



UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie

✉ Viničná 7, 128 44 Praha 2

☎ +420 2 21951804, fax: +420 2 221951673, E-mail: ecology@natur.cuni.cz

V Praze dne 3. června 2018

Zpráva o prověření uhynulých raků z Rožnovské Bečvy na přítomnost patogenu račího moru

Stručný popis provedených prací

Na základě objednávky Městského úřadu Rožnov pod Radhoštěm bylo na přítomnost patogenu račího moru *Aphanomyces astaci* analyzováno 5 jedinců raka říčního, kteří byli odebráni 25. května 2018 z Rožnovské Bečvy na místě pozorovaného úhynu raků v intravilánu Rožnova. Z těchto raků byly vypitvány měkká kutikula zadečku a část ocasní ploutvičky, z nichž byla pomocí standardních protokolů (dle Kozubíkové a kol. 2009) izolována DNA.

Pomocí v současnosti nejcitlivějšího molekulárního protokolu (*real-time* MGB PCR dle Vrálstadové a kol. 2009), jež je pro detekci račího moru doporučován v protokolech *World Organization of Animal Health* (OIE), byly izoláty ze všech jedinců testovány na přítomnost DNA patogenu. Paralelně byla v analýze použita jak pozitivní kontrola (DNA laboratorního kmenu *Aphanomyces astaci*) pro potvrzení, že analytické postupy patogen račího moru detekují, tak negativní kontroly vylučující případnou kontaminaci vzorků během laboratorního zpracování.

Výsledky a závěr

Ve všech případech **byla potvrzena přítomnost genetické informace patogenu račího moru *Aphanomyces astaci* ve vysokém množství.** Je tedy vysoce pravděpodobné, že **račí mor byl přímou příčinou úhynu sledovaných jedinců.** K negativnímu dopadu račího moru mohl přispět i stres způsobený např. znečištěním, pokud se jednalo o méně virulentní kmen patogenu, ve většině případů (zejména v případě vysoce virulentních kmenů) ale končí nákaza raka kamenáče račím morem i bez dodatečného stresu.

Otestovat, o jaký kmen patogenu se jednalo a který račí druh mohl být pravděpodobným zdrojem nákazy, lze dodatečnými laboratorními analýzami nad rámec objednaných prací. Na základě našich předchozích studií (Kozubíková-Balcarová a kol. 2014) je možné, že kmen patogenu byl zavlečen do Bečvy i bez přítomnosti nepůvodních druhů raků v bezprostředním okolí.

prof. RNDr. Adam Petrušek, Ph.D.
katedra ekologie PřF UK

Příloha

Zdůvodnění výběru použité metody

Pro detekci původce račího moru v račích byly dosud navrženy tři základní typy metod: 1) mikroskopické pozorování, 2) izolace živé kultury patogenu a infekční pokusy, 3) molekulární metody. Pro detekci byla použita jedna z molekulárních metod, konkrétně *real-time* MGB PCR dle Vrålstad a kol. (2009). Tato metoda je doporučována pro detekci *Aphanomyces astaci* i organizací World Organisation for Animal Health (OIE 2012), a to z následujících důvodů:

1) Pozorování těl raků (ani s využitím mikroskopu) nevede ke spolehlivému rozhodnutí o přítomnosti či nepřítomnosti *A. astaci*, neboť může dojít k záměně tohoto patogenu za jiné, neškodné druhy plísním podobných organismů (Oidtmann a kol. 1999).

2) Izolace živé kultury *A. astaci* z tkání zkoumaných raků pruhovaných a následné pokusy o přenos patogenu na citlivé druhy raků (například na raka říčního) je v případě úspěšného přenosu jednoznačným důkazem přítomnosti patogenu. Kvůli nízké citlivosti však nelze tento přístup doporučit pro rutinní testování – ani při optimálních podmínkách se totiž patogen nepodaří izolovat z velké části raků uhynulých v důsledku napadení račím morem (Oidtmann a kol. 1999).

3) Nejnovější a nejcitlivější možností detekce je použití některé z molekulárních metod, jejichž principem je vyhledání genetické informace parazita ve vzorku tkání raků (resp. namnožení specifických úseků genetické informace parazita v DNA izolované z vybraných tkání zkoumaných raků). Těchto metod bylo postupně navrženo více (Oidtmann a kol. 2004; Oidtmann a kol. 2006; Hochwimmer a kol. 2009; Vrålstad a kol. 2009). OIE doporučuje *real-time* MGB PCR dle Vrålstadové a kol. (2009), jež je z navržených metod podle dosavadních poznatků nejcitlivější, a zároveň při jejím použití hrozí nejmenší riziko falešné pozitivní detekce, tj. záměny parazita s příbuznými druhy (Tuffs a Oidtmann 2011, Kozubíková a kol. 2011).

Metodika

Real-time MGB PCR slouží k detekci DNA parazita (konkrétně úseku jaderného genomu *Internal Transcribed Spacer*) v izolátech DNA ze zkoumaných tkání raků. Využívány jsou tři specificky navržené oligonukleotidy komplementární s DNA parazita (dva primery a jedna fluorescenčně značená sonda). Z důvodů omezení daných použitou metodou izolace DNA (omezená hmotnost vzorku) a *real-time* PCR (maximalizace poměru DNA parazita vůči veškeré DNA, minimalizace inhibice) bylo nutné vybírat pro izolaci DNA jen část tkání z každého těla. Podle dosavadních prací je největší pravděpodobnosti detekce parazita dosaženo při izolaci z ocasní ploutvičky a měkkých částí kutikuly ze spodní strany zadečku (Oidtmann a kol. 2006). Proto byly z každého těla sterilními nástroji vypitvány právě tyto části těl. Následně byly tyto tkáně drceny po zmrazení tekutým dusíkem a z části získané směsi (o hmotnosti cca 40 µg) byla izolována DNA pomocí izolačního kitu pro živočišné tkáně *DNeasy Animal Tissue kit* (Qiagen).

Přítomnost *A. astaci* v takto získaných izolátech DNA byla ověřována pomocí kvantitativní PCR s použitím speciální značené sondy TaqMan® *Minor Groove Binder* (Vrålstad a kol. 2009). Jelikož s sebou použití PCR přináší riziko falešně negativních výsledků detekce či podhodnocení množství DNA patogenu v důsledku inhibice reakce, byl pro reakce používán *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 minimalizován pomocí provedení *real-time* PCR i pro desetinásobná ředění původních izolátů DNA. Do analýzy byly zařazeny i kontrolní vzorky neobsahující DNA patogenu.

Výsledky a interpretace

Celkem bylo analyzováno 5 izoláty DNA z testovaných raků. Ve všech byla zachycena relativně vysoká koncentrace DNA patogenu račího moru (kategorie A4-A6 podle Vrålstadové a kol. 2009) prokazující, že v okamžiku úhynu byli tyto jedinci patogenem nakaženi.

Paralelně analyzované kontrolní vzorky bez DNA patogenu byly negativní, stejně jako izoláty DNA z nenakažených jedinců raků z jiné lokality, zařazené do stejné analýzy. To prokazuje, že výše zmiňované pozitivní detekce patogenu račího moru nebyly způsobeny laboratorní kontaminací.

Citované zdroje

- 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.
- Kozubíková E., Filipová L., Kozák P., Ďuriš Z., Martín M.P., Diéguez-Uribeondo J., Oidtmann B., Petrussek A. (2009): Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. *Conservation Biology*, 23(5): 1204-1213.
- Kozubíková E., Vrålstad T., Filipová L., Petrussek A. (2011): Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 113-125.
- Kozubíková-Balcarová E., Beran L., Ďuriš Z., Fischer D., Horká I., Svobodová J., Petrussek A. (2014): Status and recovery of indigenous crayfish populations after recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Ethology Ecology & Evolution*, 26(2-3): 299-319.
- 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.
- 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., 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.
- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2012. OIE – World Organisation for Animal Health, Paris.

- 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.
- Tuffs S., Oidtmann B. (2011): A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 153: 343-353.
- Vrålstad T., Knutsen A.K., Tengs T. and 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.