci říční	10	2; 6
2009		1 rak říční	15	4; 4

**Tabulka 2:** Obsluha akvárií v závislosti na stavu raků.

rak	stav raka	zásah v roce 2008	zásah v roce 2009
rak pruhovaný, donor	úhyn	Tělo odebrat.	Tělo odebrat z akvária až následující den. V den nálezu i v den odebrání těla filtrovat vodu.
	svlékání	Svlečku nechat v akváriu i při kontrolách v následujících dvou dnech, třetí den odebrat.	Svlečku nechat v akváriu i při kontrolách v následujících dvou dnech, třetí den odebrat. V den nálezu i ve třech dalších dnech filtrovat vodu.
rak říční, recipient	úhyn	Tělo odebrat.	Tělo odebrat.
	svlékání	Svlečku odebrat.	Svlečku odebrat.
rak pruhovaný, recipient	úhyn	Tělo odebrat.	Pokusy nezahrnovaly raky pruhované v roli recipientů.
	svlékání	Svlečku odebrat.	

Filtrování vody za účelem zachycení spor bylo realizováno pouze v roce 2009. Kromě mimořádných situací uvedených v tabulce 2 byla voda filtrována přibližně s týdenním intervalem, a to ze všech akvárií. Podotýkám, že několikrát došlo k nerespektování výše popsaných pravidel pro filtraci, a proto z některých dní po svlékání či úhynu donorů vzorky chybějí. Filtrační aparatura zahrnovala plastové stříkačky o objemu 50 ml (Omnifix), plastový držák filtru (typ Swin-Lok, Whatman) a membránové polykarbonátové filtry (Whatman Nucleopore, průměr filtru 25 mm, póry 2  $\mu\text{m}$ ). Přes každý filtr bylo obvykle filtrováno celkem 100 ml vody. Pokud se póry ucpávaly a na filtrování už pohodlně nestačila síla palce jedné ruky, byla filtrace předčasně ukončena. V takovém případě byl pro účely pozdějších výpočtů poznamenán skutečný objem přefiltrované vody. S filtrem bylo manipulováno pouze sterilní pinzetou. Po vyjmutí z držáku byl každý filtr sterilními nůžkami rozstřížen na dvě poloviny, které byly jednotlivě v 1,5ml zkumavkách vloženy do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Kromě úkonů uvedených v tabulce 2 obsluha jedenkrát týdně krmila raky kouskem mrkve a odstraňovala případné nezkonsumované kousky mrkve z předchozího týdne. Kvalita vody v akváriích byla denně vizuálně kontrolována. V případě viditelného zákalu byla polovina vody vyměněna za odstátou vodovodní pitnou vodu; každá taková výměna byla zaznamenána. V roce 2008 nebylo nutné přistoupit k výměně vody v pokusných akváriích ani jednou. V roce 2009 byla polovina vody vyměněna 12. den pokusů ve všech akváriích a poté došlo k výměně poloviny vody již pouze v osmi akváriích, přičemž filtrace (pokud v daný den probíhala) byla provedena ještě před výměnou vody. Proto nepředpokládám výrazné ovlivnění výsledků výměnami vody v akváriích.

Pokusy probíhaly podle výše naznačeného plánu 72 dní v roce 2008 a 87 dní v roce 2009. Pak byli zbylí donoři opláchnuti proudem vody, jednotlivě vloženi do plastových sáčků a usmrceni vložением do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Recipienti byli ponecháni v akváriích ještě dalších 17 (2008), respektive 11 (2009) dní, aby se jejich případná čerstvá infekce mohla rozvinout. Poté byli i recipienti usmrceni výše uvedeným způsobem.

### **Izolace DNA z tkání raků**

Z račích těl a svleček byly sterilními nástroji vypitvány pouze měkké části kutikuly ze spodní strany zadečku, jeden uropod, jedno oko a jakékoliv melanizované části kutikuly. Tyto tkáně byly po zmrazení tekutým dusíkem drceny v porcelánové třecí misce a z výsledné směsi bylo přibližně 40 mg přeneseno do zkumavky (použitou metodou izolace DNA lze zpracovat vzorky o hmotnosti nejvýše 50 mg). Ihned následovalo přidání prvního pufru z použité soupravy pro izolaci DNA, *DNeasy Animal Tissue kit* (Qiagen). Při izolaci byl respektován postup doporučený výrobcem. Ke směsi tkání bylo do zkumavky přidáno 180  $\mu\text{l}$  pufru ATL (*Tissue Lysis Buffer*, součást soupravy) a 20  $\mu\text{l}$  roztoku proteinázy K (součást soupravy). Po promíchání byl vzorek inkubován cca. 12 hodin v  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté se ke každému vzorku přidalo 200  $\mu\text{l}$  pufru AL (*Lysis Buffer*, součást soupravy) a 200  $\mu\text{l}$  96% etanolu. Promíchaná směs byla přelita na kolonku (součást soupravy) pro navázání DNA. Kolonky byly centrifugovány jednu minutu při  $8\ 000\ \text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ , umístěny do čistých sběrných zkumavek (součást soupravy) a bylo na ně pipetováno 500  $\mu\text{l}$  pufru AW1 (*Wash Buffer 1*, součást soupravy). Po jedné minutě centrifugování při  $8\ 000\ \text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$  byly kolonky přeneseny do dalších sběrných zkumavek a bylo na ně pipetováno 500  $\mu\text{l}$  pufru AW2 (*Wash Buffer 2*, součást soupravy). Směs byla centrifugována tři minuty při  $14\ 000\ \text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ . Kolonky byly umístěny do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml a bylo na ně pipetováno 100  $\mu\text{l}$  pufru AE (*Elution Buffer*,

součást soupravy) ohřátého na 65 °C. Po 10 minutách následovalo centrifugování 1 minutu při 8 000 ot·min<sup>-1</sup>. Na kolonku bylo pipetováno dalších 100 µl pufru AE ohřátého na 65 °C a po 10 minutách inkubace byly zkumavky opět centrifugovány jednu minutu při 8 000 ot·min<sup>-1</sup>.

### **Izolace DNA z filtrů**

DNA ze vzorků určených pro detekci pomocí *real-time* PCR byla izolována stejným postupem jako v práci Stranda a kol. (2011), pouze s drobnými úpravami: 1) Pro izolaci DNA byla od každého filtru použita pouze jedna polovina (druhá polovina sloužila jako rezervní vzorek). 2) Roztok CTAB pufru s 2-merkaptoetanolem a chloroform byly přidávány k filtrům pouze v polovičních objemech, protože filtry z akvarijských pokusů byly zamrazeny v příliš malých zkumavkách (1,5 ml). Získaná směs však byla v patřičném kroku smíchána s druhou polovinou objemu izolačních chemikálií a následně již izolace probíhala zcela podle popisu Stranda a kol. (2011).

Vzorky (filtry) byly před izolací přechovávány v -80 °C. Po rozmražení bylo k filtrům ve zkumavkách přidáno 500 µl ohřáté (65 °C) směsi pufru CTAB (20 g l<sup>-1</sup> CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA, deionizovaná voda) a 2-merkaptoetanolu o poměru 99:1. Po promíchání byly vzorky zmrazeny v -80 °C po dobu nejméně 30 minut (obvykle 1 až 24 hodin) a rozmrazeny v 65 °C. Ve stejné teplotě byly vzorky po promíchání s 5 µl RNázy A (10 mg ml<sup>-1</sup>, Fermentas) inkubovány 30 minut. Následovalo promíchání s 10 µl proteinázy K (20 mg ml<sup>-1</sup>, Qiagen) a dalších 30 minut inkubace v 65 °C. 300 µl přidaného chloroformu bylo s vodní fází promícháno převrácením po dobu 15 s, což vedlo k rozpuštění filtru. To umožnilo přenos celého objemu do připravených 2ml zkumavek s pufrům a chloroformem (500 µl a 300 µl). Následovalo 15 minut centrifugování při 14 000 ot·min<sup>-1</sup>. 800 µl supernatantu bylo pipetováno do čisté zkumavky a smícháno dvojnásobným převrácením s 480 µl isopropanolu vychlazeného na -20 °C. Po patnáctiminutové inkubaci v pokojové teplotě byly vzorky centrifugovány (14 000 ot·min<sup>-1</sup>, 15 min) a supernatant vylit. Ke zbylé peletě na dně zkumavky (zpravidla nebyl patrný) bylo přidáno 300 µl 70% etanolu vychlazeného na -20 °C. Vzorky byly centrifugovány po dobu 5 minut (14 000 ot·min<sup>-1</sup>). Supernatant byl odpipetován a pelety na dně zkumavek byly sušeny při 65 °C v blokové lázni při odklopených víčkách zkumavek po dobu cca 45 minut. Pelety DNA byly rozpuštěny hodinovou inkubací ve 100 µl sterilní deionizované vody a důkladným promícháním.

## ***Real-time PCR***

Pro detekci DNA *A. astaci* v izolátech lze využít některou z molekulárních metod popisovaných v úvodu: *semi-nested PCR*, *single round PCR*, *real-time PCR*. Nejprve byly testovány izoláty z tkání raků pomocí *semi-nested PCR*. Později se nám však podařilo zavést v našich laboratořích i *real-time PCR*, která oproti *semi-nested PCR* nabízí i kvantifikaci patogenu. Proto byly všechny získané izoláty, včetně již dříve testovaných, analyzovány pomocí této novější metody. *Real-time PCR* a *semi-nested PCR* izolátů z tkání raků se svými výsledky v základních obrysech shodovaly<sup>2</sup>, a proto budu pro jednoduchost ve zbytku práce popisovat pouze výsledky *real-time PCR*.

*Real-time PCR* probíhala podle původně navrženého postupu (Vrálstad a kol. 2009), tedy s použitím speciální sondy MGB (TaqMan® *Minor Groove Binder*, Applied Biosystems). Reakce probíhala v objemu 25 µl, který byl tvořen:

- 12,5 µl *Universal PCR Master Mixu* (Applied Biosystems) pro izoláty z filtrů se známým počtem spor; 12,5 µl *Taq Man Environmental Master Mixu* (Applied Biosystems) pro izoláty z filtrů s neznámým počtem spor a z račích tkání (podrobnosti o užití jmenovaných roztoků jsou popsány níže v části o inhibici PCR),
- 2,5 µl zásobních 5µM roztoků primerů (AphAstITS-39: 5'-AAG GCT TGT GCT GGG ATGTT-3'; AphAstITS-97: 5'-CTT CTT GCG AAA CCT TCT GCT A-3'),
- 1 µl zásobního 5µM roztoku MGB sondy (AphaAstITS-60: 5'-6-FAM-TTC GGG ACG ACC CMG B-NFQ-3'),
- 1,5 µl sterilní deionizované vody,
- 5 µl izolátu DNA.

Program samotné *real-time PCR* byl zahájen dvěma minutami při 50 °C a 10 minutami při 95 °C. Poté se opakovalo 50 cyklů sestávajících z 15 s při 95 °C a 60 s při 58 °C. V jednom běhu *real-time PCR* bylo na přístroji IQ5 (BioRad) proměřeno až 96 reakcí

---

<sup>2</sup> Na rozdíl od *semi-nested PCR*, *real-time PCR* vedla k pozitivnímu výsledku testování izolátu jedné svlečky raka říčního (množství patogenu bylo v kategorii A<sub>2</sub>, tedy pod limitem kvantifikace) a nepotvrdila výskyt *A. astaci* v izolátech ze svleček některých raků říčních. Tyto rozpory ještě budou podrobněji zkoumány, prozatím si je vykládám jako důsledek nižší citlivosti a specifity *semi-nested PCR*, která již dříve stála za stejnou kombinací výsledků (Kozubíková a kol. 2011c).

(96 jamek na destičce). Osm jamek v každém běhu zabíraly kalibrační standardy, tedy roztoky o známé koncentraci DNA patogenu (Vrålstad a kol. 2009). Jednu jamku zabírala negativní kontrola, do jejíž reakční směsi nebyl přidán žádný vzorek ani standard. Hodnoty PFU standardů byly přežaty z původní práce (Vrålstad a kol. 2009).

Jelikož použití PCR s sebou přináší riziko falešně negativních výsledků detekce či podhodnocení množství DNA patogenu v důsledku inhibice, byl v této práci využíván zejména *Taq Man Environmental Master Mix* (Applied Biosystems), který podle výsledků Stranda a kol. (2011) vliv inhibitorů významně potlačuje. Případný zbývající vliv inhibitorů na výsledky detekce patogenu v izolátech byl posuzován podle výsledků *real-time* PCR desetinasobných ředění izolátů. Pokud by reakce plné koncentrace vzorku nebyla vůbec inhibována a došlo k naředění přesně desetkrát, měl by rozdíl Ct činit 3,32.<sup>3</sup> Během ředění i přípravy PCR však mohly v důsledku pipetování vzniknout jisté odchylky. V této práci jsem se rozhodl akceptovat odchylky až 15 %, tedy rozdíly Ct v rozmezí 2,82 až 3,82, stejně jako postupovali Kozubíková a kol. (2011c). Pro jednotlivé typy vzorků byly uplatněny následující postupy při odhadování skutečné hodnoty PFU (dále jen „PFU<sub>vzorku</sub>“):

Vliv inhibice na výsledky kalibračních filtrů byl odhadován porovnáním výsledků měření plné koncentrace izolátu za použití *Taq Man Universal Master Mixu* a výsledků měření desetinasobného ředění izolátu DNA za použití *Taq Man Environmental Master Mixu*. Srovnání však bylo realizováno pouze u izolátů ze vzorků s předpokládaným počtem 1 000 a 10 000 spor, neboť v izolátech odpovídajících méně než 100 sporám docházelo často k negativním výsledkům detekce. PCR kalibračních filtrů nebyla podle tohoto porovnání významně inhibována, neboť průměrný rozdíl mediánu hodnot Ct naměřených při plné koncentraci a hodnoty Ct desetinasobně ředěné koncentrace izolátu se blížil očekávané hodnotě 3,32. Konkrétně pro izoláty z filtrů s předpokládaným počtem 1 000 spor byl průměrný rozdíl Ct roven 3,75 a pro izoláty z filtrů s předpokládaným počtem 10 000 spor byl průměrný rozdíl Ct roven 3,47.

Vliv inhibice na výsledky testování izolátů DNA z pokusných filtrů a z tkání raků byl stanovován obdobně. Všechny izoláty byly měřeny jednou v plné koncentraci a jednou desetinasobně ředěné (vždy za použití *Taq Man Environmental Master Mixu*). Vzorky z filtrů,

---

<sup>3</sup> Hodnota 3,32 vychází z teoreticky očekávaného zdvojnásobení počtu kopií během každého cyklu PCR. V takovém případě by byla PCR desetinasobného ředění v dosažení určitého množství kopií zpožděna za PCR plné koncentrace o počet cyklů, za který dojde k desetinasobnému zmnožení produktu, tj. za počet odpovídající výrazu  $\log_2 10 = 3,32$ .

u nichž byl alespoň jeden výsledek detekce pozitivní nebo v kategorii A<sub>1</sub>, byly proměřeny ještě dvakrát v plné koncentraci (výsledky testování vzorků z filtrů se totiž často nacházely pod limitem kvantifikace, kde byly relativní odchylky jednotlivých měření vyšší). Pokud byla hodnota Ct ředěného vzorku nad limitem kvantifikace, a zároveň byl rozdíl Ct plné koncentrace a desetinásobného ředění v rozmezí 2,82 až 3,82, nebo pokud byla tato hodnota pod limitem kvantifikace (v takovém případě nebyla výpovědní hodnota výše uvedeného rozdílu Ct vysoká, a proto nebyl rozdíl posuzován), bylo PFU<sub>vzorku</sub> stanoveno výsledkem měření plné koncentrace (v případě izolátů z tkání těl raků) či mediánem hodnot získaných třemi měřeními plné koncentrace (v případě izolátů z filtrů). Pokud byla hodnota Ct ředěného vzorku nad limitem kvantifikace a zároveň rozdíl Ct plné koncentrace vzorku a desetinásobného ředění mimo uvedené rozmezí, bylo množství DNA *A. astaci* ředěné i plné koncentrace měřeno ještě dvakrát a vypočítán rozdíl Ct mediánů těchto měření. Ten již v uvedeném rozmezí ležel ve všech případech a PFU<sub>vzorku</sub> bylo stanoveno podle mediánu naměřených hodnot PFU plné koncentrace. Výsledky *real-time* PCR izolátů z pokusných filtrů a z tkání raků tedy neodhalily ani jeden případ, kdy by byla PCR inhibována.

### Kontroly kontaminace

Detekce *A. astaci* pomocí PCR s sebou kromě nebezpečí inhibice přinášela i hrozbu falešně pozitivních výsledků detekcí v důsledku kontaminace vzorků. Kontaminace mohla nastat v každém z kroků jejich přípravy a laboratorních analýz, tedy zejména během: akvarijních pokusů, filtrování vody z akvárií, pitev raků, drcení jejich tkání, izolace DNA, přípravě reakčních směsí pro *real-time* PCR. Proto byly do jednotlivých kroků zařazovány negativní kontroly, s jejichž pomocí bylo ověřováno, nakolik se dařilo kontaminaci předcházet. K vzájemné kontaminaci akvárií spory račích moru nejspíše nedocházelo. Poměrně často sice docházelo k úhynům raků v kontrolních akváriích (tabulka 3), avšak ani v jednom ze všech třinácti těl recipientů kontrolních akvárií nebyl *A. astaci* pomocí *real-time* PCR detekován.

**Tabulka 3:** Úhyny raků v kontrolních akváriích.

rok	pokus o přenos na raky	počet raků přeživších až do konce pokusů/počet raků při jejich zahájení	pořadí dne úhynu raka
2008	pruhované	0/3	11.; 14.; 60.
2008	říční	1/5	8.; 20.; 60.; 77.
2009	říční	2/4	8.; 57.

I výsledky *real-time* PCR izolátů z filtrů, přes něž byla filtrována voda z kontrolních akvárií (během každého pravidelného odběru byla filtrována voda z náhodně vybraného kontrolního akvária), byly negativní. Negativní výsledky testování izolátů z těchto filtrů též nasvědčují, že ke kontaminaci nedocházelo ani při filtrování. O absenci kontaminace během pitvání, drcení tkání a izolací DNA z račích tkání svědčí negativní výsledky kontrol izolací (zkumavky naplněné 100  $\mu$ l sterilní deionizované vody a ošetřované zcela stejně jako vzorky drcených tkání raků) a negativní výsledky detekce *A. astaci* ve tkáních raků z kontrolních akvárií. Jako kontrola kontaminace během izolace z filtrů byly použity jednak negativní kontroly (zkumavky se 100  $\mu$ l sterilní deionizované vody, ošetřované zcela stejně jako vzorky s pokusnými či kalibračními filtry), jednak kontroly kontaminace DNA přenášené vzduchem, tedy zkumavky se 200  $\mu$ l sterilní deionizované vody, které zůstávaly po celou dobu práce s ostatními zkumavkami otevřeny (DNA z nich byla izolována až během následujících izolací). Výsledky všech těchto kontrol byly negativní. Při přípravě každého běhu *semi-nested* PCR i *real-time* PCR byla zařazena jedna negativní kontrola (do takové reakce nebyl přidáván žádný izolát DNA), vždy s negativním výsledkem.

### **Kvantifikace spor ve vodě akvárií**

Z filtrů, přes které byla filtrována voda z pokusných akvárií (dále jen „pokusné filtry“), byla izolována DNA a její množství změřeno pomocí *real-time* PCR – stanovena tedy byla hodnota PFU v 5  $\mu$ l izolátu. Mým cílem však bylo odhadnout koncentraci spor v akváriu v době filtrování. Proto bylo třeba zjistit, jaké množství spor odpovídá naměřeným hodnotám PFU. Tento úkol byl řešen pomocí empirického stanovení PFU připadajících na jednu sporu, tedy na 1 C. Prvním krokem byla příprava a filtrace suspenzí o známých koncentracích spor.

K produkci spor *A. astaci* byly použity kmeny SAP513 a SAP880, které byly izolovány v Královské botanické zahradě v Madridu, odkud je laskavě poskytnul Javier Diéguez-Uribeondo.<sup>4</sup> Sporulace byla indukována podle Aldermana a kol. (1987). Postup sestával z níže uvedených kroků.

---

<sup>4</sup> U kmene izolovaného ze Smečna (Kozubíková a kol. 2011b) se mi nepodařilo dosáhnout potřebných koncentrací spor. Proto byly použity výše jmenované kmeny, ačkoliv velmi pravděpodobně patří do jiné skupiny genotypů, neboť pocházejí nejspíše z raka červeného (J. Diéguez-Uribeondo, osobní sdělení). V této práci předpokládám, že se spory uvedených kmenů a kmene ze Smečna neliší ve vlastnostech, které by mohly mít vliv na výsledky jejich kvantifikace (počet PFU sledovaného úseku v genomu, velikost, tendence k přisedání na povrch nádob).

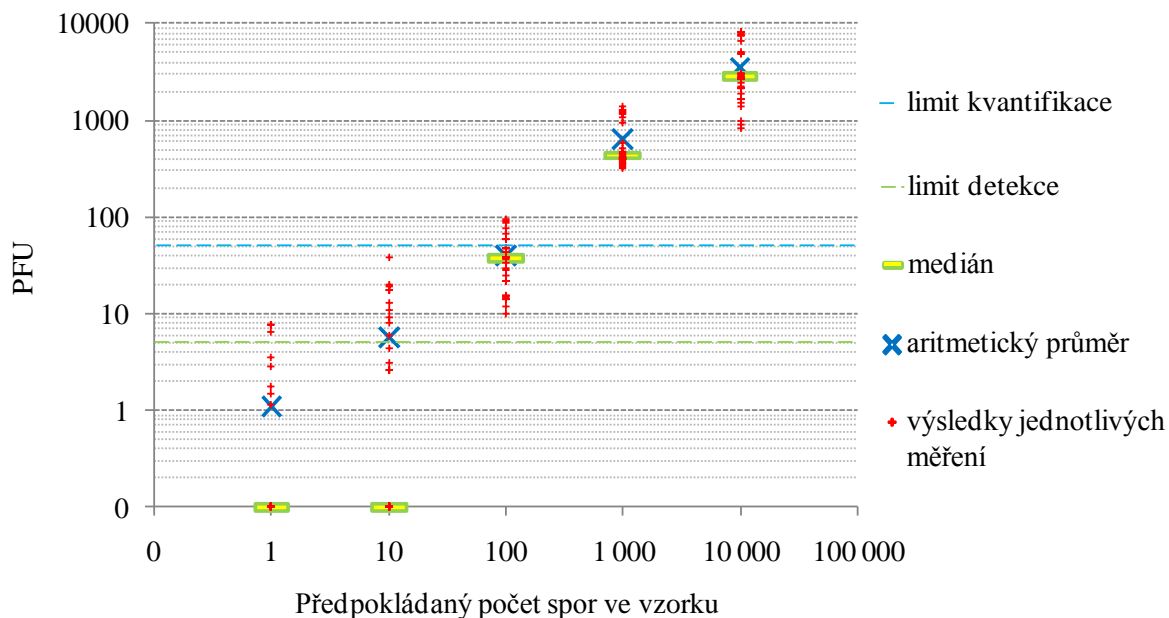
1. Kultivace mycelia v kapkách tekutého růstového média RGY (Alderman 1982) objemu cca 0,25 ml po dobu dvou až čtyř dnů při teplotě 16 °C.
2. Promývání mycelia vodou: Kapky média byly odpipetovány a nahrazeny sterilní vodovodní vodou. Výměna vody v kapkách se opakovala ihned a po jedné hodině. Po dalších 60 minutách byla mycelia přenesena do Petriho misek se sterilní vodovodní vodou.
3. Inkubace při 16 °C po dobu 12 až 24 hodin.

Koncentrace spor v takto připravených zásobních suspenzích byla stanovena s pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Hodnota byla odhadnuta aritmetickým průměrem koncentrací spor v nejméně šesti vzorcích této suspenze a zároveň celkový součet napočítaných spor ze všech těchto vzorků činil nejméně 150.

Následně bylo smícháním vypočteného objemu zásobní suspenze a čisté sterilní vody získáno 10 ml suspenze o předpokládané koncentraci 10 000 spor·ml<sup>-1</sup>. Desetinásobným ředěním vznikly suspenze o koncentracích cca 1 000, 100, 10 a 1 spory·ml<sup>-1</sup>. Míchání během ředění bylo prováděno trojnásobným převrácením zkumavky (intenzivnější míchání by totiž pravděpodobně vedlo k vyššímu přisedání spor na povrch zkumavek). Spory přesto pravděpodobně od počátku ředění až do konce filtrace postupně přisedaly na povrch všech nádob, protože manipulace vedla k přeměňování zoospor v cysty, které mají lepkavý povrch (Söderhäll a Cerenius 1999). Aby bylo minimalizováno toto zkreslení počtu spor, byla každá koncentrace připravována z nově odebraného vzorku zásobní suspenze a filtrování následovalo ihned po jejím namíchání. Z každé připravené suspenze byly nasáty 4 ml do 5ml plastové injekční stříkačky (Omnifix) a s pomocí držáků filtrů (typ Swin-Lok, Whatman) bylo postupně přes 4 membránové polykarbonátové filtry (Whatman Nucleopore, průměr filtru 25 mm, póry 2 µm) filtrováno po 1 ml suspenze. Aby zbytky suspenze nezůstávaly v nástavci nad filtrem, byl po injikování suspenze přes filtr protlačen ještě 1 ml čisté sterilní vody. Filtry byly do nástavců vkládány sterilní pinzetou a stejným nástrojem byly i přenášeny do 2ml zkumavek, ve kterých byly uloženy do -80 °C. Pro každou z pěti výše uvedených koncentrací bylo připraveno 10 takových filtrů (dále nazývaných jen „kalibrační filtry“).

Množství DNA *A. astaci* v izolátech z kalibračních filtrů bylo stanoveno trojnásobným opakováním měření pomocí *real-time* PCR za použití *Taq Man Universal PCR Master Mixu*. Celkem tedy bylo provedeno 30 měření pro každou z pěti kategorií množství spor (1, 10, 100, 1 000 a 10 000 spor). Výsledky *real-time* PCR izolátů z kalibračních filtrů jsou uvedeny

v příloze 4 a zobrazeny jsou (vyjma negativních výsledků) na obrázku 4. Naměřené hodnoty PFU byly vyděleny očekávaným množstvím filtrovaných spor. Tabulka 4 udává hodnoty mediánu a průměrů nalezených hodnot  $PFU_{spory}$  pro jednotlivé kategorie.



**Obrázek 4:** Výsledky *real-time* PCR izolátů DNA z kalibračních filtrů. Výsledky jednotlivých měření jsou naměřené hodnoty PFU v 5  $\mu$ l izolátu.

**Tabulka 4:** Odhady  $PFU_{spory}$  podle výsledků měření kalibračních filtrů. Podíl negativních výsledků udává procentuální zastoupení měření, jejichž výsledkem bylo  $PFU = 0,00$ . Pro vzorky zahrnující jednu nebo deset spor byly vypočteny i střední hodnoty výsledků pouze těch reakcí, které nevedly k takovým negativním výsledkům, ty jsou uvedeny v závorkách. Poslední řádek udává odhady vypočtené na základě všech měření uvedených kategorií předpokládaného počtu spor.

předpokládaný počet spor na filtru	medián $PFU_{spory}$	aritmetický průměr $PFU_{spory}$	podíl negativních výsledků (%)
1	0,00 (63,91)	21,78 (81,66)	73
10	0,00 (19,78)	11,48 (24,60)	53
100	7,57	8,10	0
1000	8,68	12,92	0
10000	5,62	7,07	0
100, 1000, 10000	7,87	9,36	0

Odhady vycházející z prvních dvou kategorií filtrů (1 a 10 spor) jsou velmi ovlivněny negativními výsledky detekce, a proto nebyly pro konečný odhad PFU<sub>spory</sub> použity. Rozdíl mediánů a průměrů ve zbylých kategoriích nasvědčuje pozitivně šikmému rozdělení dat, které bylo způsobeno ojedinělými vysokými hodnotami. Proto byl pro odhad PFU<sub>spory</sub> upřednostněn medián, stejně jako v práci Stranda a kol. (2011), a to ze všech měření izolátů z filtrů s předpokládanými počty spor 100, 1 000 a 10 000. Pro níže popsany výpočet množství spor byl tedy použit přepočítaný počet podle hodnoty PFU<sub>spory</sub> = 7,87.

Výpočet koncentrace spor ve filtrované vodě probíhal podle vzorce:

$K_{\text{spor}} = (\text{PFU}_{\text{vzorku}} \cdot 100 / 5) / (\text{PFU}_{\text{spory}} \cdot V)$ , kde:

$K_{\text{spor}}$  je odhad koncentrace spor ve vodě pokusných akvárií v počtu spor připadajících na 1 ml;  $V$  je objem přefiltrované akvarijní vody v mililitrech; koeficienty 100 a 5 vyplývají z používání 5  $\mu\text{l}$  izolátu o celkovém objemu 100  $\mu\text{l}$ ; hodnota PFU<sub>spory</sub> byla definována výše v textu a stanovení proměnné PFU<sub>vzorku</sub> probíhalo v souladu s popisem v kapitole „*Real-time* PCR“. V případě pokusných filtrů byl ještě každý výsledek podle výše uvedeného vzorce vynásoben dvěma, protože izolát DNA pocházel pouze z poloviny filtru.

Protože se postup *real-time* PCR v této práci neodchýlil od jejího původního popisu (Vrålstad a kol. 2009), převzal jsem, stejně jako Strand a kol. (2011), hodnotu limitu detekce (5 PFU). Ten vzhledem k postupu mé práce odpovídá u izolátů z pokusných filtrů zachycení 12,7 spory, tedy koncentraci 25,4 spor ve 100 ml akvarijní vody<sup>5</sup>. Výsledek pod limitem detekce *real-time* PCR tedy může být v případě pokusných filtrů důsledkem úplné absence spor ve vzorku, nebo důsledkem zachycení nízkého počtu spor na filtru, což při objemu vody v pokusném akváriu (5 l) a předpokladu rovnoměrné distribuce spor v důsledku cirkulace vody odpovídá přítomnosti 1 270 spor ve volné vodě akvária.

### **Interpretace výsledků detekce patogenu v tkáních raků**

Pozitivní, či negativní výsledky detekce patogenu pomocí *real-time* PCR nepředstavují samy o sobě spolehlivý doklad růstu či nepřítomnosti *A. astaci* v testovaných tkáních. Proto

---

<sup>5</sup> Pro výpočet byly použity: celkový objem izolátu DNA (100  $\mu\text{l}$ ), objem přidávaný do *real-time* PCR (5  $\mu\text{l}$ ), mnou stanovené PFU<sub>spory</sub> (7,87 PFU), izolace DNA pouze z jedné poloviny pokusných filtrů a obvyklý objem filtrovaný při pokusech (100 ml).

musely být výsledky interpretovány s ohledem na omezení použité metody, jak se pokusím nastínit v této kapitole.

Možnosti vedoucí k dosažení pozitivních výsledků detekce v tkáních raků pomocí *real-time* PCR jsou následující:

1. *A. astaci* ve tkáních rostl a z jeho vláken pocházela DNA působící pozitivní výsledky. Vzhledem k tomu, že přítomnost patogenu v tkáních byla testována buď kvůli ověření přítomnosti patogenu v tkáních donorů, nebo kvůli snaze určit, na které recipienty se račí mor přenesl, byla tato možnost žádoucí a nevyžaduje další komentáře.
2. *A. astaci* ve tkáních nerostl a detekovaná DNA pocházela ze spor přichycených na povrchu těla raka nebo šlo o extracelulární DNA. Poměrně vysoká citlivost *real-time* PCR, jež byla podrobněji diskutována v úvodní kapitole, mohla vést k detekci DNA patogenu již z pouhých desítek spor, což by v 5  $\mu$ l izolátu DNA odpovídalo kategorii A<sub>2</sub>. Zahrnutí desítek spor do vzorků pro izolaci DNA považují za možné, přestože byl povrch kutikuly při pitvách zpravidla otírán vatovými tampony (svlečky byly však pro otírání mnohdy příliš křehké). Samozřejmě nelze zcela vyloučit, že do vzorků proniklo spor ještě více. Na druhou stranu, rozdíl mezi stovkami pevně přisedlých spor a růstem *A. astaci* ve tkáních je možná pouze otázkou času, a proto vyšší množství DNA patogenu (vyšší než kategorie A<sub>2</sub>, odpovídající řádově stovkám a více spor v izolátu) nepovažují za důsledek detekce spor či extracelulární DNA.
3. *A. astaci* ve tkáních nerostl a pozitivní výsledky byly následkem přítomnosti DNA jiného druhu. Takové nežádoucí zkreslení však považují za nepravděpodobné, neboť: 1) Přítomnost *A. astaci* ve zdrojové populaci donorů (Smečno) byla spolehlivě dokázána (Kozubíková a kol. 2011b) a specificita *real-time* PCR se zdá být dostatečná (více podrobností v kapitole „Metody detekce a kvantifikace *Aphanomyces astaci*“); 2) Výsledky všech vzorků tkání raků z kontrolních akvárií byly negativní.
4. *A. astaci* ve tkáních nerostl a pozitivní výsledky byly následkem kontaminace vzorků při práci v laboratoři. Taková kontaminace však nejspíše výsledky významně neovlivnila, jak bylo podrobněji diskutováno v kapitole „Kontroly kontaminace“.

Z výše uvedeného vyplývá, že pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků v důsledku výskytu DNA příbuzného druhu či následkem kontaminace při laboratorní práci byla minimální. Pozitivní výsledky detekce lze interpretovat jako důkaz šíření *A. astaci* v akváriu. Při interpretaci pozitivních výsledků izolátů, v nichž bylo naměřeno množství DNA *A. astaci* odpovídající jednotkám až desítkám C, je třeba uvažovat i možnost zahrnutí spor do vzorků. Vyšší množství DNA patogenu v izolátech svědčí poměrně spolehlivě o růstu *A. astaci* v testovaných tkáních raků či o úspěšném přenosu račího moru.

Možnosti vedoucí k dosažení negativních výsledků detekce v tkáních raků pomocí *real-time* PCR jsou následující:

1. *A. astaci* ve tkáních nerostl – tato možnost je pro detekci patogenu žádoucí a nevyžaduje další komentáře.
2. *A. astaci* ve tkáních rostl, ale do vzorku nebylo zahrnuto dostatečné množství jeho vláken. Vliv této možnosti na výsledky analýz pokládám za minimální, protože limit detekce (5 PFU) odpovídá přítomnosti 25,4 C ve vzorku tkání, ze které byla DNA izolována. Pokud hyfy ve zpracovávané račí kutikule rostly, bylo nejspíše množství DNA pro detekci dostatečné.
3. *A. astaci* v těle raka rostl, ale parazitované části těla nebyly zahrnuty do vzorku pro izolaci DNA. Pravděpodobnost tohoto nežádoucího ovlivnění výsledků byla v rámci možností používaných metod detekce snížena na minimum, když byly pro izolaci DNA vybírány tkáně s největší pravděpodobností výskytu parazita (Oidtmann a kol. 2004; Oidtmann a kol. 2006; Vrálstad a kol. v tisku): měkké části kutikuly ze spodní strany zadečku, uropod, oko a jakékoliv melanizované části kutikuly.
4. *A. astaci* v testovaných tkáních rostl, ale výsledky analýzy byly ovlivněny inhibicí PCR. Tato možnost nejspíše výsledky této práce neovlivnila, jak bylo podrobněji diskutováno v kapitole „*Real-time* PCR“.
5. *A. astaci* v testovaných tkáních rostl, ale rozkladné procesy v tkáních raků vedly k degradaci DNA *A. astaci* do té míry, že byla znemožněna jeho detekce (Oidtmann 2004). Uropody však byly zamrazeny ihned po jejich odstřížení, těla recipientů nejpozději po dvou dnech, těla donorů taktéž, a svlečky raků nejpozději po třech dnech. Navíc, *A. astaci* může přežívat v tkáních raka i pět dní po jeho úhynu (Oidtmann a kol. 2002). Ani výsledky statistického testování výsledků této

práce nenasvědčují významnému ovlivnění množství DNA patogenu v důsledku rozkladných procesů (podrobnosti v kapitole výsledky a v příloze 5).

Negativní výsledek detekce tedy vypovídá o nepřítomnosti *A. astaci* ve zkoumaných tkáních. Na druhou stranu, negativní výsledek není důkazem nedostatečného šíření *A. astaci* v akváriu, neboť patogen mohl růst v tkáních, jež nebyly vybrány pro detekci.

### **Statistické zpracování dat**

Tato práce obsahuje výsledky dvou různých typů pokusů o přenos račího moru, a to na raky říční a na raky pruhované. Raci říční a raci pruhovaní se výrazně liší ve své citlivosti vůči *A. astaci* (Unestam 1969a; Vey a kol. 1983), a proto budou data z těchto dvou typů pokusů posuzována odděleně (až na jednu výjimku, na kterou upozorňuji níže v textu). Uspořádání pokusů o přenos patogenu na raky říční bylo v letech 2008 a 2009 téměř stejné, pouze počty recipientů v jednotlivých akváriích se lišily – dva recipienti v roce 2008, jeden recipient v roce 2009. Při vyhodnocení výsledků jsem považoval za nezávislá opakování pokusu o přenos pouze jednotlivá akvária, nikoliv jednotlivé recipienty, což bylo usnadněno skutečností, že při pokusech v roce 2008 došlo vždy buď k přenosu na oba recipienty, nebo na žádného z nich. Pro většinu statistických analýz byla využita data pouze z pokusů o přenos *A. astaci* na raky říční, protože vyústily ve větší počet úspěšných přenosů a byly provedeny ve více opakováních.

Výsledky *real-time* PCR byly analyzovány pomocí softwaru Bio-Rad iQ5 2.0 Standard Edition Optical System Software V2.0. Následná evidence výsledků a statistické výpočty byly prováděny v programech Microsoft Office Excel 2007 (běžné výpočty, příprava grafů), Statistica 6.1 (standardní statistické testy, krabicové diagramy) a FoxPro 2.6a (naprogramování permutačních testů).

Hypotéza, že pravděpodobnost přenosu *A. astaci* je vyšší, pokud došlo ke svlékání či úhynu donora, byla testována pomocí dat z pokusu o přenos na raky říční. Porovnávány byly výsledky pokusu o přenos (tj. četnost infikovaných a neinfikovaných recipientů) ze tří skupin akvárií: akvária, kde došlo v přítomnosti recipienta ke svlékání donora, k úhynu donora a kde nedošlo ani ke svlékání, ani k úhynu donora. Skupiny byly srovnávány po dvojicích, ve všech třech kombinacích. Z důvodu nízkého počtu opakování bylo užito Fisherova exaktního testu.

Vliv množství hyf *A. astaci* ve tkáních donora na pravděpodobnost přenosu patogenu byl posuzován pomocí dat z pokusu o přenos na raky říční v akváriích, kde se donor

nesvlékal, ani neuhynul, aby nebyla data zkreslena hypotetickým vlivem svlékání a úhynu na rozsah infekce. Data o množství DNA patogenu v izolátech z tkání donorů byla rozdělena do dvou skupin podle úspěšnosti přenosu v akváriu (patogen přenesen/nepřenesen). Následně bylo testováno, zda se množství DNA patogenu v izolátech těchto dvou skupin liší, a to pomocí Mannova-Whitneyova U testu, protože rozdělení naměřených hodnot se příliš odlišovalo od normálního rozdělení a počty opakování byly nízké.

Existence rozdílu mezi pravděpodobností přenosu na raky pruhované a na raky říční byla testována najednou podle výsledků ze všech akvárií i po skupinách akvárií vymezených svlékáním a úhynem donorů v přítomnosti recipientů. Využito bylo Fisherova exaktního testu kvůli nízkému počtu opakování.

Hypotéza, že množství DNA *A. astaci* ve tkáních uhynulých a usmrcených raků se neliší, byla testována pomocí výsledků testování izolátů DNA z těl donorů, kteří se během pokusů nesvlékali. Jen u těchto raků totiž bylo bezpečně známo, že všichni hostili *A. astaci* ve své kutikule a výsledky nebyly ovlivněny předpokládanými změnami množství hyf patogenu v kutikule v důsledku svlékání. Z hlediska interakce *A. astaci* s donory byla situace v akváriích pokusů o přenos na raky pruhované i na raky říční srovnatelná. Proto byly pro účel tohoto testování použity výsledky kvantifikace patogenu ve tkáních donorů z obou typů pokusů. Užito bylo Mannova-Whitneyova U testu, protože rozdělení množství DNA v izolátech se příliš odlišovalo od normálního a k dispozici byl nízký počet opakování.

K testování hypotéz, že pravděpodobnost detekce, respektive koncentrace, spor *A. astaci* ve vodě akvária je vyšší v období svlékání donora, byly využity permutační testy naprogramované specificky pro tento účel. Období svlékání donora jsem pro účely těchto testů vyznačil jako sedm dní, které předcházely odebrání svlečky donora z akvária (období tedy zahrnovalo tři dny před svlékáním, den svlékání a tři následující dny). Pro testování byly vybrány výsledky *real-time* PCR všech vzorků (filtrací) vody akvárií, ve kterých došlo ke svlékání donora (celkem 4 akvária). Provedeny byly dva různé permutační testy, které se mírně lišily sledovanou statistikou. První z nich, která posuzovala pouze pravděpodobnost pozitivního výsledku detekce, byla vypočtena následovně: Výsledky detekce spor v akváriích byly rozděleny na pozitivní a negativní podle limitu detekce *real-time* PCR. Pro každé akvárium byl vypočten podíl počtu vzorků s pozitivním výsledkem detekce, které pocházely z období svlékání donora, a počtu všech vzorků s pozitivním výsledkem detekce (tedy za celé trvání pokusů). Sledovaná statistika byla sumou těchto podílů za všechna čtyři akvária. Druhá statistika byla vypočtena obdobně, ale namísto počtů vzorků s pozitivním výsledkem detekce

byly užity součty naměřených hodnot koncentrací. Pro každé sledované akvárium tedy byl vypočten podíl součtu naměřených koncentrací v období svlékání a součtu naměřených koncentrací za celou dobu trvání pokusu. Následně byly výsledky *real-time* PCR vzorků z každého akvária náhodně přiděleny ke dnům, ve kterých byla voda v tomto akváriu filtrována, a stanoveny byly obě výše popsané statistiky; tento proces se opakoval tisíckrát. P-hodnota byla stanovena jako podíl počtu náhodně uspořádaných souborů výsledků ústícih ve vyšší nebo stejnou hodnotu sledovaných statistik, než jaká byla vypočtena z reálně naměřených dat.

Obdobně byly testovány i hypotézy o vyšší pravděpodobnosti detekce spor v období úhynu donora a úhynu infikovaného recipienta. Přitom období úhynu raka bylo vymezeno jako sedm dní před odebráním těla, tj. v případě donora pět dní před úhynem, den úhynu a následující den, v případě infikovaného recipienta šest dní před úhynem a den úhynu.

## Výsledky

### Detekce *Aphanomyces astaci* ve tkáních raků

Na přítomnost či nepřítomnost patogenu v izolátech z račích tkání bylo usuzováno na základě amplifikace DNA *A. astaci*. Přitom část raků během experimentů uhynula, zatímco zbylí raci byli usmrceni vložением do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po usmrcení tedy, na rozdíl od úhynů v akváriích, nenásledovalo období, kdy by mohlo dojít k rozkladu tkání a růstu mikroorganismů (včetně *A. astaci*) v mrtvém těle. Výsledky statistického testování ukázaly, že rozdíly množství DNA patogenu v izolátech z uhynulých a usmrcených donorů nebyly signifikantní (Mannův-Whitneyův U-test,  $N_1 = 11$ ,  $N_2 = 17$ ,  $Z = 0,82$ ,  $p = 0,41$ ). (Grafické vynesení výsledků obou skupin raků nabízí příloha 5.) Detekce patogenu tedy nejspíše nebyla významně ovlivněna procesy po úhynu raků a vzájemné porovnávání výsledků detekce *A. astaci* v tkáních uhynulých a usmrcených raků prováděné při vyhodnocování výsledků je opodstatněné.

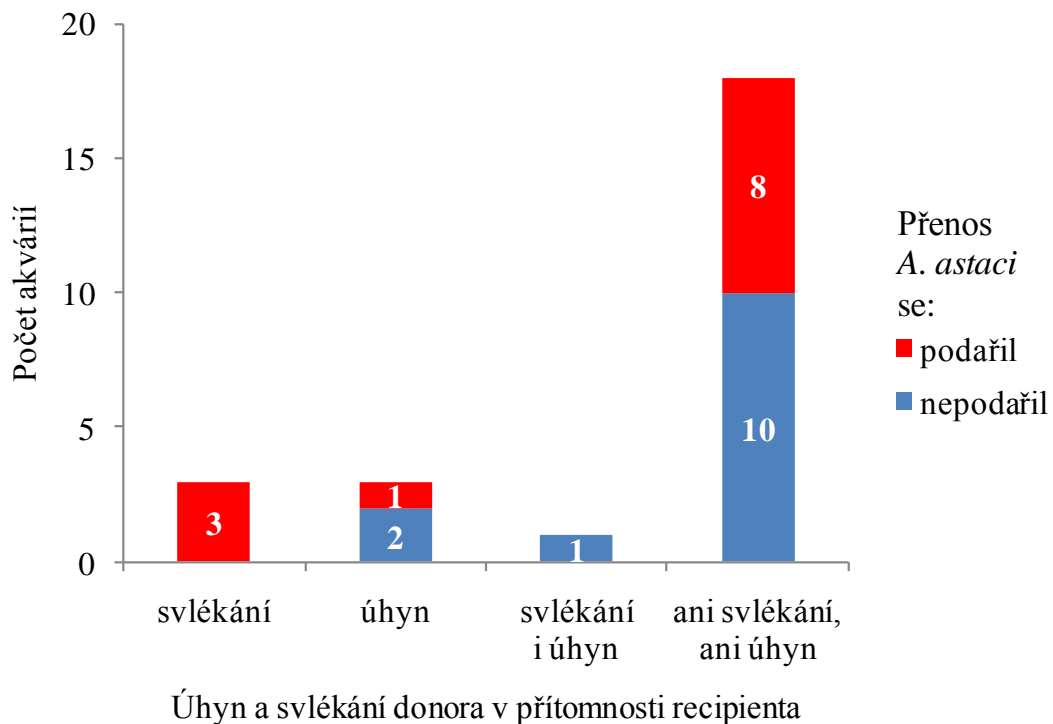
Pokud byl patogen v tělech recipientů z pokusů o přenos na raky říční detekován (15 recipientů ze 12 akvárií), šlo až na jeden případ, kdy se jednalo o nízké množství patogenu ( $A_3$ ), o záchyty většího množství DNA *A. astaci* v izolátu (tabulka 5, podrobnější výsledky jsou v příloze 6). Naměřená množství DNA patogenu v izolátech s pozitivním výsledkem detekce odpovídají tisícům až milionům C *A. astaci*. Vzhledem k postupu přípravy vzorků (otírání kutikuly tampony) je nejpravděpodobnějším vysvětlením tak velkého množství DNA patogenu jeho růst v testovaných tkáních raků. Tomu nasvědčuje i fakt, že všichni tito raci během pokusů uhynuli. Podpora to však není příliš spolehlivá, protože raci říční v pokusech hynuli i bez přičinění patogenu (tabulka 3), a proto není jisté, zda byl račí mor důvodem úhynu recipientů, přestože v jejich tělech jeho původce detekován byl. Ať už však byla příčina úhynu jakákoliv, přenos patogenu se ve dvanácti akváriích podařil a recipienty s pozitivními výsledky budu nadále označovat jako infikované.

Výsledky detekce patogenu v tělech recipientů z pokusů o přenos na raky říční rozříděné do kategorií podle svlékání a úhynu donora v přítomnosti recipienta jsou na obrázku 5. Patogen se podařilo přenést v 75 % akvárií, kde se donor svlékal (4 akvária), ve 25 % akvárií, kde donor uhynul (4 akvária) a ve 44 % akvárií, kde se donor v přítomnosti recipienta ani nesvlékal, ani neuhynul (18 akvárií). Podle statistického testování však nebyly

rozdíly mezi pravděpodobnostmi přenosu *A. astaci* na recipienty mezi žádnými z těchto skupin signifikantní (pravděpodobně v důsledku malého počtu opakování).

Pozitivní výsledky detekce se mimo jiné objevily v osmi z osmnácti akvárií, ve kterých nedošlo v přítomnosti recipienta ani ke svlékání, ani k úhynu donora. Ve dvou z těchto akvárií donoři uhynuli 2 a 9 dní od úhynu (prvního) donora. V šesti zbývajících akváriích donoři zůstali naživu až do ukončení pokusů, tedy ještě 61, 57, 56, 41, 29 a 10 dní od úhynu recipientů v jejich akváriích. Proto alespoň těchto šest případů nelze považovat za důsledek uvolnění spor v období úhynu donora. Lze tedy považovat za prokázané, že aniž dochází ke svlékání či úhynu raka pruhovaného, může se z něj *A. astaci* šířit v množství dostatečném pro infikování dalších hostitelů.

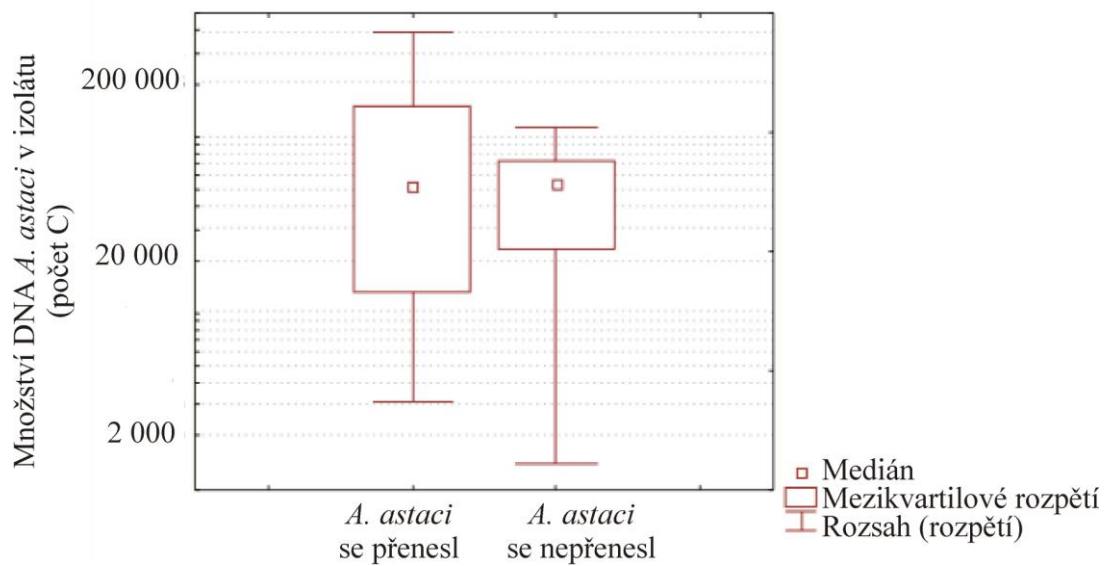
Množství DNA patogenu naměřená v izolátech z těl donorů lze chápat jako přibližný odhad množství hyf v jejich tělech. Proto jsem chtěl s pomocí těchto dat testovat, zda má množství hyf vliv na pravděpodobnost přenosu *A. astaci*. Za tímto účelem jsem vybral data pouze z akvárií, kde nedošlo ke svlékání ani k úhynu donora (14 akvárií), aby nebyly výsledky ovlivněny předpokládanými změnami rozsahu infekce v racích po jejich svlékání či úhynu. Údaje jsem rozdělil do dvou skupin podle toho, zda se podařilo *A. astaci* v akváriích přenést (příloha 7). Rozdíly množství DNA *A. astaci* v izolátech z těl donorů těchto dvou skupin nebyly signifikantní (Mannův-Whitneyův U-test,  $N_1 = 6$ ,  $N_2 = 8$ ,  $Z = 0,39$ ,  $p = 0,70$ ). To je patrné i z grafického vynesení hodnot (obrázek 6). Výsledky tedy naznačují, že v pozorovaném rozpětí (tisíce až statisíce C DNA *A. astaci*, kategorie A<sub>5</sub> až A<sub>7</sub>) není pravděpodobnost přenosu patogenu výrazně ovlivněna množstvím hyf v kutikule donorů.



**Obrázek 5:** Výsledky detekce *A. astaci* v tělech raků říčních po ukončení pokusů. Čísla ve sloupcích udávají počty jednotlivých akvárií.

**Tabulka 5:** Výsledky detekce *A. astaci* v tělech raků říčních po ukončení pokusů. Množství DNA *A. astaci* je vyjádřeno pomocí kategorií podle doktorky Vrålstad a kol. (2009). Čísla v jednotlivých sloupcích udávají počet recipientů náležejících do dané kategorie. Modrou barvou jsou zvýrazněny výsledky považované za negativní, červenou výsledky interpretované jako pozitivní.

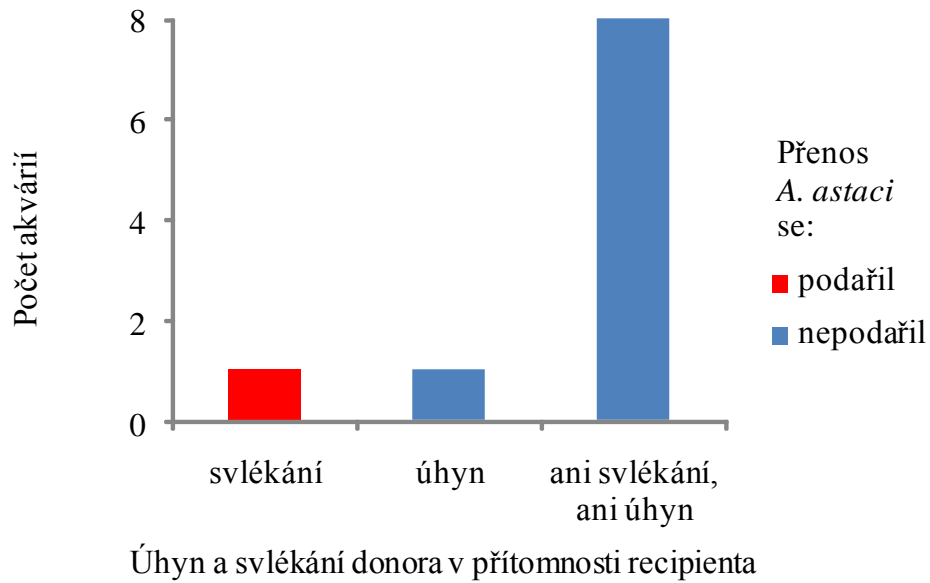
činnosti donora v přítomnosti recipienta	počet akvárií	počet recipientů	množství DNA <i>A. astaci</i> v 5 µl izolátu							
			A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	
svlékání	3	3								3
úhyn	3	4	2						1	1
svlékání i úhyn	1	2	1	1						
ani svlékání, ani úhyn	18	26	14	2		1	3	3	3	



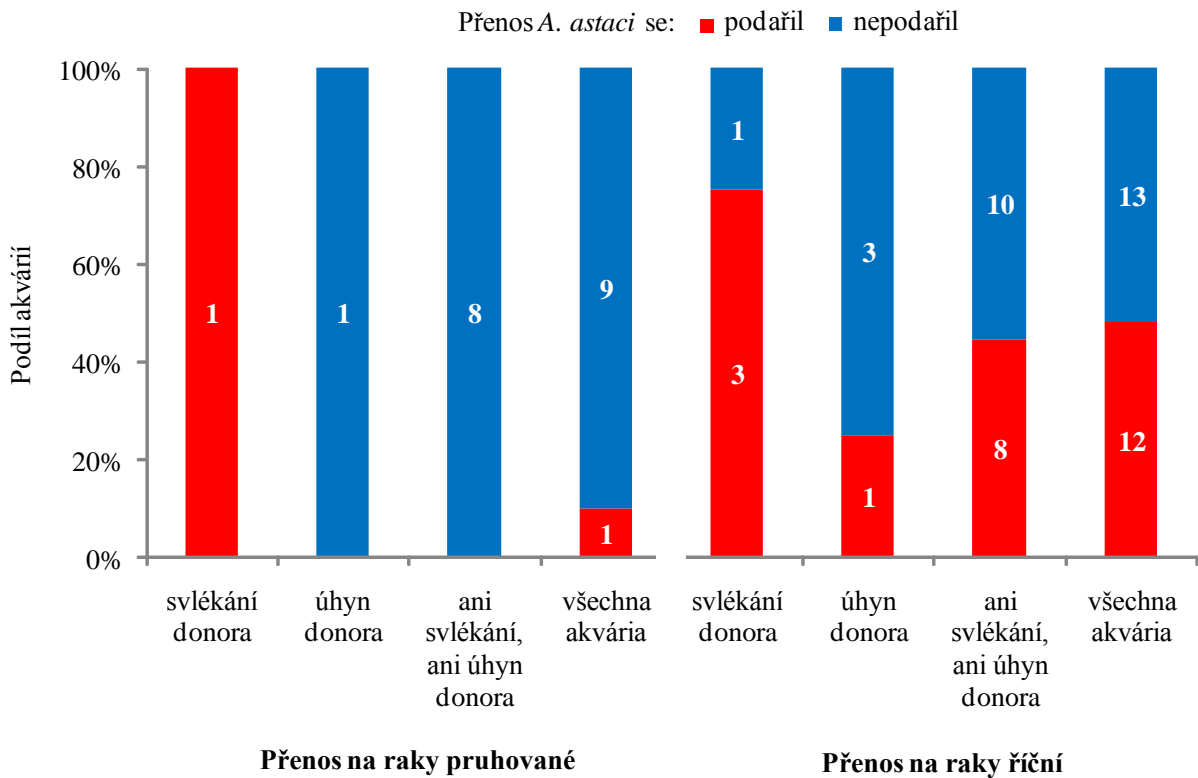
**Obrázek 6:** Množství DNA *A. astaci* v izolátu z tkání těl donorů z akvárií, kde se přenos *A. astaci* na recipienta podařil a z akvárií, kde k přenosu nedošlo. Zobrazena jsou data pouze z akvárií, kde nedošlo ke svlékání, ani k úhynu donora.

V pokusech o přenos patogenu mezi raky pruhovanými byl *A. astaci* detekován v těle recipienta pouze v jednom z deseti opakování, a to v akváriu, ve kterém došlo ke svlékání donora za přítomnosti recipienta, jak je patrné z obrázku 7 (podrobněji shrnuje výsledky příloha 8). Naměřené množství DNA *A. astaci* ve vzorku tkání recipienta odpovídá 620 000 C. Vzhledem k postupu přípravy izolátu DNA je téměř vyloučeno, aby tak velké množství DNA pocházelo pouze ze spor, a proto je možno tento výsledek pokládat za důkaz růstu *A. astaci* ve tkáních recipienta. Přitom s velkou pravděpodobností tento rak na počátku experimentu *A. astaci* nehostil, jak vyplývá z negativního výsledku testování jeho uropodu a hlavně z dlouhodobého mapování prevalence parazita ve zdrojové populaci (podrobnosti v kapitole „Metodika“). Proto je tento výsledek důkazem přenosu *A. astaci* na raka pruhovaného.

Porovnání úspěšnosti přenosu na raky pruhované a raky říční ukazuje obrázek 8. Nulovou hypotézu, že pravděpodobnosti přenosu na raka říčního a na raka pruhovaného se neliší, se podařilo vyvrátit pouze při porovnávání výsledků z akvárií, kde nedošlo ani ke svlékání, ani k úhynu donora ( $N_1 = 8$ ,  $N_2 = 18$ ;  $p = 0,031$ ). Při porovnávání výsledků ze všech akvárií nebyl rozdíl na pětiprocentní hladině signifikantní ( $N_1 = 10$ ,  $N_2 = 25$ ; Fisherův exaktní test,  $p = 0,055$ ), ale při jednostranné variantě testu už by rozdíl signifikantní byl ( $p = 0,039$ ). U akvárií, ve kterých se donor svlékal nebo kde donor uhynul, nebyla nulová hypotéza vyvrácena, což však kvůli nízkým počtům opakování ani nebylo možné ( $N_1 = 1$ ,  $N_2 = 4$ ).



**Obrázek 7:** Detekce *A. astaci* v tělech recipientů; pokus o přenos na raky pruhované.



**Obrázek 8:** Úspěšnost přenosu *A. astaci* na raky pruhované a na raky říční v kategoriích akvárií rozlišených podle svlékání a úhynu donorů v přítomnosti recipientů. Čísla ve sloupcích udávají počty jednotlivých akvárií.

Výsledky detekce patogenu ve svlečkách a v tělech donorů ukázaly, že i pouhé tři dny po svlékání byl patogen v těle raka pruhovaného detekován, a to v množství 36 000 C v izolátu DNA. Podle výsledků měření koncentrace spor bylo v den svlékání tohoto jedince přítomno ve volné vodě akvária 961 spor·ml<sup>-1</sup>, následující den 33 spor·ml<sup>-1</sup> a ještě v den odebrání a usmrcení dotyčného raka kvůli ukončování pokusů byla naměřena koncentrace 131,4 spor·ml<sup>-1</sup>. V případě dalších čtyř donorů byly výsledky detekcí v izolátech z těla i svlečky také pozitivní, avšak jejich svlékání a usmrcení dělila delší doba (10, 52, 63 a 65 dní).

### **Detekce a kvantifikace spor *Aphanomyces astaci* zachycených na filtrech**

Výsledky detekce DNA *A. astaci* byly negativní v izolátech z 84 % pokusných filtrů (108 ze 128). Ve čtyřech akváriích nebyly ani v jednom (ze sedmi až devíti) pořízených filtrů spory detekovány a mezi vzorky ze zbývajících 11 akvárií tvoří ty s negativním výsledkem detekce většinu. V průběhu pokusů tedy bylo množství spor ve volné vodě akvárií obvykle nižší, než kolik mohlo být použitou metodou (filtrování, izolace DNA, *real-time* PCR) detekováno. Přitom teoreticky mělo být dosaženo spolehlivé detekce již při koncentraci 25,4 spor ve 100 ml vody (podle výpočtů vycházejících z limitu detekce a odhadu PFU<sub>spory</sub>, podrobněji v kapitole „Metodika“). Koncentrace spor ve volné vodě pokusných akvárií tedy byla obvykle nižší než 0,254 spory·ml<sup>-1</sup>.

Pozitivní byly výsledky detekce *A. astaci* v izolátech DNA z 16 % pokusných filtrů (20 ze 128). Odhady množství spor ve filtrované vodě, založené na těchto pozitivních výsledcích, se většinou pohybovaly do 100 spor·ml<sup>-1</sup>, což odpovídá přibližně 500 000 spor ve vodě akvária. Větší koncentrace byly naměřeny pouze v akváriích č. 7 (150 spor·ml<sup>-1</sup>, v den úhynu recipienta) a č. 13, kde byla naměřena koncentrace 961 spor·ml<sup>-1</sup> a 131 spor·ml<sup>-1</sup> (v den svlékání donora a tři dny poté). Výsledky detekce *A. astaci* z filtrů pořízených během akvarijních pokusů shrnuje pro jednotlivá akvária příloha 9.

Obvykle nebylo možné určit, zda detekované spory pocházely z donora, či z již infikovaného recipienta. Výjimkou je zejména detekce spor v prvním akváriu 53., 54. a 57. den pokusů (až 345 spor ve 100 ml), jejichž zdrojem musel být donor, protože od 11. dne pokusu nebyl recipient v akváriu přítomen. Přitom v dalších sedmi vzorcích z téhož akvária (z 12., 25., 39., 46., 63., 70. a 84. dne pokusů) nebyly spory detekovány. Množství spor *A. astaci* uvolňovaných z donorů se tedy v čase měnilo. Zda se v některých obdobích spory

vůbec neuvolňovaly, nelze podle získaných dat posoudit v důsledku limitu detekce na úrovni koncentrace 25,4 spor ve 100 ml. S určitostí byla doložena pouze přibližně desetinásobná změna počtu spor uvolněných z donora (případ výše zmíněného prvního akvária). Avšak pravděpodobně byla zaznamenána i změna více než tisícinásobná, protože nejvyšší koncentrace spor ( $961 \text{ spor} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), naměřená v jiném akváriu týden po odebrání vzorku s negativním výsledkem, mohla být také důsledkem sporulace *A. astaci* z tkání donora. Tento vzorek byl totiž pořízen v den svlékání donora a deset dní před úhynem recipienta.

Již v předchozí kapitole byl testován vliv svlékání donora a úhynu donora na pravděpodobnost přenosu *A. astaci*. Pomocí výsledků kvantifikace DNA *A. astaci* v izolátech z filtrů bylo testováno, zda byla v období svlékání či úhynu raků vyšší pravděpodobnost detekce spor ve vodě a zda byla koncentrace spor ve vodě v tomto období vyšší.

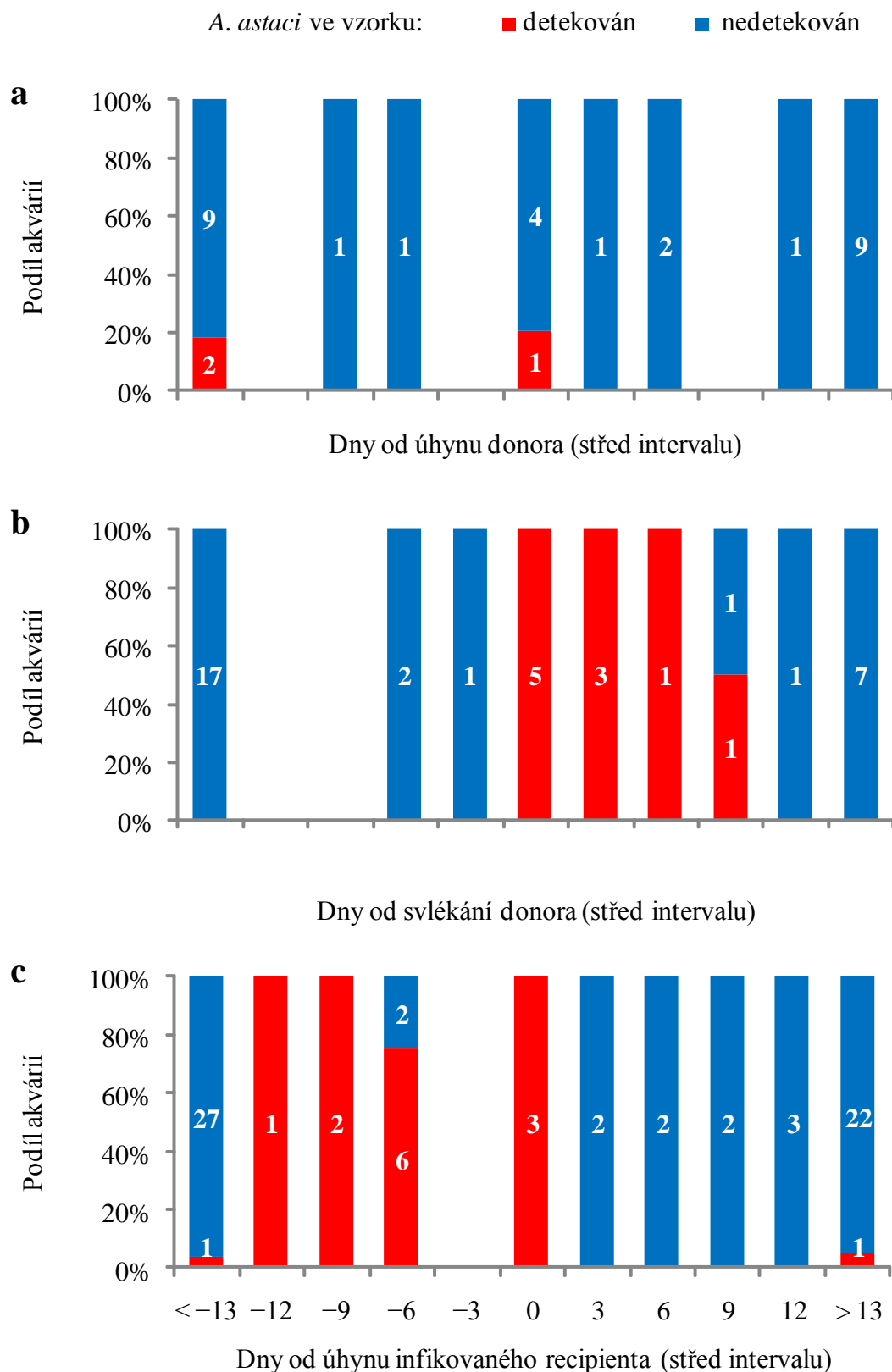
Obrázek 9 ukazuje výsledky detekce patogenu ve vodě, podrobně pro období čtyř týdnů kolem svlékání či úhynu raků. V důsledku nízkého počtu opakování těchto událostí bylo nutné použít data i z akvárií, ve kterých ještě byli recipienti v době svlékání přítomni. Obrázek 9a odhaluje minimální překryv období výskytu detekovatelného množství spor s obdobím úhynu donora. Pro účely statistického testování byl za období úhynu donora považován týden před odebráním jeho těla z akvária, které nastalo nejméně 24 hodin po smrti raka. Podle výsledků permutačních testů nebyly v tomto období koncentrace spor, ani pravděpodobnost jejich detekce signifikantně vyšší ( $p = 0,21$ ). Možnosti zobecnění získaného výsledku jsou však omezené, neboť je počet opakování velmi malý (došlo pouze ke třem úhynům donora). Ve dvou akváriích však nebyly spory v období úhynu donora vůbec detekovány, což ukazuje, že pokud vůbec dochází k většímu uvolnění spor z infikovaného raka pruhovaného do 24 hodin po jeho úhynu, pak se tak děje pouze v některých případech. Ve třetím akváriu, kde k uvolnění spor po úhynu donora došlo, nebylo v kutikule donora detekováno větší množství DNA patogenu než v donorech ze dvou výše zmíněných akvárií (24 821 C oproti 20 003 C a 30 883 C) a množství DNA *A. astaci* všech tří vzorků se nalézala v druhém a třetím kvartilu hodnot množství DNA patogenu v tkáních všech donorů.

Naopak poměrně výrazný je překryv výskytu spor s obdobím svlékání donora (obrázek 9b). Ve všech čtyřech akváriích, kde se donor svlékal, byly spory v uvedeném období čtyř týdnů ve vodě detekovány. Pro účely statistického testování bylo období svlékání donora vymezeno jako týden před odebráním jeho svlečky z akvária. Výsledky permutačních testů odhalily, že pravděpodobnost detekce spor i naměřené koncentrace spor byly v období svlékání donorů signifikantně vyšší ( $p < 0,005$ ). Ve třech ze čtyř případů, kdy byl v období

svlékání donora přítomen recipient, došlo navíc k úhynu raka říčního do 11 dnů ode dne svlékání donora a v tkáních uhynulého recipienta byl patogen detekován.

Značný překryv vykazuje období výskytu spor i s obdobím těsně před úhynem recipienta, zejména pokud jsou vybrána data pouze o akváriích, kde došlo k přenosu *A. astaci* na recipienty (tedy data z akvárií 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13 a 14; obrázek 9c). Pro účely statistického testování bylo období úhynu infikovaného recipienta vymezeno jako týden před odebráním jeho těla z akvária. Pravděpodobnost detekce spor i koncentrace spor byly v období úhynu infikovaných recipientů signifikantně vyšší ( $p < 0,005$ ). Protože však období úhynu infikovaných recipientů následovalo ve třech akváriích těsně po období svlékání donora, hrozilo, že byly výsledky ovlivněny spory uvolněnými z tkání donorů. Permutační testy však i po vyloučení zmíněných tří akvárií vedly ke stejnému výsledku ( $p < 0,005$ ). Před úhynem infikovaných raků říčních tedy nejspíše dochází z jejich těl k masivnímu uvolňování spor. Alternativně lze získané výsledky vysvětlit tak, že detekovány byly spory uvolněné z donora, přičemž spory stejného původu infikovaly recipienty a způsobily jejich následné hynutí. Ani jednu z uvedených alternativních hypotéz nelze na základě pořízených dat vyvrátit.

Graf, který by se věnoval detekcím spor v období svlékání recipientů, není zařazen, protože ze sedmi analyzovaných svleček recipientů byl patogen detekován pouze v jedné, a to ještě těsně nad limitem detekce. Nebyl tedy důvod domnívat se, že ze svleček recipientů docházelo k uvolňování spor *A. astaci*. Proto nedošlo ani ke statistickému testování.



**Obrázek 9:** Výsledky detekce *A. astaci* ve vodě akvárií v obdobích svlékání a úhynu raků. Těla donorů byla odebírána den po úhynu, jejich svlečky tři dny po svlékání a těla uhynulých recipientů byla odebírána hned v den jejich nalezení. Čísla ve sloupcích udávají počty akvárií.

Porovnání výsledků detekce spor ve vodě akvárií a detekce *A. astaci* v tělech recipientů (příloha 10) ukázalo, že k přenosu *A. astaci* na recipienty došlo v devíti akváriích, přičemž v sedmi z nich se předtím spory ve vodě pomocí filtrování detekovat podařilo. Spory však mohly být přítomny v detekovatelném množství ve všech devíti akváriích, pouze nemusely být ve dvou z nich zachyceny pomocí filtrování, protože v období dvou týdnů před úhynem tamějšího recipienta byla voda těchto dvou akvárií filtrována pouze jednou. Poměrně dobrou shodu výsledků detekce spor pomocí filtrování a pomocí infekčních pokusů tak vážně narušují pouze případy akvárií č. 5 a č. 10, ve kterých byly spory ve vodě detekovány, ale v tkáních recipientů patogen obvyklým postupem detekován nebyl. Přitom ani použití desetinasobného ředění a *real-time* PCR s využitím *Taq Man Environmental Master Mixu* nevedlo k detekci patogenu, a proto negativní výsledky téměř jistě nebyly způsobeny inhibicí PCR. Naměřená koncentrace spor ve vodě byla v desátém akváriu velmi nízká ( $0,28 \text{ spor}\cdot\text{ml}^{-1}$ , tedy těsně nad hranicí detekce), zatímco v pátém akváriu byla koncentrace poměrně vysoká ( $17,2 \text{ spor}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Proto nejspíše, alespoň v případě pátého akvária, nešlo o důsledek laboratorní kontaminace izolátu DNA z filtru. Hlavní možnosti vysvětlení rozporuplných výsledků detekce *A. astaci* ve vodě a v tělech recipientů jsou tedy dvě: 1) Patogen mohl růst v tkáních, které nebyly podrobeny analýze; 2) Patogenu se nemuselo podařit napadnout hostitele, ačkoliv byly spory ve vodě přítomny. Dodatečné testování izolátů DNA z dalších dvou souborů tkání recipienta z pátého akvária odhalilo, že patogen v některých částech těla přítomen byl – v jednom vzorku (zahrnujícím mimo jiné ránu po odlomení proximální části jedné kráčivé končetiny) bylo detekováno množství odpovídající 512 C.

## Diskuse

### Faktory ovlivňující uvolňování spor z donorů a přenos na recipienty

Výsledky detekce patogenu v tělech recipientů jednoznačně ukázaly, že aniž dochází ke svlékání či úhynu raka pruhovaného, může se z něj *A. astaci* šířit v množství dostatečném pro infikování raků říčních. Tento závěr vyvrací hypotézu o uvolňování spor *A. astaci* ze severoamerických raků pouze v obdobích úhynu či svlékání přenašečů. Takto striktní vymezení období sporulace bylo formulováno jen zřídka, například v práci Evanse a Edgertona (2002). Avšak někteří další autoři ve svých pracích pouze zmiňují, že ke sporulaci dochází v obdobích svlékání a úhynu severoamerických raků, aniž by komentovali možnost sporulace mimo tato období (Unestam a Ajaxon 1978; Oidtmann 2000; Oidtmann a kol. 2002; Oidtmann a kol. 2004).

Důvodem sporulace *A. astaci* v tělech donorů, kteří se nesvlékali ani neuhynuli, by mohlo být oslabení jejich imunity (Persson a Söderhäll 1983; Söderhäll a Cerenius 1999; Cerenius a kol. 2003) či stres (Diéguez-Uribeondo a Söderhäll 1993; Söderhäll a Cerenius 1999; Vogt 1999; Cerenius a kol. 2003). Tvrzení některých citovaných prací však vycházejí z pozorování sporulace v pokusech, ve kterých se u některých raků rozvinula akutní fáze račího moru vedoucí až k jejich smrti (Persson a Söderhäll 1983; Diéguez-Uribeondo a Söderhäll 1993), a z prezentovaných dat není zřejmé, zda ke sporulaci docházelo i z nehybných raků. Autoři zbývajících prací zmiňujících vliv stresu a oslabení imunity buď citují též články pojednávající o rozvinutí akutní fáze račího moru (Vogt 1999; Cerenius a kol. 2003), nebo není zdroj informace zřejmý (Söderhäll a Cerenius 1999). Důkazy o šíření *A. astaci* ze severoamerických raků, kteří se nesvlékali, ani v následujícím období neuhynuli, tedy v dostupné literatuře dosud nebyly k dispozici.

Výše naznačené zdůvodnění sporulace oslabením imunity raků během mých pokusů však trpí jedním nedostatkem. Kdyby v mých pokusech docházelo ke sporulaci následkem snížení imunity, mělo by podle současných představ o interakci *A. astaci* s imunitním systémem hostitele (například Vey a kol. 1983) dojít k rozrůstání hyf v kutikule. V tělech donorů, ze kterých došlo k přenosu patogenu, by tedy mělo být naměřeno větší množství DNA *A. astaci*. Avšak množství DNA patogenu v izolátech z těl donorů, ze kterých se patogen přenesl, a ze kterých se patogen nepřenesl, nebylo signifikantně rozdílné. Zároveň však nelze vyloučit, že skutečně mezi mírou imunitní reakce donorů a přenosem patogenu

souvislost je. Odhad množství patogenu v kutikule donorů byl jen velmi hrubý, protože izolace DNA probíhala z nestejného podílu tkání jednotlivých raků; vzorek tkání nemusel reprezentativně vypovídat o růstu *A. astaci* v celém těle a závěry se opírají o výsledky přenosu patogenu, který mohlo ovlivňovat více různých činitelů (Stephens 2005). Navíc mé výsledky nevypovídají o šíření *A. astaci* z donorů, jejichž infekce leží mimo mnou pozorované rozmezí (množství DNA patogenu v izolátu v kategoriích A<sub>5</sub> až A<sub>7</sub>). Přitom se zdá, že právě výzkum přenosu z raků s nižším rozsahem infekce by mohl vést k zajímavým výsledkům – trvalá koexistence raků říčních s populací severoamerických raků signálních s velmi nízkou intenzitou nákazy (počet PFU v izolátu v kategorii A<sub>3</sub>) naznačuje, že při nízkém rozsahu infekce v těle nemusí k přenosu na raka říčního docházet (Kozubíková a kol. 2011c).

Příčina sporulace v akváriích, kde nedošlo ani ke svlékání, ani k úhynu donora, zůstává nejasná. Hledání zdůvodnění pro všechny případy sporulace je však možná neopodstatněné – v malých množstvích se totiž podle některých odborníků spory uvolňují z raků stále (Söderhäll a Cerenius 1999; Oidtmann a kol. 2006) a další dokonce píšou pouze o stálém uvolňování spor bez zmínky o změnách jeho intenzity (Nylund a Westman 2000). Zda skutečně docházelo k uvolňování spor neustále, není možné z výsledků mé práce usoudit v důsledku omezení použitých metod (limit detekce na úrovni 25,4 spor ve 100 ml).

Naopak, zcela jednoznačně výsledky detekce DNA patogenu z filtrů prokázaly, že množství spor *A. astaci* uvolňovaných z donorů se v čase mění. Pro nalezení příčin této proměnlivosti bylo teoreticky možno využít oba použité způsoby detekce spor patogenu: pomocí filtrování vody i pomocí sledování přenosu patogenu na recipienty. K dispozici jsou výsledky detekcí *A. astaci* z vody všech pokusných akvárií za celé období pokusů přibližně s dvoutýdenním intervalem. Avšak změny koncentrací spor byly poměrně rychlé – během jednoho týdne vystoupala koncentrace v jednom akváriu více než tisíckrát a koncentrace spor klesla v tomtéž akváriu o 96 % za jeden den. Detekce *A. astaci* z pokusných filtrů zachycující okamžitý stav tedy nabízí pouze velmi omezenou informaci o změnách koncentrace spor v akváriích. Navíc v důsledku uspořádání experimentů obvykle není zřejmé, ze kterého raka detekované spory pocházejí (výjimky nastaly pouze v případech, kdy raci zůstali v akváriu sami). Těmito nevýhodami netrpí detekce pomocí přenosu patogenu na citlivé recipienty. Zato však mohou být její výsledky ovlivněny mnoha různými faktory, například stavem imunitního systému recipienta, kvalitou vody a přítomností dalších mikroorganismů (Stephens 2005).

Každý ze způsobů detekce tedy trpí jinými nevýhodami, a proto jsem se snažil výsledky obou způsobů detekce kombinovat.

Výsledky testování vzorků z akvárií, kde došlo ke svlékání donora, naznačují, že svlékání vede ke zvýšené sporulaci *A. astaci* z jeho kutikuly, k přenosu patogenu a následnému úhynu recipienta v důsledku račího moru. Podle statistického testování sice nebyla pravděpodobnost přenosu patogenu v akváriích, kde došlo ke svlékání donora, signifikantně vyšší, ale tento výsledek mohl být způsoben nízkým počtem opakování (čtyři případy), kvůli kterému by nebylo možné vliv prokázat. Masivnímu uvolňování spor v období svlékání raků ostatně nasvědčují i zmínky o uvolňování spor během tohoto období, které se v literatuře již několikrát objevily (Oidtmann 2000; Oidtmann a kol. 2002; Oidtmann a kol. 2004; Oidtmann a kol. 2006).

Úhyn donora podle statistického testování nevedl k signifikantně vyšší pravděpodobnosti přenosu ani k vyšší pravděpodobnosti detekce spor ve vodě. V roce 2009, kdy byly spory v akváriích detekovány, došlo ke třem úhynům raků. Ve dvou případech nebyly spory v období úhynu (vymezeném jako 2 týdny před a 2 týdny po úhynu) detekovány. Pozorovaný případ detekce spor ve vodě po úhynu donora v jednom akváriu může být vykládán jako náhodná sporulace, která vůbec nemusela souviset se smrtí hostitele. Teoreticky by však mohly být rozdíly výsledků v akváriích s úhynem donorů vysvětleny jako důsledek různých příčin smrti raků. Ke zvýšené sporulaci by mohlo docházet pouze v případech úhynu raka v důsledku rozvoje akutní fáze račího moru, která se projevuje rozrůstáním hyf *A. astaci* v tělech raků s fatálními následky pro hostitele (Unestam a Söderhäll 1977; Persson a Söderhäll 1983; Persson a kol. 1987). Avšak výsledky kvantifikace *A. astaci* ve tkáních uhynulých donorů tuto hypotézu nepodporují. Malý počet případů úhynu donorů v pokusných akváriích velmi snižuje věrohodnost zobecnění, přesto je jasné, že úhyn infikovaného raka pruhovaného alespoň v některých případech nevede ke zvýšenému uvolňování spor do 24 hodin po jeho smrti. Otázkou zůstává, zda by z uhynulých těl nedošlo k uvolnění spor později.

Výsledky detekce spor v akváriích naznačují, že před úhynem infikovaných raků říčních dochází z jejich těl k masivnímu uvolňování spor, ačkoliv detekovány mohly být též spory uvolněné z donorů. Mé výsledky tedy podporují hypotézu o masivním uvolňování spor před úhynem infikovaných raků citlivých, evropských druhů, která již byla několikrát formulována v odborné literatuře (Söderhäll a Cerenius 1999; Vogt 1999; Oidtmann a kol. 2002).

Výše uvedené hypotézy vysvětlovaly rozdíly v úspěšnosti přenosu patogenu na recipienty pouze na základě změn množství spor. Přítomnost spor *A. astaci* je bezesporu nutnou podmínkou přenosu a koncentrace spor jistě ovlivňuje průběh infekce (Unestam a Weiss 1970; Alderman a kol. 1987; Diéguez-Uribeondo a kol. 1995). Avšak existuje i alternativní scénář, který by vedl k infikování pouze části recipientů: spory byly přítomny i v akváriích, kde se recipienti nenakazili, ale k samotnému přenosu z nějakého důvodu nedošlo. Tomu nasvědčuje i výsledek testování vzorků z jednoho akvária (č. 10), ve kterém byl patogen detekován ve vodě pomocí filtrování, ale ne ve tkáních recipienta. Naměřená koncentrace spor (28 spor ve 100 ml) však byla nižší než všechny ostatní pozitivní detekce spor v pokusných akváriích, jen těsně totiž překročila hranici detekce (25,4 spor ve 100 ml). Proto lze předpokládat, že i pravděpodobnost přenosu nebyla tak vysoká jako v ostatních případech. Možné je i vysvětlení, že *A. astaci* v těle recipienta tohoto akvária rostl a negativní výsledek detekce byl způsoben tím, že pro analýzu byly náhodou vybrány pouze neinfikované tkáně. Tomu nasvědčuje i případ jiného akvária (č. 5), kde nebyl v prvním, ani ve druhém vzorku tkání recipienta patogen detekován, ale výsledky testování dalšího vzorku tkání ukázaly, že patogen byl na těle přítomen a k jeho přenosu tedy došlo.<sup>6</sup>

Přenos *A. astaci* na raka pruhovaného se sice podařil jen v jednom z deseti opakování pokusu, avšak nejspíše jde o první relativně spolehlivý doklad experimentálního přenosu *A. astaci* na neinfikovaného raka pruhovaného. O ten se sice již dříve pokoušeli autoři tří studií (Schikora 1916, podle Unestama 1969b; Schäperclaus 1935, podle Unestama 1969; Vey a kol. 1983), avšak v jejich případě je nejistota nepřítomnosti patogenu v recipientech před zahájením pokusu velmi vysoká. V době realizace těchto výzkumů totiž ještě nebylo možné rozhodnout o nepřítomnosti patogenu ve zdrojových populacích s dostatečnou spolehlivostí. V případě nejnovější z citovaných studií navíc i podle autorů většina recipientů nejspíš hostila *A. astaci* již před zahájením pokusů.

Pozorovaný přenos na raka pruhovaného je přitom pravděpodobně i prvním doloženým případem experimentálního přenosu *A. astaci* mezi jedinci severoamerických raků. Již dříve sice byly provedeny pokusy testující odolnost severoamerických druhů vůči

---

<sup>6</sup> Je zřejmé, že patogen by mohl být při vyhodnocení dalších vzorků tkání nalezen i v dalších recipientech, jejichž těla byla podle výsledků detekce prvního (a jediného) vzorku prostá *A. astaci*. Nicméně, první vzorky byly ze všech raků připravovány odběrem stejných tkání, a proto byla pravděpodobnost takové chyby u všech jedinců totožná. Aby nebylo toto pravidlo, které umožnilo vzájemné porovnávání výsledků, porušeno, nebyl pozitivní výsledek detekce třetího vzorku zmíněného recipienta zahrnut do statistických analýz úspěšnosti přenosu v akváriích.

sporám *A. astaci* (například Unestam a Weiss 1970; Alderman a kol. 1987; Diéguez-Uribeondo a kol. 1995), ale v těchto pokusech byli raci vždy vystavováni sporám připraveným z mycelií *in vitro*. A protože nebylo známo, zda použitá množství spor odpovídají počtům uvolňovaným z těl raků, nebylo ani zřejmé, nakolik tyto pokusy modelovaly přenos mezi raky.

Nebyl však mnou pozorovaný přenos na raka pruhovaného umožněn pouze experimentálním prostředím? Spolehlivou odpověď nashromážděná data neumožňují. Nicméně, díky kvantifikaci spor z filtrů jsou k dispozici alespoň data o jejich koncentracích. Přibližné porovnání s koncentracemi spor *A. astaci* v přírodních podmínkách umožňuje pouze jediná dosud provedená studie zkoumající koncentrace spor uvolňované z těl raků, a to ve vodě odebrané z nádrží pro chov či krátkodobé přechovávání raků signálních (Strand a kol. 2011). Abych mohl porovnávat mnou naměřené koncentrace s touto studií bez vlivu rozdílu v odhadu  $\text{PFU}_{\text{spory}}$  (který bude diskutován níže), přepočítal jsem publikované hodnoty  $\text{PFU}$  naměřené Strandem a kol. (2011) pomocí mnou stanoveného  $\text{PFU}_{\text{spory}}$ . Nejvyšší koncentrace spor ( $7,1 \text{ spor} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) byla v jejich studii naměřena v betonové nádrži s největší hustotou raků ( $107 \text{ jedinců m}^{-3}$ ), což je hodnota velmi blízká hustotě při mých akvariálních pokusech (1 přenašeč v 5 l vody, tedy  $200 \text{ jedinců m}^{-3}$ ). V ostatních nádržích s nižší hustotou raků byly obvykle koncentrace pod limitem kvantifikace ( $0,13 \text{ spor} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Ve srovnání se studií Stranda a kol. (2011) se mé výsledky u většiny akvárií pohybují v řádově stejném rozsahu. Výrazně vybočují pouze dvě akvária, ve kterých bylo naměřeno více než  $100 \text{ spor} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Přitom v jednom z nich došlo ke svlékání donora a v druhém k úhynu infikovaného recipienta, což by mohly být důvody neobvykle vysokých koncentrací spor. Z porovnání se studií Stranda a kol. (2011) tedy vyplývá, že mnou naměřené koncentrace se nejspíše řádově blížily koncentracím vyskytujícím se v přírodních lokalitách.

Výsledky této práce nabízejí i hrubý relativní odhad pravděpodobnosti přenosu *A. astaci* na severoamerického raka. Raci říční byli v mých pokusech ve srovnání s raky pruhovanými signifikantně častěji cílem úspěšného přenosu. Samozřejmě již dříve bylo jasné, že k přenosu patogenu mezi severoamerickými raky dochází, neboť jinak by se patogen v jejich populacích nemohl dlouhodobě udržovat (Matasová a kol. 2011). Ve kterém období života raka obvykle dochází k jeho infikování, však dosud není vyjasněno. Je však známo, že navzdory původním spekulacím může docházet k přenosu už na juvenilní jedince (Cerenius a kol. 1988). Mé výsledky dokazují, že k přenosu mezi severoamerickými raky může dojít i v dospělosti. Dokud nebyl takový důkaz k dispozici, mohlo docházet ke spekulacím, zda

u těchto druhů například není možný přenos pouze z matky na mláďata, což by v důsledku vedlo k velmi těsné vazbě jednotlivých kmenů parazita na jednotlivé druhy (fylogenetické linie) severoamerických raků. K této představě přitom svádí dosavadní rozlišování známých skupin kmenů *A. astaci* podle druhu jejich hostitele (Huang a kol. 1994; Diéguez-Uribeondo a kol. 1995; Kozubíková a kol. 2011b). Mé výsledky tedy naznačují, že vazba jednotlivých kmenů *A. astaci* na jednotlivé severoamerické druhy raků nemusí být absolutní, jak upozorňovali již Kozubíková a kol. (2011b).

Ačkoliv je rak říční označován jako druh citlivý vůči račímu moru (Unestam 1969a), nebyly pokusy o přenos *A. astaci* z raků pruhovaných na tento druh vždy úspěšné. Vey a kol. (1983) píše, že k úspěšnému přenosu z raka pruhovaného na raka říčního došlo pouze při použití cyklického průtokového systému namísto obyčejných akvárií. Jejich průtokový systém přiváděl vodu od fyzicky odděleného donora (raka pruhovaného) k recipientovi (raku říčnímu) a dále do filtrů naplněných štěrkem, pískem a dřevěným uhlím. Teprve po takové filtraci byla voda opět přiváděna nejprve k donorovi. Podle autorů stojí za úspěchem přenosu odfiltrování dalších mikroorganismů, které v obyčejných akváriích bránily přenosu (stejných výsledků bylo podle autorů dosaženo i při pokusech o přenos z raků signálních). Tuto hypotézu mé výsledky nepodporují, neboť voda v mých pokusných akváriích nebyla nijak filtrována. Navíc, i v jedné předchozí studii již bylo přenosu infekce z raků pruhovaných na raky říční dosaženo bez použití filtrů a za proudění vody pouze v důsledku přívodu vzduchu (Oidtmann a kol. 2006). V důsledku uvedeného rozporu výsledků jednotlivých studií a zjištěné proměnlivosti množství spor uvolňovaných z donorů si dovoluji navrhnout, že za úspěšným přenosem v průtokovém systému mohla stát zvýšená sporulace v tomto prostředí. Vey a kol. (1983) totiž ve své práci popisují, že v průtokovém systému docházelo častěji než v obyčejných akváriích k rozvoji akutní formy račího moru u raků pruhovaných.

### **Detekce spor *Aphanomyces astaci* zachycených na filtrech**

V této práci jsem spory *A. astaci* ve vodě detekoval postupem, který se shodou okolností od nedávno publikovaného návrhu Stranda a kol. (2011) liší pouze mechanismem filtrace. Podle dosavadních poznatků o specificitě *real-time* PCR zaručuje používání této metody poměrně dobrou jistotu interpretace pozitivních výsledků (Vrålstad a kol. 2009; Kozubíková a kol. 2011c; Tuffs a Oidtmann 2011). Ty by ve všech případech měly svědčit o výskytu *A. astaci* v testovaném vzorku vody. I dosud získaná data tento výklad potvrzují, protože pozitivní výsledky se objevily jen u vzorků z nádrží s raky infikovanými původcem

račího moru (Strand a kol. 2011; tato studie). Na druhou stranu, nelze vyloučit, že v budoucnu dojde k odhalení příbuzných druhů, jejichž přítomnost by mohla vést k falešně pozitivním výsledkům. Proto je třeba interpretovat pozitivní výsledky detekce *A. astaci*, získané navrženými postupy filtrace vody a následnými analýzami, velmi obezřetně a v případě pochybností závěry ověřit, například izolací patogenu nebo sekvenováním specifických úseků jeho DNA (Strand a kol. 2011).

Negativní výsledky detekce spor ve vodě mohou být způsobeny nepřítomností *A. astaci* v nádrži. Avšak i když se patogen v nádrži vyskytuje, nemusí z nejrůznějších důvodů dojít k jeho detekci ve vzorku vody. Strand a kol. (2011) upozorňují zejména na nebezpečí negativních výsledků způsobených příliš nízkou koncentrací spor, které lze snížit filtrováním velkých objemů vody. Patogen nemusí být detekován i v důsledku nerovnoměrné distribuce spor ve vodě nádrže, proto je nutné dbát na odebrání co nejrepresentativnějších vzorků (Strand a kol. 2011). Mé výsledky naznačují, že dalším důvodem negativních výsledků detekce ve vzorcích z nádrží s výskytem *A. astaci*, by mohla být proměnlivá intenzita uvolňování spor z parazitovaných severoamerických raků. Mnou užívaným postupem dokonce nebyly spory ve většině vzorků z akvárií s infikovaným severoamerickým rakem detekovány. Pozitivní výsledky zbylých vzorků jsou podle mého názoru důsledkem odběru v obdobích zvýšené sporulace, například při svlékání.

Z výše uvedených důvodů tedy považuji navržený postup detekce spor ve vodě pomocí filtrování a následných laboratorních analýz za nepříliš vhodný pro ověřování nepřítomnosti *A. astaci* ve zkoumaných nádržích, zejména pokud jde o nádrže osídlené severoamerickými rakými. Avšak ani pomocí analýz tkání severoamerických raků z přírodních lokalit není někdy snadné přítomnost *A. astaci* odhalit, neboť infikována může být pouze menšina račí populace (Kozubíková a kol. 2011c). Teprve pokusy o detekci patogenu filtrováním vody z takových nádrží umožní rozhodnout, která z metod detekce je pro zjišťování přítomnosti *A. astaci* na takových lokalitách vhodnější.

### **Absolutní kvantifikace spor *Aphanomyces astaci***

Kvantifikace spor byla v této práci založena na empiricky stanovené hodnotě PFU odpovídající jedné spoře. Tato hodnota byla podle mých výsledků odhadnuta na 7,87 PFU. Strand a kol (2011) však analogickým postupem stanovili řádově odlišnou hodnotu: 138 PFU. Rozdíl je přitom patrný už na naměřených hodnotách PFU vzorků kalibračních filtrů, a není

tedy dílem následných výpočtů. Odchylka tedy musela vzniknout v některém z předcházejících kroků, které shrnuji spolu se svými komentáři níže.

- 1) Vlastní výpočet koncentrace spor v připravené suspenzi na základě výsledků sčítání v počítací komůrce nemohu porovnat s výpočtem Stranda a kol. (2011), neboť ti jej v detailní podobě neuvádějí.
- 2) Ředění suspenze pro dosažení požadovaných koncentrací probíhalo v naší laboratoři v základních obrysech stejně, jako popisují Strand a kol. (2011). Mnou používaný postup pravděpodobně vedl ke vzniku nepřesností v důsledku nedostatečného promíchávání suspenzí, jak naznačuje velký rozptyl mnou naměřených hodnot pro jednotlivé koncentrace spor (obrázek 4). Avšak velký rozptyl není důvodem pro výrazně nižší medián všech měření, ze kterého statistika  $PFU_{spory}$  vychází (podrobnosti v části „Metodika“).
- 3) Póry filtrů, které jsem používal, byly menší (2  $\mu m$  oproti 3  $\mu m$ ), a není tedy důvodu, proč by měly propouštět více spor. Strand a kol. (2011) použili filtrační systém firmy Millipore využívající nasávání podtlakem, zatímco já jsem používal kombinaci injekčních stříkaček a nástavců, tedy přetlaku. Vzhledem k tomu, že zoospory postrádají buněčnou stěnu, dá se předpokládat, že by mohly při dostatečně velkých změnách tlaku praskat a po prasknutí by pravděpodobně obsah buněk filtrem prošel. Údaje o odolnosti zoospor *A. astaci* vůči tlakům chybí, avšak výzkumy zoospor oomyceta *Phytophthora nicotianae* naznačují, že by ani osminásobek atmosférického tlaku nemusel vést k praskání spor (Ahonsi a kol. 2010). Vzhledem k tomu, že tlaky vytvářené v injekční stříkačce byly spíše ještě nižší, nepředpokládám ovlivnění výsledků mých analýz tlakem při filtrování.
- 4) Uchování kalibračních filtrů při  $-80\text{ }^{\circ}C$  trvalo nejvýše několik měsíců a během nich nedošlo k žádnému vzrůstu teploty. Proto schází důvod pro degradaci DNA v kalibračních filtrech.
- 5) Izolace DNA v naší laboratoři probíhala podle postupu Stranda a kol. (2011). Není tedy zřejmé, proč by měla být účinnost izolací v mé práci nižší.
- 6) Během *real-time* PCR nejspíše rozdílů nevznikly, poněvadž hodnoty získané *real-time* PCR pro standardy (tedy roztoky DNA patogenu o známé koncentraci) v naší laboratoři odpovídají údajům z práce doktorky Vrålstad a kol (2009), podle které připravovali standardy i Strand a kol. (2011).

Ani poměrně detailní rozbor tedy neodhalil, jak mohly vzniknout rozdíly ve výsledcích mé práce a studie Stranda a kol. (2011). Mohlo jít o kombinaci více uvedených faktorů. K nalezení příčiny by pravděpodobně pomohly analýzy stejně připravených vzorků spor stejného kmene, což však nebylo technicky možné. Určitou kontrolu však představuje následující porovnání: Velikost genomu *A. astaci* by se (soudě podle známých velikostí genomů některých dalších oomycetů) mohla pohybovat přibližně v rozmezí 20 až 250 fg (Kamoun 2003). 5 PFU by mělo odpovídat přibližně 160 fg DNA (Vrålstad a kol. 2009). Z toho vyplývá, že 5 PFU by mělo odpovídat přibližně 0,6 až 7,2 C. Uvedenému odhadu vyhovují více mnou naměřené hodnoty kalibračních filtrů a podle nich vypočtená hodnota  $PFU_{spory} = 7,87$ , neboť podle nich odpovídá 5 PFU 0,64 C, zatímco podle odhadu Stranda a kol. (2011) odpovídá 5 PFU 0,04 C.

Posouzení obou odhadů by mohlo nabízet i předpokládané množství kopií sledovaného úseku ITS v genomu. Jak již bylo dříve zmíněno, ITS je součástí oblasti kódující rRNA, tedy oblasti označované jako rDNA.<sup>7</sup> Počet kopií této rDNA v genomu *A. astaci* dosud není známý, a pro jeho odhad lze tedy použít pouze data o jiných druzích. Původce račích moru patří do skupiny Chromalveolata, která se skládá ze dvou menších skupin: Chromista a Alveolata (Beakes a Sekimoto 2008). V dostupné literatuře jsem našel pouze údaje o množství kopií rDNA v druzích patřících mezi Alveolata. U 19 druhů ze 12 rodů této skupiny se počet kopií rDNA pohybuje mezi 2 a 9 000 (Torres-Machorro a kol. 2010). Rozpětí těchto hodnot tedy zahrnuje jak můj odhad, tak odhad Stranda a kol. (2011).

Ani porovnání s úhyny raků v pokusných akváriích neposkytuje odpověď na otázku, zda se mé odhady  $PFU_{spory}$  odchylují od skutečnosti. Není totiž známo, jaká je nejnižší koncentrace spor nutná pro přenos na raky říční. Ideální by pro posouzení mého odhadu  $PFU_{spory}$  bylo porovnání mnou naměřených koncentrací s očekáváním pramenícím z dosavadních poznatků. Avšak jediné výsledky kvantifikace spor uvolněných z parazitovaných raků nabízejí právě Strand a kol. (2011).

Z výše uvedeného vyplývá, že pro zamítnutí vlastního odhadu  $PFU_{spory}$  nenalézám dostatečné opodstatnění, a proto jej považuji za důvěryhodný. I kdyby se však v budoucnu ukázalo, že se mé odhady od skutečné hodnoty  $PFU_{spory}$  podstatně liší, nebylo by to důvodem pro zamítnutí všech mých výše uvedených závěrů vycházejících z výsledků kvantifikace spor.

---

<sup>7</sup> Přesněji: ITS je součástí oblasti kódující pouze některé rRNA, a to 18 S, 5,8 S a 28 S rRNA, zatímco 5 S rRNA bývá kódována jinou oblastí genomu (Torres-Machorro a kol. 2010).

Mnohé z nich totiž byly založeny na relativním porovnávání množství detekovaných spor ve vzorcích.

### **Přetrvávání *Aphanomyces astaci* v kutikule severoamerických raků**

Pro přetrvávání patogenu v severoamerických racích navzdory jejich svlékání existuje více vysvětlení (Unestam a Södehäll 1977; Matasová a kol. 2011), která se nacházejí v rozmezí dvou extrémních formulací: 1) *A. astaci* rostoucí v kutikule severoamerických raků prorůstá ještě před svlékáním do nové kutikuly, kde se už záhy po svlékání nachází ve velkém množství; 2) Severoameričtí raci se patogenu račího moru svlékáním staré kutikuly nejprve zcela zbavují, až později dochází k jejich opětovné infekci.

Výsledky dlouhodobého sledování prevalence parazita v jedné přírodní populaci raků pruhovaných naznačují, že po období svlékání klesá pravděpodobnost úspěšné detekce parazita v tkáních raků. Jedním z vysvětlení by přitom mohlo být odstranění parazita z těla v důsledku svlékání (Matasová a kol. 2011). Výsledky detekce patogenu ve svlečkách donorů z mých pokusů ukázaly, že i pouhé tři dny po svlékání byl patogen v těle raka pruhovaného detekován – v izolátu z tkání jeho těla bylo přítomno 36 000 C DNA *A. astaci*. Podle výsledků měření koncentrace spor bylo v den svlékání přítomno ve volné vodě akvária 961 spor·ml<sup>-1</sup> a ještě v den odebrání raka z akvária byla naměřena koncentrace 131 spor·ml<sup>-1</sup>. Koncentrace poblíž svlečky, kde se rak nacházel, přitom mohly být ještě větší a kutikula raka tedy byla přibližně 72 hodin po svlékání vystavena enormnímu množství spor. Proto nelze vyloučit, že se nejprve dotyčný rak pruhovaný hyf *A. astaci* svým svlékáním zbavil, a detekované množství parazita tedy pochází z nové infekce. Definitivní rozhodnutí by mohly přinést jen pokusy, ve kterých by byli raci odděleni od své svlečky ihned po svlékání.

## Závěr

Hlavním přínosem mé práce je prokázání přenosu račího moru ze severoamerického druhu raka i mimo období jeho svlékání a úhynu. Tento výsledek kromě jiného naznačuje, že hrozba přenosu račího moru vodou z nádrží s výskytem *A. astaci* v populaci severoamerických raků je stálá, a proto by opatření proti šíření račího moru navrhovaná v odborné literatuře (například Håstein a Gladhaug 1973; Taugbøl a kol. 1993; Dehus a kol. 1999; Taugbøl a Skurdal 1999; Oidtmann a kol. 2002) měla být skutečně uplatňována celoročně. Přenos *A. astaci* byl v jednom případě prokázán i mezi dospělými raky pruhovanými, což naznačuje, že by vazba jednotlivých kmenů *A. astaci* na jednotlivé druhy severoamerických raků nemusela být stálá. Teprve výsledky budoucích terénních výzkumů však nejspíše ukáží, zda k přenosům *A. astaci* mezi různými druhy severoamerických raků v přírodních podmínkách dochází.

Množství spor *A. astaci* uvolňované z infikovaných severoamerických raků se podle výsledků této práce v čase mění. Vyšší množství spor se přitom uvolňuje během svlékání těchto raků. Předpokládané zvýšení počtu uvolňovaných spor v období úhynu infikovaného severoamerického raka nebylo prokázáno. Pokud k němu skutečně dochází, pak buď jen v některých případech, nebo až po více než 24 hodinách od úhynu. Naopak období úhynu infikovaných raků říčních je nejspíše spojeno s masivním uvolňováním spor, i když je možné, že část z detekovaných spor pocházela i z těla donora. Posouzení naznačených sporných závěrů by mohly přinést pokusy, ve kterých by byli v akváriích přítomni jen jednotliví parazitovaní raci, s jejichž svlékáním či úhynem by mohlo být manipulováno. Vliv rozsahu infekce v těle donora v pozorovaném rozmezí (tisíce až statisíce C v izolátu) nejspíš pravděpodobnost přenosu výrazněji neovlivňuje. Jak je tomu mimo toto rozmezí, zejména při nízkých množstvích patogenu v tělech raků, zůstává i nadále otázkou.

Navržená metoda filtrování vody může sloužit jako určitý způsob kontroly dat získaných testováním přenosu, protože její výsledky nejsou ovlivněny rozdíly mezi citlivostí jednotlivých raků říčních. Oproti detekci spor pomocí sledování přenosu na citlivé druhy raků může analýza spor zachycených pomocí filtrů přinést i data o koncentraci spor ve vodě a jejich změnách v průběhu času. Na druhou stranu, většina výsledků kvantifikace spor z pokusných filtrů byla negativní, ačkoliv v akváriu byl přítomen infikovaný rak, a proto není tato metoda vhodná pro ověřování nepřítomnosti *A. astaci* v nádržích.

Odhady průměrného množství DNA patogenu v jedné spoře, které se používají pro absolutní kvantifikaci spor, se zatím velmi liší. Předpokládané ztráty způsobené filtrací pomocí injekční stříkačky, které mohly ovlivnit můj odhad, by mohly být odhaleny porovnáním výsledků kvantifikace spor ve vzorcích získaných ze suspenzí spor o známé koncentraci jejich filtrováním a centrifugováním. Jakmile bude průměrné množství DNA patogenu v jedné spoře dostatečně spolehlivě stanoveno, bude moci být absolutní kvantifikace spor *A. astaci* využíváno k dalším výzkumům tohoto významného parazita.

## Seznam zkratek

- $A_1$  až 7 kategorie množství DNA *A. astaci* ve vzorku podle doktorky Vrålstad a kol. (2009), podrobnosti jsou v příloze 1.
- C průměrné množství DNA nacházející se v jedné spoře *A. astaci*.
- Ct pořadí cyklu *real-time* PCR, při kterém došlo k překročení stanovené míry fluorescence v reakci; hodnota sloužící pro výpočet množství DNA ve vzorku; z anglického *cycle threshold*.
- ITS část genetické informace, která je v této práci cílem druhově specifických primerů používaných pro detekci a kvantifikaci *A. astaci* při PCR; z anglického *internal transcribed spacer*.
- PCR polymerázová řetězová reakce; z anglického *polymerase chain reaction*.
- PFU teoreticky vypočítaný minimální počet kopií sledovaného úseku DNA ve vzorku, které sloužily během PCR jako matrice; z anglického *PCR-forming units*.
- PFU<sub>spory</sub> počet PFU nalézající se průměrně v jedné spoře *A. astaci*, tedy množství PFU odpovídající 1 C.
- PFU<sub>vzorku</sub> počet PFU v 5 µl vzorku stanovený na základě *real-time* PCR, obvykle jako medián více měření téhož vzorku (podrobnosti jsou v kapitole „*Real-time* PCR“).

## Seznam literatury

Práce označené hvězdičkou jsou citovány nepřimo.

- Ahonsi M. O., Banko T. J., Doane S. R., Demuren A. O., Copes W. E., Hong C. (2010): Effects of hydrostatic pressure, agitation and CO<sub>2</sub> stress on *Phytophthora nicotianae* zoospore survival. *Pest Management Science* 66: 696-704.
- Alderman D. J., Polglase J. L. (1986): *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *Journal of Fish Diseases* 9: 367-379.
- Alderman D. J., Polglase J. L., Frayling M. (1987): *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *Journal of Fish Diseases* 10: 385-393.
- Beakes G. W., Sekimoto S. (2008): The evolutionary phylogeny of oomycetes — insights gained from studies of holocarpic parasites of algae and invertebrates. In: Lamour K. a Kamoun S. (eds.): *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 1-24.
- Benisch J. (1940): Künstlich hervorgerufenen *Aphanomyces* Befall bei Wollhandkrabben. *Zeitschrift für Fischerei* 38: 71-80.
- Cerenius L., Söderhäll K. (1984a): Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropod-parasitic fungus. *Journal of Invertebrate Pathology* 43: 278-281.
- Cerenius L., Söderhäll K. (1984b): Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Experimental Mycology* 8: 370-377.
- Cerenius L., Söderhäll K., Persson M., Ajaxon R. (1988): The crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation, and pathobiology. *Freshwater Crayfish* 7: 131-144.
- Cerenius L., Laurent P., Edsman L. (2002): Roundtable session 3A: Protection of natives in a plague situation. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*: 909-910.
- Cerenius L., Bangyeekhun E., Keyser P., Söderhäll I., Söderhäll K. (2003): Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cellular Microbiology* 5: 353-357.
- Dehus P., Phillipson S., Bohl E., Oidtmann B., Keller M., Lechleiter S. (1999): German conservation strategies for native crayfish species with regard to alien species. In: Gherardi F. a Holdich D. M. (eds.): *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?* A. A. Balkema, Rotterdam, 149-159.
- Diéguez-Uribeondo J., Söderhäll K. (1993): *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 761-765.
- Diéguez-Uribeondo J., Huang T. S., Cerenius L., Söderhäll K. (1995): Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycological Research* 99: 574-578.
- Diéguez-Uribeondo J. (2006): Pathogens, parasites and ectocommensals. In: Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noël P. Y., Reynolds J. D. a Haffner P. (eds.): *Atlas of crayfish in Europe*. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 131-149.
- Evans L. H., Edgerton B. F. (2002): Pathogens, parasites and commensals. In: Holdich D. M. (ed.): *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, 377-438.

- Füreder L. (2006): Indigenous crayfish habitat and threats. In: Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noël P. Y., Reynolds J. D. a Haffner P. (eds.): Atlas of crayfish in Europe. *Muséum national d'Histoire naturelle, Paris*, 25-47.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M. A., Bennett M. D. (2005): The origin, evolution and proposed stabilization of the terms "Genome Size" and "C-Value" to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95: 255-260.
- Håstein T., Gladhaug O. (1973): The occurrence of the crayfish plague in Norway and attempts to prevent further spread of the disease. *Freshwater Crayfish* 1: 181-184.
- Hochwimmer G., Tober R., Bibars-Reiter R., Licek E., Steinborn R. (2009): Identification of two GH18 chitinase family genes and their use as targets for detection of the crayfish-plague oomycete *Aphanomyces astaci*. *Bmc Microbiology* 9: 184.
- Holdich D. M., Haffner P., Noël P. Y. (2006): Species files. In: Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noël P. Y., Reynolds J. D. a Haffner P. (eds.): Atlas of crayfish in Europe. *Muséum national d'Histoire naturelle, Paris*, 49-129.
- Huang T. S., Cerenius L., Söderhäll K. (1994): Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* 126: 1-9.
- Järvenpää T., Nylund V., Railo E., Westman K. (1986): The effects of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* on the haemolymph of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater Crayfish* 6: 223-233.
- Kamoun S. (2003): Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell* 2: 191-199.
- Kozubíková E., Petrušek A., Ďuriš Z., Kozák P., Geiger S., Hoffmann R., Oidtmann B. (2006): The crayfish plague in the Czech Republic – review of recent suspect cases and a pilot detection study. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*: 1313-1323.
- Kozubíková E., Petrušek A., Ďuriš Z., Oidtmann B. (2007): *Aphanomyces astaci*, the crayfish plague pathogen, may be a common cause of crayfish mass mortalities in the Czech Republic. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 27: 79-82.
- Kozubíková E., Petrušek A., Ďuriš Z., Martín M. P., Diéguez-Urbeondo J., Oidtmann B. (2008): The old menace is back: Recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Aquaculture* 274: 208-217.
- Kozubíková E., Filipová L., Kozák P., Ďuriš Z., Martín M. P., Diéguez-Urbeondo J., Oidtmann B., Petrušek A. (2009): Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. *Conservation Biology* 23: 1204-1213.
- Kozubíková E., Petrušek A. (2009): Račí mor – přehled dosavadních poznatků o závažném onemocnění raků a zhodnocení situace v České republice. *Bulletin VÚRH Vodňany* 45: 34-57.
- Kozubíková E., Koukol O., Martín M. P., Petrušek A., Diéguez-Urbeondo J. (2011a): Diversity of oomycetes on crayfish: morphological vs. molecular determination of cultures obtained while isolating a crayfish plague pathogen. In: Kozubíková E.: Detection, distribution, diversity and phylogeny of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes). *Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta*, 9-1–9-18.

- Kozubíková E., Viljamaa-Dirks S., Heinikainen S., Petrusek A. (2011b): Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci*. *Journal of Invertebrate Pathology*: DOI 10.1016/j.jip.2011.08.002.
- Kozubíková E., Vrálstad T., Filipová L., Petrusek A. (2011c): Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan real-time PCR. In: Kozubíková E.: Detection, distribution, diversity and phylogeny of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes). *Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta*, 4-11-4-22.
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2004): 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database *The Invasive Species Specialist Group (ISSG), a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the IUCN, Gland, Switzerland*, 12 s.
- Matasová K., Kozubíková E., Svoboda J., Jarošík V., Petrusek A. (2011): Temporal variation in the prevalence of the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, in three Czech spiny-cheek crayfish populations. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*: 14.
- Nylund V., Westman K. (2000): The prevalence of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) in two signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) populations in Finland. *Journal of Crustacean Biology* 20: 777-785.
- Oidtmann B., Schmid I., Rogers D., Hoffmann R. W. (1999): An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Freshwater Crayfish* 12: 303-312.
- Oidtmann B. (2000): Diseases in freshwater crayfish, In: Rogers D. a Brickland J. (eds.), *Proceedings of the Crayfish Conference held on 26<sup>th</sup>/27<sup>th</sup> April 2000 in Leeds, Environment Agency*: 9–18.
- Oidtmann B., Heitz E., Rogers D., Hoffmann R. W. (2002): Transmission of crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms* 52: 159-167.
- Oidtmann B., Schaefer N., Cerenius L., Söderhäll K., Hoffmann R. W. (2004): Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR. *Veterinary Microbiology* 100: 269-282.
- Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A., Hoffmann R. W. (2006): Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 53-64.
- OIE. (2009): Crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic animals. Chapter 2.2.1., dostupné na: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/2010/2.2.01\\_CRAYFI\\_SH.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2010/2.2.01_CRAYFI_SH.pdf), 63-77.
- Olson L. W., Cerenius L., Lange L., Söderhäll K. (1984): The primary and secondary spore cyst of *Aphanomyces* (Oomycetes, Saprolegniales). *Nordic Journal of Botany* 4: 681-696.
- Persson M., Söderhäll K. (1983): *Pacifastacus leniusculus* (Dana) and its resistance to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish* 5: 292-298.

- Persson M., Cerenius L., Söderhäll K. (1987): The influence of haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Diseases* 10: 471-477.
- Royo F., Andersson G., Bangyeekhun E., Muzquiz J. L., Söderhäll K., Cerenius L. (2004): Physiological and genetic characterisation of some new *Aphanomyces* strains isolated from freshwater crayfish. *Veterinary Microbiology* 104: 103-112.
- \*Schäperclaus W. (1935): Die Ursache der pestartigen Krebssterben. *Zeitschrift für Fischerei* 33: 343-366.
- \*Schikora F. (1916): Die Wiederbevölkerung der deutschen Gewässer mit Krebsen *Emil Hübner Verlag, Bautzen, Německo*.
- Schulz R., Stucki T., Souty-Grosset C. (2002): Management: Reintroductions and restocking. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 367: 917-922.
- Söderhäll K., Cerenius L. (1999): The crayfish plague fungus: History and recent advances. *Freshwater Crayfish* 12: 11-35.
- Stephens F. (2005): Disease strategy: Crayfish plague (Version 1.0), *Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, ACT, dostupné na: [http://www.daff.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0003/156126/crayfishplague29Jun05.pdf](http://www.daff.gov.au/__data/assets/pdf_file/0003/156126/crayfishplague29Jun05.pdf)*: 63 s.
- Strand D. A., Holst-Jensen A., Viljugrein H., Edvardsen B., Klaveness D., Jussila J., Vrålstad T. (2011): Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Diseases of Aquatic Organisms* 95: 9-17.
- Svensson E., Unestam T. (1975): Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologie Plantarum* 35: 210-216.
- Svoboda J. (2009): Mechanismy a prevence prenosu račího moru. *Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 37 s.*
- Svoboda J., Kozubíková E., Kozák P., Kouba A., Bahadır Koca S., Diler Ö., Diler I., Polícar T., Petrušek A. (2011): Molecular detection of the crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*) in a Turkish lake. In: Kozubíková E.: Detection, distribution, diversity and phylogeny of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes). *Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 8-1-8-8.*
- Taugbøl T., Skurdal J., Hastein T. (1993): Crayfish plague and management strategies in Norway. *Biological Conservation* 63: 75-82.
- Taugbøl T., Skurdal J. (1999): The future of native crayfish in Europe: How to make the best of a bad situation? In: Gherardi F. a Holdich D. M. (eds.): Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation? A. A. Balkema, Rotterdam, 271-279.
- Taugbøl T. (2004): Reintroduction of noble crayfish *Astacus astacus* after crayfish plague in Norway. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 372-73: 315-328.
- Torres-Machorro A. L., Hernández R., Cevallos A. M., López-Villaseñor I. (2010): Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiology Reviews* 34: 59-86.

- Tuffs S., Oidtmann B. (2011): A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2011.06.012.
- Unestam T. (1966): Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiologie Plantarum* 19: 1110-1119.
- Unestam T. (1969a): Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm* 49: 202-209.
- Unestam T. (1969b): On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiologia Plantarum* 22: 221-235.
- Unestam T., Weiss D. W. (1970): The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: Responses to infection by a susceptible and a resistant species. *Journal of General Microbiology* 60: 77-90.
- Unestam T. (1972): On the host range and origin of the crayfish plague fungus. *Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm* 52: 192-198.
- Unestam T. (1975): Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 53: 349-359.
- Unestam T., Söderhäll K. (1977): Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish. *Nature* 267: 45-46.
- Unestam T., Ajaxon R. (1978): The crayfish plague fungus, the ecological niche of a specialized fungus and the fate of the fungus in the crayfish host (summary of 16mm film, sound, 35 min.). *Freshwater Crayfish* 4: 399-401.
- Vey A., Söderhäll K., Ajaxon R. (1983): Susceptibility of *Orconectes limosus* Raff. to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish* 5: 284-291.
- Viljamaa-Dirks S., Heinikainen S. (2006): Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshwater Crayfish* 15: 376-382.
- Viljamaa-Dirks S. (2008): Introduction. In: Viljamaa-Dirks S. (ed.): Crayfish disease diagnostics - towards a Nordic standard. *Finnish Food Safety Authority Evira, Research department, Kuopio*, 8-12.
- Vogt G. (1999): Diseases of European freshwater crayfish, with particular emphasis on interspecific transmission of pathogens. In: Gherardi F. a Holdich D. M. (eds.): Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation? A. A. Balkema, Rotterdam, 87-103.
- Vrålstad T., Knutsen A. K., Tengs T., Holst-Jensen A. (2009): A quantitative TaqMan MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 137: 146-155.
- Vrålstad T., Johnsen S. I., Fristad R. F., Edsman L., Strand D. (v tisku): A potent infection reservoir of crayfish plague is permanently established in Norway - the noble crayfish fort has fallen. Přijato do *Diseases of Aquatic Organisms*.

## **Přílohy**