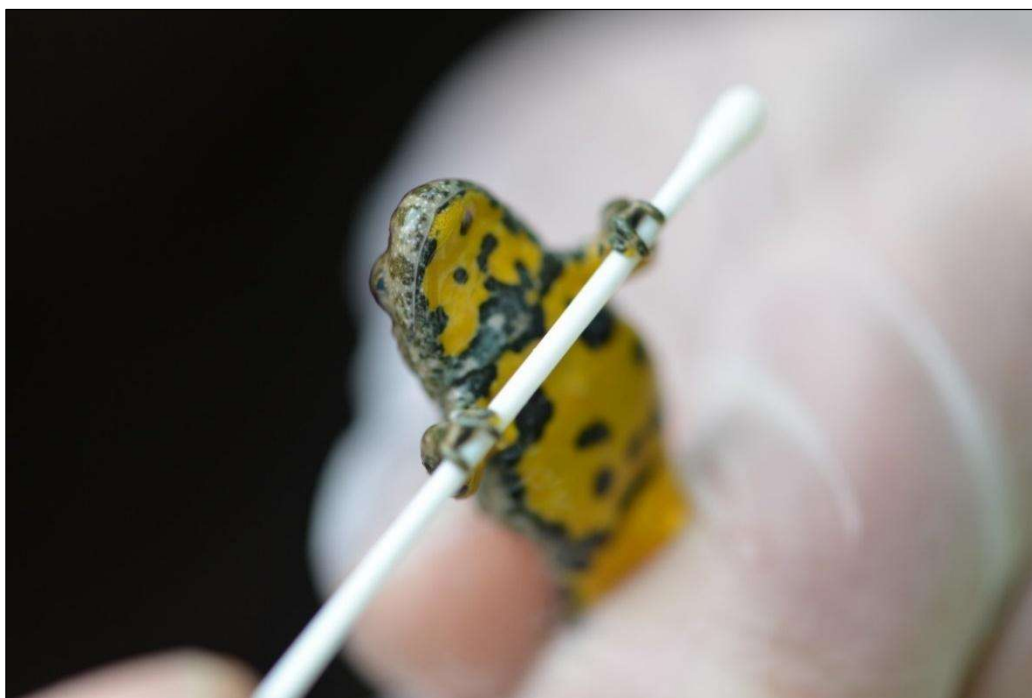


METODIKA KOMPLEXNÍ OCHRANY OBOJŽIVELNÍKŮ V SOUVISLOSTI S NOVĚ SE ŠÍŘÍCÍMI INFEKČNÍMI NEMOCEMI

Jiří Vojar, Vojtech Baláž, Alena Balážová, David Lastra González, Kamil Sedlák



Praha 2023



Autorský kolektiv

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Mgr. Vojtech Baláž, Ph.D.

Mgr. Alena Balážová, Ph.D.

Msc. David Lastra González, Ph.D.

MVDr. Kamil Sedlák, Ph.D.

Konzultace a odborná spolupráce

Ing. Jan Šíma (MŽP)

Recenzenti

RNDr. Ivan Rehák, CSc. (Zoo Praha, PřF UK Praha)

Mgr. Lenka Jeřábková (AOPK ČR)

Publikace je výstupem projektu “Ochrana biodiverzity obojživelníků v souvislosti s invazemi nových infekčních nemocí”, podporovaného Technologickou agenturou České republiky v rámci programu Prostředí pro život – Podpora aplikovaného výzkumu, experimentálního vývoje a inovací v oblasti životního prostředí (projekt č. SS01010233).

Bibliografická citace

Vojar J., V. Baláž, A. Balážová, D. Lastra González & K. Sedlák 2023: Metodika komplexní ochrany obojživelníků v souvislosti s nově se šířícími infekčními nemocemi. Certifikovaná metodika MŽP, dostupná online na www.mzp.cr.

Obsah

1. Úvod do problematiky	5
2. Stav a příčiny ohrožení obojživelníků	7
2.1 Současný stav ohrožení obojživelníků	7
2.2 Příčiny ohrožení obojživelníků	9
3. Přehled patogenů a nálezů obojživelníků	11
3.1 Chytridiomycety	12
3.2 Ranaviry.....	19
3.3 Herpesviry	20
3.4 Saprolegnie a mikrosporidie	20
3.5 "Prvoci (Protozoa)"	21
3.6 Bakterie (Bacteria).....	23
3.7 Další patogeny.....	23
4. Právní souvislosti a východiska na evropské a globální úrovni.....	25
4.1 Legislativa EU	25
4.2 Regulace mezinárodní obchodu s obojživelníky	27
4.3 Regulace obchodu – příklady.....	28
5. Příklady preventivních a zmírňujících opatření	30
5.1 Informační zdroje a osvěta	30
5.2 Systémy včasného varování.....	32
5.3 Preventivní opatření	36
5.4 Zmírňující opatření	39
5.5 Akční plány	44
6. Návrh systému opatření pro Českou republiku	47
6.1 Vymezení řešených patogenů a nálezů.....	48
6.2 Vymezení prioritních druhů obojživelníků	48
6.3 Vymezení prioritních oblastí.....	49
6.4 Vymezení a kompetence dotčených subjektů	49
6.5 Systém včasného varování (SVV)	50
6.6 Protokoly reakcí na patogeny v chovech a při obchodu s obojživelníky	54
6.7 Protokoly reakcí na patogeny ve volné přírodě	55
7. Použitá literatura.....	57
8. Přílohy	74

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam
AOPK ČR	Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky
AP	Akční plán
<i>Bd</i>	Patogen <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
<i>Bsal</i>	Patogen <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>
CITES	Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)
CS ČR	Celní správa České republiky
ČHS	Česká herpetologická společnost
ČIŽP	Česká inspekce životního prostředí
ČR	Česká republika
ČS	Červené seznamy
eDNA	Environmentální DNA
EK	Evropská komise, Komise EU
EU	Evropská unie
EVL	Evropsky významná lokalita
GV	Genetická variabilita
CHKO	Chráněná krajinná oblast
IUCN	Mezinárodní svaz ochrany přírody (International Union for Conservation of Nature)
KÚ	Krajský úřad(y)
KVS	Krajská veterinární správa
MZE	Ministerstvo zemědělství
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
NAP	Národní akční plán
NDOP	Nálezová databáze AOPK ČR
NP	Národní park
NPP	Národní přírodní památka
NPR	Národní přírodní rezervace
OIE	Světová organizace pro zdraví zvířat (The World Organisation for Animal Health)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RP AOPK ČR	Regionální pracoviště AOPK ČR
SVS	Státní veterinární správa
SVÚ	Státní veterinární ústav
SVV	Systém včasného varování
TAČR	Technologická agentura České republiky
TK	Těžké kovy
UV	Ultrafialové záření
ZCHD	Zvláště chráněné druhy (dle zákona č. 1992/1992 Sb.)

1. Úvod do problematiky

Obojživelníci patří mezi nejvíce ohrožené obratlovce. Čelí totiž mnoha negativním vlivům včetně invazních patogenů. Mezi nejnebezpečnější patří patogenní houby *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (Berger et al. 1998, Longcore et al. 1999) a *B. salamandrivorans* (*Bsal*) (Martel et al. 2013, 2014), způsobující závažné onemocnění chytridiomykózu, a dále ranaviry, zodpovědné za tzv. ranavirózy (Price et al. 2014). Invaze nových nákaz obojživelníků představují celosvětový problém. Mají souvislost s prokazatelně negativními dopady na populace většiny obojživelníků a jsou zodpovědné za recentní vyhynutí desítek druhů (Scheele et al. 2019). Šíření patogenů je výrazně podporováno globálním trhem s obojživelníky, ať už za kulinářskými, vědeckými či chovatelskými účely (Yap et al. 2017).

Základním cílem metodického materiálu je komplexní pojetí ochrany obojživelníků v souvislosti s nově se šířícími invazními patogeny, tj. nastavení mechanismů účinné prevence a omezování dopadů nákaz včetně postupů pro záchranné chovy, karanténu, léčbu atd. Důraz je kladen na preventivní metody, protože včasná detekce nákaz obojživelníků zabrání jejich plošnému rozšíření, čímž se výrazně sníží dopady na volně žijící obojživelníky a současně náklady na opatření k eliminaci těchto dopadů.

Tento metodický materiál vznikl díky podpoře Technologické agentury České republiky (TAČR) v rámci projektu č. SS01010233 "Ochrana biodiverzity obojživelníků v souvislosti s invazemi nových infekčních nemocí". Cílem projektu bylo prostřednictvím svých výstupů (metodických materiálů i nově vyvinutých metod a postupů) naplňovat požadavky Evropské unie (EU) v souvislosti s problematikou infekčních onemocnění obojživelníků a zejména napomoci realizovat smysluplná a efektivní opatření k ochraně biodiverzity obojživelníků ve volné přírodě včetně postupů eliminujících riziko zavlečení patogenů do přírody z chovů. Na tento text navazuje další výstup projektu, kterým je "Metodika rychlé detekce infekčních onemocnění obojživelníků" (Baláž et al. 2023), kde jsou uvedeny optimalizované metody detekce patogenů včetně nových efektivnějších, tj. rychlejších i levnějších postupů.

Publikace je zacílena na subjekty, do jejichž kompetence ochrana obojživelníků a problematika infekčních nemocí spadá. Jde zejména o Ministerstvo životního prostředí (MŽP), které je zodpovědné za plnění závazků ČR vůči EU a společně s Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR (AOPK) koordinuje monitoring a ochranu obojživelníků. Dále jde o Státní veterinární správu (SVS), jakožto nejvyšší orgán veterinární správy s celorepublikovou působností spadající pod resort Ministerstva zemědělství (MZE). V kompetenci SVS je např. dozor při obchodu se zásklami mloků, resp. ocasatých obojživelníků, v rámci EU. Materiál je určen rovněž dalším pracovníkům veřejné správy v ochraně přírody, především těm, kteří se zabývají ochranou volně žijících živočichů, a také pracovníkům Celní správy ČR, kterým přísluší mj. kontrola zákazů i omezení v souvislosti s dovozem, vývozem či průvozem zboží (včetně obojživelníků) přes hranice EU. Materiál je dále určen všem, kteří se na profesionální či amatérské úrovni chovem obojživelníků či obchodem s nimi zabývají – provozovatelům zoologických zahrad, záchranných stanic, petshopů, soukromým chovatelům atp.

Text byl vytvořen na základě aktuálních poznatků ze zahraničí a v rámci výše zmíněného projektu vyvinutých a ověřených metod i postupů. V následující kapitole 2 jsou velmi stručně shrnuty příčiny a stav ohrožení obojživelníků. Kapitola 3 je věnována přehledu nejvýznamnějších

patogenů obojživelníků, zejména chytridiomycetám *Bd* a *Bsal* zodpovědným za chytridiomykózu. Zmíněny jsou rovněž ranaviry, herpesviry, parazitická houba *Saprolegnia ferax*, plísňové chromomykózy, okrajově pak i další patogeny obojživelníků s potenciálně negativním dopadem. Kapitola 4 řeší právní aspekty této problematiky, které veškerým opatřením dávají rámec a podmiňují jejich aplikaci. Text páté části obsahuje příklady preventivních (proaktivních) nástrojů a dále možných (kombinací) reaktivních opatření v případě výskytu infekčních nákaz obojživelníků. Těchto poznatků bylo využito pro návrh systému opatření v souvislosti s infekčními nemocemi obojživelníků u nás, který je obsahem kapitoly šesté.



2. Stav a příčiny ohrožení obojživelníků

2.1 Současný stav ohrožení obojživelníků

Dílčí zprávy o úbytku populací i celých druhů obojživelníků se objevují již počátkem druhé poloviny 20. století (shrnutí lze nalézt např. v pracích Carey et al. 1999, Collins & Storfer 2003). Na globální úbytek obojživelníků začalo být intenzivněji upozorňováno od přelomu 80. a 90. let minulého století (Blaustein & Wake 1990, Wake 1991). Vlajkovým druhem ohrožených obojživelníků se stala ropucha zlatá (*Incilius periglenes*), která, společně s několika dalšími druhy žab rodu *Atelopus*, vyhynula koncem 80. let minulého století v kostarických horských lesích v oblasti Monteverde Cloud Forest (Pounds & Crump 1994, Pounds et al. 1997). Jedním z faktorů, které způsobily náhlé a zprvu nevysvětlitelné vyhynutí řady obojživelníků v tomto zdánlivě člověkem neovlivněném prostředí, byla právě chytridiomykóza (Cheng et al. 2015, McCaffery et al. 2017).

Z celkového počtu 8652 druhů obojživelníků (stav k 8. 6. 2023, American Museum of Natural History, <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>) je 41 % druhů považováno za obecně ohrožené (IUCN 2022)¹. Obojživelníci jsou tak celosvětově nejohroženější třídou obratlovců. V Evropě je situace o něco příznivější – zhruba pětina (23 %) druhů patří mezi obecně ohrožené, nicméně dalších 18 % mezi téměř ohrožené (Temple & Cox 2009, Plesník & Chobot 2017). Všechny obecně ohrožené druhy jsou současně evropskými endemity, tj. nevyskytují se nikde jinde na světě (IUCN 2016).

V České republice (ČR) žije 21 druhů obojživelníků. V Červeném seznamu (ČS) obojživelníků a plazů ČR (Jeřábková et al. 2017) náleží 16 druhů (76 %) mezi obecně ohrožené¹ a pouze 5 druhů patří mezi téměř ohrožené (Tab. 1). Obojživelníci jsou tak u nás ohroženější než na globální či evropské úrovni. Důvodem je z části i fakt, že řada druhů má v ČR okraj areálu svého rozšíření, a vyskytují se tak pouze na části našeho území. Dle platné legislativy² je 19 našich druhů zařazeno mezi zvláště chráněné. Celkem 16 druhů je evropsky významných, tj. uvedených v přílohách II a IV směrnice č. 92/43/EEC o ochraně přírodních stanovišť a volně žijících živočichů (směrnice o stanovištích, Tab. 1). Většina čolků (vyjma č. obecného a č. horského) a také obě naše kuňky jsou uvedeny v příloze II směrnice o stanovištích, což znamená, že jsou pro ně vyhlášovány evropsky významné lokality (EVL). Pro naši nejohroženější žabu, ropuchu krátkonohou (*Epidalea calamita*), je připravován záchranný program (AOPK ČR, viz www.zachranneprogramy.cz).

V souvislosti s rizikem šíření infekčních nemocí je důležité si uvědomit, že některé naše běžnější druhy obojživelníků jsou vůči určitým patogenům poměrně odolné, např. rosníčka zelená (*Hyla arborea*) nebo skokan štíhlý (*Rana dalmatina*) vůči chytridiomycetám (Příloha 2). Mohou je tak dále šířit a ohrožovat citlivější a ohroženější druhy (Baláz et al. 2014a).

¹ Jde o údaj uváděný v celosvětových červených seznamech (ČS) vydávaných Mezinárodním svazem ochrany přírody (IUCN). Jako obecně ohrožené se v ČS označují druhy spadající do jedné ze třech následujících kategorií ohrožení: CR – critically endangered (kriticky ohrožené druhy), EN – endangered (druhy ohrožené) a VU – vulnerable (druhy zranitelné, Chobot & Plesník 2017).

² Konkrétně dle přílohy č. III vyhlášky č. 395/1992 Sb., v platném znění (dále jen vyhláška), kterou se provádí zákon č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, v platném znění.

Tab. 1: Míra ohrožení našich obojživelníků podle národního červeného seznamu (ČS) a české i evropské legislativy. České názvy – podle současně platného názvosloví (Moravec 2001); latinské názvy původní – dle vyhlášky č. 395/1992 Sb., v platném znění; latinské názvy současné – dle současných změn v systematice (zejména dle Frosta et al. 2006); ČS ČR – zařazení do kategorií ohrožení podle ČS obojživelníků a plazů ČR (Jeřábková et al. 2017), význam zkratk: CR – druh kriticky ohrožený, EN – ohrožený, VU – zranitelný, NT – téměř ohrožený druh; Ochrana ČR – stupně ohrožení dle přílohy č. III vyhlášky č. 395/1992 Sb., v platném znění, význam zkratk: O – druh ohrožený, SO – silně ohrožený, KO – kriticky ohrožený druh; Ochrana EU – zařazení druhů do příloh Směrnice o stanovištích (92/43/EHS). Upraveno dle Vojara (2007), Zavadila et al. (2011) a Jeřábkové et al. (2017).

Český název	Latinský název původní Latinský název současný	ČS ČR	Ochrana ČR	Ochrana EU
Mlok skvrnitý	<i>Salamandra salamandra</i>	VU	SO	-
Čolek velký	<i>Triturus cristatus</i>	EN	SO	II, IV
Čolek dravý	<i>Triturus carnifex</i>	EN	KO	II, IV
Čolek dunajský	<i>Triturus dobrogicus</i>	CR	-	II
Čolek horský	<i>Triturus alpestris</i> <i>Ichthyosaura alpestris</i>	VU	SO	-
Čolek obecný	<i>Triturus vulgaris</i> <i>Lissotriton vulgaris</i>	VU	SO	-
Čolek karpatský	<i>Triturus montandoni</i> <i>Lissotriton montandoni</i>	CR	KO	II, IV
Čolek hranatý	<i>Triturus helveticus</i> <i>Lissotriton helveticus</i>	CR	KO	-
Kuňka obecná	<i>Bombina bombina</i>	EN	SO	II, IV
Kuňka žlutobřichá	<i>Bombina variegata</i>	CR	SO	II, IV
Blatnice skvrnitá	<i>Pelobates fuscus</i>	NT	SO	IV
Ropucha obecná	<i>Bufo bufo</i>	VU	O	-
Ropucha zelená	<i>Bufo viridis</i> <i>Bufotes viridis</i>	EN	SO	IV
Ropucha krátkonohá	<i>Bufo calamita</i> <i>Epidalea calamita</i>	CR	KO	IV
Rosnička zelená	<i>Hyla arborea</i>	NT	SO	IV
Skokan hnědý	<i>Rana temporaria</i>	VU	-	V
Skokan ostronosý	<i>Rana arvalis</i>	EN	KO	IV
Skokan štíhlý	<i>Rana dalmatina</i>	NT	SO	IV
Skokan skřehotavý	<i>Rana ridibunda</i> <i>Pelophylax ridibundus</i>	NT	KO	V
Skokan krátkonohý	<i>Rana lessonae</i> <i>Pelophylax lessonae</i>	VU	SO	IV
Skokan zelený	<i>Rana kl. esculenta</i> <i>Pelophylax esculentus</i>	NT	SO	V

2.2 Příčiny ohrožení obojživelníků

Současný stav ohrožení obojživelníků má své příčiny, které jsou často vzájemně provázané a působí synergicky. Za nejzávažnější jsou označovány přímé vlivy, zejména destrukce biotopů a změny ve využívání krajiny (Alford & Richards 1999, Collins & Storfer 2003, Cushman 2006). Nicméně řada faktorů působí často nepřímo a ve vzájemných vazbách, jako např. kontaminace prostředí, UV záření či právě infekční nemoci (např. Kiesecker et al. 2001, Blaustein & Dobson 2006, Pounds et al. 2006)³. Patogeny a nákazy jsou v současnosti velmi snadno šířeny v rámci globálního obchodu s obojživelníky (blíže Kap. 4.2).

Dále je uveden stručný přehled nejvýznamnějších ohrožujících příčin obojživelníků ve světě a v ČR. Bližší informace k této problematice u nás lze nalézt např. v pracích Kerouše (1998, 1999), Mikátové & Vlašina (2002), Vojara (2007), Civiše et al. (2010), Zavadila et al. (2011), Jeřábkové et al. (2013), Fischera et al. (2015). Problematice patogenů a infekčních onemocnění obojživelníků je věnována samostatná kapitola (Kap. 3).

Likvidace biotopů, změny ve struktuře a využívání krajiny

Jde především o změny vodního režimu – rozsáhlé meliorace zemědělských i lesních pozemků, regulace toků a ovlivňování přirozeného vodního režimu, likvidace drobných tůní, slepých ramen apod. Změny v krajině se týkají i terestrického prostředí. V důsledku absence tradičního zemědělského i lesnického hospodaření (extenzivní pastvy včetně pastvy v lese, kosení, výmladkového hospodaření), zvýšení podílu orné půdy, scelování pozemků, ničení mezí či drobných remízů se naše krajina stala jednodušší, s hrubším krajinným zrnem (Konvička et al. 2005). Nejenže nenabízí vhodná prostředí k reprodukci obojživelníků (menší nezarybněné vodní plochy), úkryty a zimoviště, ale často se pro ně stává neprostupnou. K mnohým negativním změnám u nás začalo docházet až po II. světové válce, přičemž řada vlivů stále přetrvává. Jde o nevhodnou údržbu vodních koryt, protipovodňová opatření a odstraňování tzv. protipovodňových škod, kdy dochází k prohlubování a zpevňování koryt toků, a tím mj. ke snižování hladiny podzemní vody v jejich nivách (Zavadil et al. 2011).

Fragmentace prostředí a vliv dopravy

Fragmentace je proces, při kterém dochází ke zmenšování nebo roztříštění určitého typu biotopu na jeho menší fragmenty a k jejich vzájemné izolaci (Wilcove et al. 1986). Fragmentací vzniklé izolované populace organismů jsou ve zvýšené míře ohroženy zánikem, zejména v důsledku ztrát genetické variability (GV), náhodných demografických výkyvů, změn vnějšího prostředí a kombinací těchto faktorů (Groom et al. 2006, Primack 2006). Ztráty GV mohou být u malých

³ Ukázkovým příkladem provázaného působení několika ohrožujících příčin je zvýšená mortalita vajec ropuchy západoamerické (*Anaxyrus boreas*) z oblasti Kaskádového pohoří na západě Severní Ameriky, za kterou stojí zřejmě globální klimatické změny. V důsledku výrazného zvyšování teploty vody v centrálním a východním tropickém Pacifiku se totiž mění směry proudění větrů i globální rozložení srážek, což se v Kaskádovém pohoří projevuje extrémními suchy (Kiesecker et al. 2001). V mělkých vodách jsou pak vajíčka ropuch oslabována vyššími hodnotami UV-B záření, čímž se zvyšuje jejich náchylnost vůči infekcím a patogenním houbám (zde konkrétně parazitické houbě *Saprolegnia ferax*). Zatímco ve vodách hlubších než 50 cm přeživalo 88 % vajec, v mělčinách s hloubkou 20 cm pouze kolem 20 % (Pounds 2001). Řešení takového problému, který se sice projevuje na lokální úrovni, ale jeho příčiny jsou globální a provázané, je velmi komplikované až nemožné.

populací obojživelníků vyrovnávány pouze výměnou genů mezi nimi, a to migrujícími jedinci (Flegr 2009). Řešením je zachování prostupnosti krajiny, zejména při plánování liniových staveb – dálnic, rychlostních komunikací, silnic I. třídy a železničních koridorů, které mají nejzávažnější fragmentační účinky (Anděl et al. 2005, 2011). Dopravní stavby ohrožují obojživelníky, ale i další živočichy, rovněž provozem – střety s projíždějícími vozidly. Mortalita živočichů způsobená kolizemi s vozidly je jedním z nejtransparentnějších negativních vlivů dopravy (Anděl et al. 2005, Hlaváč et al. 2020). Ohrožena je naprostá většina živočišných druhů včetně obojživelníků (Trombulak & Frissell 2000). Kromě liniových staveb mohou být pro obojživelníky nepřekonatelné rozsáhlé intenzivně obhospodařované zemědělské plochy, sídla a zastavěná území obecně, některé vodní toky, husté lesní monokultury apod. (Zavadil et al. 2011).

Nevhodné hospodaření na rybnících a vodních tocích

Mezi nejzávažnější příčiny související s rybářským hospodařením patří neúměrný predanční tlak ryb v rybnících i v některých vodních tocích, zarybnování ostatních vodních ploch (pískoven, lomů, nebeských jezírek, požárních nádrží v obcích, drobných tůň i horních partií vodních toků), likvidace litorálních porostů rybami, kachnami nebo rybáři, nevhodné termíny vypouštění rybníků, necitlivé odbahňování nádrží, eutrofizace a znečišťování vody v důsledku krmení a přehnojování (Zavadil et al. 2011). Problém je i v neúmyslném šíření nepůvodních invazivních druhů ryb, které mají potenciál se masově přemnožit a znásobovat negativní dopady rybí obsádky na obojživelníky a vodní společenstva obecně včetně šíření infekcí.

Kontaminace prostředí

Citlivost obojživelníků na kvalitu životního prostředí je známá (např. Gibson & Freeman 1997, Beja & Alcazar 2003). Polopropustná pokožka i vaječné obaly obojživelníků nejsou pro kontaminanty dostatečnou bariérou (Sparling et al. 2010). Citlivost vůči jednotlivým polutantům se liší mezi druhy, v rámci druhu jsou ohroženější vývojová stádia. Nebezpečné jsou účinky zejména těžkých kovů (TK), které se akumulují v prostředí i živých organismech a způsobují snížení schopnosti líhnoutí larev, jejich deformace, redukce růstu a poruchy vývoje žaber (Svobodová 1987, Sparling et al. 2010). Kontaminace působí často v součinnosti s dalšími faktory. Obojživelníci jsou například náchylnější k nemocem či parazitům, jestliže žijí v kontaminovaném prostředí (Gendron et al. 2003). Subletální koncentrace škodlivin způsobují vývojové poruchy a změny v chování, snižují reprodukční úspěch či zvyšují riziko predace (Bridges 1999).

Další příčiny

Z dalších příčin působících zejména u nás jmenujme např. zvýšenou predaci nepůvodními šelmami, zejména norkem americkým (*Neogale vison*); chovy polodivokých kachen (*Anas platyrhynchos*), které na rybnících likvidují vajíčka i larvy obojživelníků; či nadměrné počty divokých prasat (*Sus scrofa*), která predují dospělé obojživelníky i jejich snůšky (Zavadil et al. 2011). Dalším problémem je důsledné, synchronní a na velkých plochách prováděné kosení luk (fyzická likvidace obojživelníků technikou, redukce jejich potravy – bezobratlých, vznik tzv. travních pouští bez možností úkrytů), často v rámci agroenvironmentálních opatření (Mikátová & Vlašín 2002, Zavadil et al. 2011).

3. Přehled patogenů a nákaz obojživelníků

Naprostá většina parazitických organismů má se svými hostiteli evolučně vybalancovaný vztah a jejich negativní dopad na hostitele v podobě akutního onemocnění se projevuje převážně u oslabených jedinců. Pokud však dojde k zavlečení nepůvodního patogenu do populace naivního druhu, může to vést k dramatickým dopadům na postižené jedince, populace i celé druhy.

Intenzita šíření nových nákaz se zvyšuje. Lidská činnost proniká do v minulosti nedostupných oblastí a zároveň je svět mnohem propojenější – původní biogeografické bariéry už nebrání kontaktu mezi geograficky vzdálenými druhy. Lepší technologie umožňuje transporty živých zvířat na obrovské vzdálenosti v krátkém čase. Ekonomická síla Evropy, Ameriky a části asijských zemí vytvořila podmínky pro vznik výnosného obchodu s exotickými mazlíčky a “okrasnými zvířaty”. Přestože obojživelníci nejsou v rámci tohoto obchodu zásadním prvkem, je obchodována velká část jejich známé druhové diverzity. U snadno množitelných druhů se jedná o obchod v řádech milionů jedinců transportovaných mezi kontinenty. Nezanedbatelnou roli v šíření nemocí obojživelníků má jejich komerční potravinářský chov – pro produkci žabích stehýnek byly do nových oblastí rozšířeny produkční druhy obojživelníků. Masové odchovy jsou pak významným lokálním zdrojem patogenů pro místní společenstva.

Po úspěšném zavlečení (ať už proběhlo jakkoliv) se nový patogen dokáže dále šířit do volné přírody pomocí místních druhů i bez přispění člověka. Různé druhy patogenů postihují jednotlivé druhy s odlišnými dopady, a tak málo postižené druhy mohou nemoc šířit do populací druhů citlivých. Působením některých patogenů může u citlivých hostitelských druhů docházet k lokálním až celkovým extinkcím.

K propuknutí nových nákaz může také vést změna podmínek prostředí, kdy stresory snižují obranyschopnost jedinců, patogen překoná kritickou míru a propukne lokální vzplanutí onemocnění. Spouštěči takových situací mohou být všechny dříve zmíněné příčiny úbytku obojživelníků a žádný typicky nepůsobí samostatně, nýbrž jejich účinky se vzájemně zesilují.

V rámci následujícího textu je věnována pozornost jednotlivým patogenům obojživelníků, které jsou zodpovědné za infekční onemocnění. V textu nejsou zahrnuta neinfekční onemocnění, typicky například nutriční choroby, jež jsou běžné u obojživelníků chovaných v zajetí, nebo další neinfekční nemoci, vyvolané např. intoxikací (Relyea 2011). Přehled patogenů je řazen podle jejich potenciálního dopadu, od nejzávažnějších po méně významné.

Za nejzávažnější chorobu obojživelníků v současnosti je považována **chytridiomykóza** – koncem 90. let minulého století objevené onemocnění vyvolané chytridiomycetními houbami *Batrachochytrium dendrobatidis* (Berger et al. 1998, Longcore et al. 1999) a *B. salamandrivorans* (Martel et al. 2013). Na dalším místě jsou **ranaviry**, čeled' *Iridoviridae* dle International Committee on Taxonomy of Viruses, které napadají ryby, plazy i obojživelníky a mohou ohrozit celé jejich populace. Mezi další široce rozšířené a potenciálně problematické choroby obojživelníků v ČR patří **herpesvirózy**, dále mykózy způsobené oomycetami (**saprolegnióza**), protozoální infekce (Mesomycetozoea, Perkinsea; Gleason et al. 2014), bakteriální nemoci (Red leg syndrome) a parazitace členovci (např. myiázy). Okrajově jsou zmíněny i další patogeny s potenciálně negativním dopadem na obojživelníky.

3.1 Chytridiomycety

Chytridiomycety jsou zodpovědné za chytridiomykózu, vážné onemocnění obojživelníků, způsobující poškození a ztráty funkčnosti jejich pokožky (Berger et al. 1998, 1999). Původcem této choroby jsou chytridiomycetní houby – *Batrachochytrium dendrobatidis* (dále jen *Bd*, Longcore et al. 1999), a později objevený druh *B. salamandrivorans* (*Bsal*), napadající pouze ocasaté obojživelníky (Martel et al. 2013, 2014). Poškozená zrohovatělá kůže nakaženého jedince hůře zajišťuje kožní dýchání i vstřebávání vody. V důsledku rozvratu osmoregulačních funkcí tak dochází k poruchám vedení vzruchů a následně k srdeční zástavě nakaženého jedince (Voyles et al. 2009). V dalším textu se věnujeme základní charakteristice i původu obou patogenů, jejich současnému rozšíření a dále dopadům onemocnění na druhy, populace i jedince obojživelníků včetně popisu typických příznaků nemoci. Zmíněny jsou rovněž diagnostické metody a rámcově problematika prevence i samotné léčby.

Základní charakteristika a přenos patogenů

Oba druhy náleží do kmenu Chytridiomycota, řádu Rhizophydiales. Obecně jsou chytridiomycetní houby běžně rozšířené – lze je nalézt především ve sladkých vodách a vlhké půdě, kde rozkládají celulózu, chitin a keratin (Fisher et al. 2009). Oba druhy těchto chytridiomycet se vyskytují ve dvou základních formách – jako kulovité přisedavé zoosporangium či pohyblivá zoospora (Longcore et al. 1999). Ta při kontaktu se substrátem / pokožkou obojživelníka encystuje (tj. vstřebá svůj bičík a vytvoří buněčnou stěnu a rhizoidy, jimiž se přichytí k povrchu substrátu) a během 4–5 dnů⁴ se stane zoosporangiem schopným opět produkovat zoospory (Johnson & Speare 2003, Berger et al. 2005, Obr. 1). Ty mohou žít ve vodě několik týdnů, mají však omezenou pohyblivost (v rádech cm), a proto většina zoospor encystuje a napadá buňky v bezprostředním okolí svého vývoje.

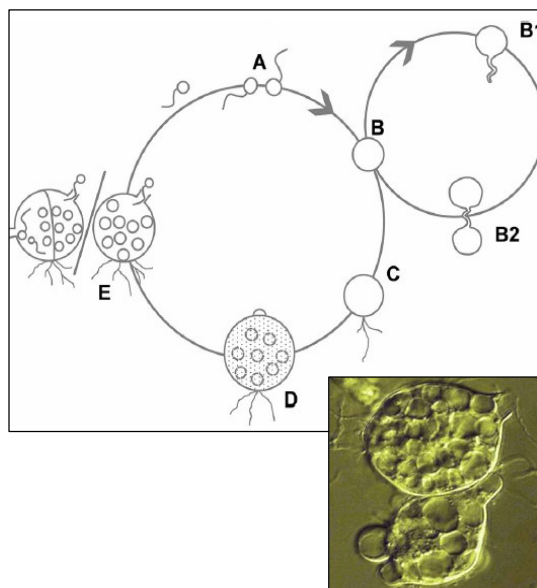
Chytridiomycety se tak přirozeně šíří hlavně pomocí blízkého nebo přímého kontaktu s nakaženým jedincem (Piotrowski et al. 2004). Bylo však zjištěno, že zoospory mohou perzistovat na končetinách (ale i křídlech) vodních ptáků či v trávicím traktu raků, kteří tak mohou být dalšími přirozenými vektory nemoci (Garmyn et al. 2012, Stegen et al. 2017). V našich podmínkách však nebyl výskyt *Bd* na původních nebo invazních racích potvrzen a ani předběžné infekční experimenty tuto možnost nepotvrzují (Baláž, pers. obs.). Šíření patogenu, často na značné vzdálenosti, významně podporuje i člověk. Děje se tak především v rámci mezinárodního obchodu s obojživelníky určenými na chov, ke konzumaci či pro vědecké účely (např. Weldon et al. 2004, Schloegel et al. 2009). Nákaza se může šířit i nedodržováním hygienických pravidel, např. během výzkumu, či dokonce v důsledku aktivit konaných na ochranu obojživelníků, jako jsou např. záchranné transfery obojživelníků putujících přes komunikace (Civiš et al. 2010)⁵. *Bsal* má potenciál se šířit v prostředí také encystovanými zoosporami, kterým ulpívají na povrchích, včetně např. nohou vodního ptactva. Můžou se tak šířit na větší vzdálenosti (Stegen et al. 2017).

⁴ Údaje získané při kultivaci *Bd* při teplotách kolem 22 °C (Berger et al. 2005). Teplotní optimum *Bsal* je nižší, kolem 15 °C (Van Rooij et al. 2015), a délka vývoje v kultuře je pět dní (Martel et al. 2013).

⁵ V odchytových nádobách, kde bývá na malém prostoru akumulováno mnoho jedinců, je totiž přenos zoospor velmi snadný. V případě nálezů jedinců s prokazatelnými symptomy, či dokázanou přítomností patogenů, je nutné transfery okamžitě ukončit (Vojar 2007).

Obr. 1: Životní cyklus patogenů *B. dendrobatidis* (*Bd*) a *B. salamandrivorans* (*Bsal*) v kultuře

Pohyblivá zoospóra (A) po kontaktu se substrátem encystuje (B) přichycena k jeho povrchu rhizoidy (C). V průběhu několika dní se mitotickým dělením ve vytvořené stélce/sporangiu vyvíjejí nové zoospory, společně s výpustními trubicemi. Tyto trubice jsou v případě nezralého sporangia ještě uzavřeny zátkou (D) a otevírají se až při dokončení jeho vývoje (E). Stélky jsou převážně monocentrické (s jedním sporangiem, obr. E vpravo), vzácněji vytváří kolonie sporangií, vzájemně oddělených tenkými přepážkami a vlastní výpustní trubicí (obr. E vlevo). Na rozdíl od *Bd*, je *Bsal* schopna již na úrovni encystované zoospory (B) vytvářet ze zárodečných trubic (B1) nová zoosporangia (B2), a tím i větší koloniální stélky (Martel et al. 2013). Převzato z práce Van Rooij et al. (2015), resp. Berger et al. (2005). Na fotografii je zralé zoosporangium obsahující zoospory. (Převzato z <https://www.flickr.com/photos/>).

**Původ patogenů**

Podle aktuálních poznatků je původ ***Bd*** ve východní Asii, s nejvyšší zaznamenanou genetickou variabilitou na Korejském poloostrově (O'Hanlon et al. 2018). *Bd* se po světě šíří pravděpodobně více než 100 let a na mnoha místech vznikly lokální linie, dokonce i hybridního původu, přestože pohlavní rozmnožování u *Bd* dosud nebylo pozorováno (Greenspan et al. 2018). Ve Švýcarsku byla zaznamenána potenciálně původní evropská linie *Bd*, ta byla ale na známých lokalitách kompletně vytlačena expandující globální pandemickou linií (Farrer et al. 2011). Z východní Asie pochází i její sesterský druh ***Bsal***, který je ve volné přírodě jihovýchodní části kontinentu dokonce běžnější než *Bd* (Laking et al. 2017).

Rozšíření patogenů a dopady nemoci na obojživelníky

S ohledem na počet dotčených druhů, a často velmi vážný průběh nákazy, je chytridiomykóza považována za doposud nejhorší infekční onemocnění obratlovců (Gascon et al. 2007). Již v roce 2001 byla tato nemoc umístěna na seznam nemocí divoce žijících zvířat (Wildlife Disease List) Světové organizace pro zdraví zvířat (OIE, resp. nově WOA – World Organisation for Animal Health) jako vůbec první nemoc obojživelníků (Johnson & Speare 2003).

Patogen ***Bd*** byl doposud zjištěn u řádově vyšších stovek druhů obojživelníků na území všech kontinentů, vyjma Antarktidy. Ohroženo jím je přes 500 druhů obojživelníků (Scheele et al. 2019). Mezi nakaženými jsou zástupci všech tří řádů obojživelníků (Olson et al. 2013). Patogen se vyskytuje v různých podmínkách prostředí, od nížin po vysokohorské polohy přes 5000 m n. m. v peruánských Andách (Seimon et al. 2007). Dopady nemoci se výrazně liší nejen mezi druhy (Fisher et al. 2009, Kilpatrick et al. 2010), ale rovněž v různých částech světa. Zatímco Austrálie, Střední a Severní Amerika či jižní Evropa představují oblasti, kde byly zjištěny vážné průběhy nálezů včetně velmi rychlých vyhynutí celých druhů; v Subsaharské Africe, dále v Asii, Brazílii a v severní Evropě patogen vážné problémy (zatím) nepůsobí (shrnutí v publikacích Van Rooij et al. 2015, Berger et al. 2016). Naše poznatky doplňují, že jednou z takových rezistentních oblastí může být i střední Evropa včetně ČR (Baláž et al. 2014a,b).

V Evropě byla chytridiomyceta *Bd* zjištěna nejméně u třetiny volně žijících druhů na území téměř 20 států (Baláž et al. 2014a) včetně ČR. Nejohroženější oblastí je jižní část kontinentu, kde nemoc způsobila masové úhyny ropušek starostlivých (*Alytes obstetricans*) (Bosch et al. 2001), ale i dalších druhů, např. mloků skvrnitých ve Španělsku (Bosch & Martinez-Solano 2006). Podobně jako v globálním měřítku, ani citlivost evropských druhů není konstantní – mezi nejzranitelnější taxony patří čeledi Alytidae a Bombinatoridae, naopak nízké intenzity nákazy byly zjištěny u skokanů rodu *Rana* (Baláž et al. 2014a,b).

Na našem území je výskyt *Bd* ve volné přírodě monitorován od roku 2008 (Civiš et al. 2010, 2012), od roku 2013 také v chovech obojživelníků (Havlíková et al. 2015). Přestože byl doposud zjištěn u nejméně devíti druhů volně žijících obojživelníků, a to na většině testovaných lokalit (Baláž et al. 2014a, Vojar et al. 2021), úmrtí jedinců ve volné přírodě spojená s tímto patogenem jsou u nás nejspíš ojedinělá, příp. unikají pozornosti (Baláž et al. 2013). Nejčastěji nakaženými druhy u nás bývají kuňky (*Bombina* spp.) a skokani rodu *Pelophylax* (Baláž et al. 2014a).

Oproti předchozímu druhu, patogen *Bsal* napadá téměř výhradně ocasaté obojživelníky (Martel et al. 2013, 2014). Doposud byl zjištěn pouze v Evropě a v Asii⁶, odkud byl do Evropy rozšířen s importy obojživelníků (Martel et al. 2014). Na rozdíl od asijských druhů, jenž jsou vůči nákaze většinou odolné⁷ (Martel et al. 2014), v Evropě patogen způsobil masové úhyny mloků skvrnitých (*Salamandra salamandra*) v Nizozemí a v Belgii, kde je ve volné přírodě prakticky vyhubil (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013, 2016). Spitzen-van der Sluijs et al. (2016) dále detekovali přítomnost *Bsal* u volně žijících mloků také v Německu a rovněž u dalších druhů – čolka obecného (*Lissotriton vulgaris*) a č. horského (*Ichthyosaura alpestris*). V chovech byla tato chytridiomyceta zjištěna ve Velké Británii (Cunningham et al. 2015) a v Německu (Sabino-Pinto et al. 2015). Naopak dosavadní průzkumy z volné přírody v Rakousku (Gimeno et al. 2015) a ČR (Baláž et al. 2018) přítomnost patogenu nepotvrdily. Recentní výzkumy poukazují na šíření patogenu napříč Evropou, často na značné vzdálenosti. Nalezen byl např. ve Španělsku, tedy více než 1000 km vzdušnou čarou od doposud známých lokalit, a to jak ve volné přírodě (Lastra González et al. 2019, 2021; Martel et al. 2020), tak v chovech obojživelníků (Lastra González et al. 2020). Alarmující jsou nedávné nálezy patogenu ze sousedního Německa (Lötters et al. 2020, viz dále). S ohledem na značné potenciální nebezpečí plynoucí ze zavlečení tohoto patogenu do ČR je dále podrobně popsáno nejen jeho objevení v Nizozemsku, ale i současný výskyt v okolních zemích.

⁶ Analýzy provedené v Číně (Zhu et al. 2014) a Spojených státech amerických (Bales et al. 2015) výskyt *Bsal* nepotvrdily; nicméně především v USA – centru druhové diverzity ocasatých obojživelníků a současně oblasti s obrovským objemem dovážených jedinců – je riziko nákazy obrovské (Yap et al. 2015, Richgels et al. 2016).

⁷ Ani mezi asijskými druhy ocasatých nebyla zjištěna jednotná odolnost vůči *Bsal*. Dle Martel et al. (2014) bylo zjištěno, že několik druhů – pamlok sibiřský (*Salamandrella keyserlingii*), čolek ohňobřichý (*Cynops pyrrhogaster*), č. modroocasý (*C. cyanurus*) a pačolek vietnamský (*Paramesotriton deloustali*) – je vůči nákaze citlivých, nicméně mohou v případě subletálních intenzit nákazy přežívat až pět měsíců. Stávají se tak významnými potenciálními přenašeči patogenu. To platí zejména pro čolky rodu *Cynops*, kteří se z Asie vyvážejí ve statisících kusů ročně (Herrel & van der Meijden 2014). Z našich testovaných čolků byl vůči nákaze považován za rezistentního č. hranatý. Další výzkumy však prokázaly, že i tento druh může být patogenem *Bsal* infikován (Lastra González et al. 2019, 2021).

Nizozemsko a Belgie

Nizozemsko je první evropskou zemí, do které byl patogen *Bsal* z jihovýchodní Asie importován, resp. zde byl jako první evropské zemi objeven. V Nizozemsku se nachází západní hranice rozšíření mloka skvrnitého, který se zde vyskytoval pouze v nejjižnější části státu. Známé byly tři populace – dvě původní a jedna nepůvodní, jež byly od roku 1997 každoročně sledovány (Goverse et al. 2006). V roce 2008 monitoring odhalil časté nálezy mrtvých dospělců na cestách, ovšem bez vnějších známek zranění. Od roku 2010 docházelo k prudkým poklesům v počtech živých pozorovaných jedinců, a to až o 96 % oproti původní početnosti (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013).

Příčiny tohoto náhlého masivního úhynu mloků nebyly z počátku zřejmé (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013). Martel et al. (2013) následně z postižené populace v Bunderbosu izolovali a popsali nový patogen *Bsal*. Na nakažených tělech mloků byly patrné kožní léze; mloci navíc vykazovali projevy anorexie, apatie a ataxie. Pro demonstraci patogenity *Bsal* vědci experimentálně infikovali pět jedinců v té době zdravých mloků. Zhruba po dvou týdnech všichni nakažení jedinci patogenu podlehli. Metodou PCR se potvrdila přítomnost *Bsal*. Objevené kožní ulcerace u záměrně infikovaných jedinců se navíc shodovaly s nalezenými u jedinců z volně žijící populace.

Sousedící Belgie je druhou evropskou zemí, kde došlo k vypuknutí a šíření *Bsal*. Na konci prosince 2013 se objevilo první ohnisko v belgickém Eupenu, což je přibližně 30 kilometrů jižně od prvního místa nálezu v Nizozemsku. O rok později v dubnu se objevilo další místo nákazy v Robertville, které se nachází o 30 km jižněji (Martel et al. 2014).

Německo

První mortalita mloků v Německu byla avizována soukromým chovatelem v chovech v Hessensku ve středním Německu, typickými projevy byly výše identifikované léze. Soukromý chov obsahoval cca 200 jedinců čtyř druhů mloků z různých koutů světa – mlok alžírský (*Salamandra algira*) – severní Afrika, mlok korsický (*S. corsica*) – ostrov Korsika, mlok levantský (*S. infraimmaculata*) – Blízký východ a mlok skvrnitý (*S. salamandra*) – Evropa. K úmrtnosti došlo u všech chovaných druhů, přestože se u všech jedinců neobjevily typické příznaky chytridiomykózy. Původ *Bsal* ve vyšetřovaném chovu nebyl znám (Sabino-Pinto et al. 2015). Spitzen-van der Sluijs et al. (2016) shromáždili mezi lety 2010–2016 vzorky volně žijících mloků a čolků v oblasti Eifel v západním Německu. Výběr místa pro odběr vzorků byl zvolen na základě hlášení úmrtí obojživelníků v této oblasti, nikoliv vzdálené od infikovaných populací v Holandsku a Belgii. Z celkových 55 zkoumaných lokalit se patogen *Bsal* potvrdil na 14 lokalitách. Mezi nakaženými druhy byli mlok skvrnitý, čolek horský a čolek obecný. Výsledky ukázaly, že celková plocha rozšíření *Bsal* mohla v danou dobu být až 10 000 km². Bohužel další průzkumy areál rozšíření tohoto druhu v Německu značně zvětšily (Lötters et al. 2020). V současnosti nejbližší výskyt od hranic ČR je znám z Bavorska (Steigerwald), zhruba 200 km západně od našich hranic (Thein et al. 2020).

Velká Británie

Velká Británie zaznamenala patogen *Bsal* během rutinního testování mloků chovaných v zajetí. Jedinci, u kterých se infekce projevila, pocházeli z dovozu z Asie. Všechna zvířata byla vzata do karantény, kde podlehl infekci nebo byla usmrcena (Cunningham et al. 2015). Rozsáhlá studie

založená na 2409 odebraných vzorků z populací obojživelníků ve volné přírodě patogen *Bsal* ve Velké Británii ovšem neprokázala (Cunningham et al. 2019).

Španělsko

Ve Španělsku byl patogen *Bsal* objeven nejprve v chovech ocasatých obojživelníků, kde bylo shledáno pozitivními sedm z jedenácti testovaných chovů (Fitzpatrick et al. 2018). Další studie přítomnost tohoto patogenu ve španělských chovech neprokázala (Lastra González et al. 2020). Vzorkována však byla necelá desítka chovů. Otázkou navíc je, zdali chovatelé poskytli k vyšetření veškeré jedince, zejména ty podezřelé na nákazu. Nálepka infikovaného chovu je totiž mezi chovateli nežádoucí a má negativní vliv na úspěšnost výměny i obchodu s chovanými jedinci.

Co se týče výskytu *Bsal* ve volné přírodě, rozsáhlá evropská studie zaměřená především na země s dosud neprokázanou přítomností nákazy u volně žijících populací objevila *Bsal* u pěti jedinců čolka hranatého (*Lissotriton helveticus*) v severní části Španělska, v provinciích Kantábrie a Asturie. Infikovaní jedinci byli, až na jednu výjimku zahradního jezírka v menší obci, nacházeni mimo civilizaci, většinou v horách, kde se rozmnožují v betonových korytech naplněných vodou, určených pro napájení pasoucího se skotu. Způsob zavlečení nákazy je tudíž nejasný. Všechny pozitivní nálezy byly více než 1 000 km vzdálené od jakékoliv oblasti s doposud potvrzeným výskytem *Bsal* (Lastra González et al. 2019). Další monitoring přítomnost patogenu na většině těchto lokalit potvrdil a bohužel objevil i nová místa jeho výskytu (Lastra González et al. 2021). Exemplární příklad nebezpečí přenosu patogenu z chovů do volné přírody a následné rozsáhlé pokusy o jeho eradikaci je dokumentován rovněž ze Španělska (Martel et al. 2020, blíže Kap. 5).

USA

Severní Amerika je globální „hotspot“ ocasatých obojživelníků, zahrnuje bezmála 50 % všech žijících druhů na světě. Zejména Mexiko a Appalačské pohoří jsou domovem pro více než 100 druhů (čeleď Plethodontidae), které pojí vysoká citlivost na *Bsal*, a tím pádem i vysoká míra ohrožení. Obě tyto oblasti, spolu s pacifickým severozápadem, jsou známé pro své regionálně endemické a reliktní druhy mloků. Při zavlečení *Bsal* do Severní Ameriky by se mohly projevit závažné ekologické, tak i ekonomické dopady včetně možného vyhynutí druhů (Gray et al. 2015). Obchod s obojživelníky byl navíc v USA donedávna velmi intenzivní a nedostatečně regulovaný (Yap et al. 2015). Na rozdíl od četných záchytů patogenu *Bsal* v Evropě však tento nebyl doposud v USA prokázán (Klocke et al. 2017).

Česká republika

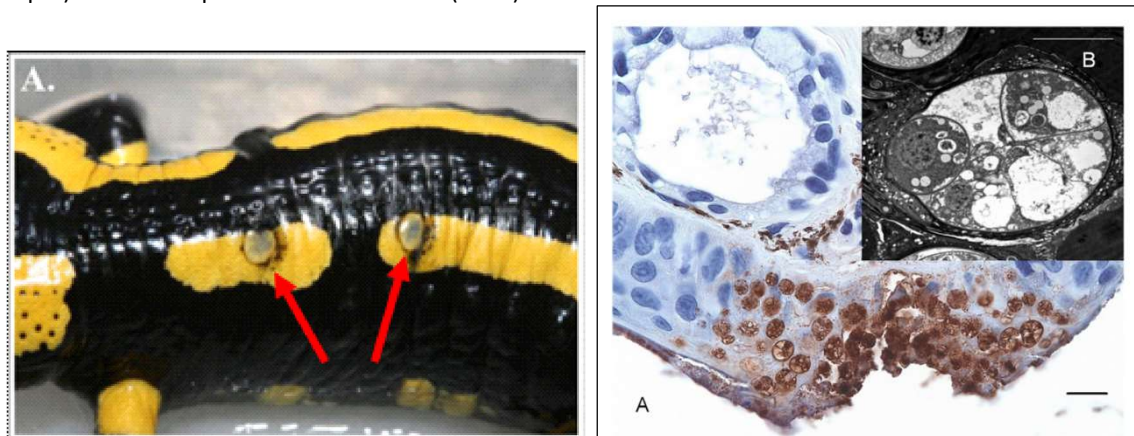
Pět výše uvedených evropských zemí s potvrzeným výskytem *Bsal* jsou současně kandidáty pro aktivní sledování přítomnosti a dynamiky *Bsal* (More et al. 2018). To se týká zejména států s intenzivním obchodem s obojživelníky a rozsáhlou komunitou chovatelů exotických zvířat, jako jsou Německo a Španělsko. K chovatelským velmocem obojživelníků však náleží i naše republika (UNEP-WCMC 2016, Baláž et al. 2018), jež navíc sdílí západní hranice s Německem. V rámci ČR je nejrizikovější především hlavní město s rozsáhlou komunitou chovatelů (Havlíková et al. 2015). V Praze i v jejím nejbližším okolí se nachází desítky volně žijících populací čtyř druhů ocasatých obojživelníků – mloka skvrnitého, čolka obecného, č. horského a č. velkého (vlastní data). Pro všechny tyto druhy je *Bsal* letální (Martel et al. 2013, 2014, Cunningham et al. 2015, Spitzen-van der Sluijs et al. 2016). Proto byla Praha vybrána jako potenciální oblast prvního

monitoringu *Bsal* u nás. Na základě testování 324 vzorků z volně žijících obojživelníků (především mloků) i ocasatých chovaných v zajetí nebyla přítomnost patogenu *Bsal* prokázána. Neznamená to však, že patogen u nás absentuje. Pouze nemusel být na základě průzkumu zjištěn (Baláž et al. 2018).

Klinické příznaky, patologie a diagnostika

Bd. Obojživelníci napadení tímto patogenem mohou uhynout, být nemocní nebo na první pohled zcela v pořádku (Civiš 2010). Mezi základní symptomy náleží rohovatění pokožky a změny chování nakaženého jedince (Berger et al. 1998). Typická je strnulost v nepřírozené poloze, sezení se zadními nohama nepřírozeně daleko od těla, dále letargie, neochota k úniku a ztráta přirozených reflexů či omezené pohybové schopnosti doprovázené menší úspěšností při lovu potravy (Hanlon et al. 2015). Infikovaní, ale bez problémů přežívající pulci, vykazují nízkou pohybovou aktivitu. Tím snižují svou nápadnost pro predátory a prodlužují svůj vývin. Snížená predace tak patogen zvýhodňuje (Parris et al. 2006), neboť pulci jsou vůči nákaze imunní⁸. Klinické příznaky u dospělých jsou mnohem výraznější a nemoc může mít i fatální dopady. Obojživelníci s vysokými intenzitami infekce jsou typičtí ohniskovým rohovatěním pokožky (hyperkeratóza). Bylo pozorováno její abnormální odlupování, epidermální hnisání, výrony v kůži, svalech nebo očích a hyperémie (překrvení) břišní části kůže a chodidel včetně prstů (Daszak et al. 1999).

Obr. 2: Léze (červené šipky) na pokožce mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) napadeného chytridiomycetní houbou *Batrachochytrium salamandrivorans* (snímek vlevo, © Mark Blooi). Vpravo je mikroskopický snímek (A) pokožky uhynulého mloka skvrnitého s patrnými koloniálními stélkami (hnědé barvy), které zasahují i do hlubších vrstev pokožky, vytvářející zde hluboké léze (délka úsečky 20 μ m). Na menším snímku z elektronového mikroskopu (B) je vidět koloniální stélka patogenu (délka úsečky 4 μ m). Převzato z publikace Martel et al. (2013).



⁸ Chytridiomyceta se u pulců vyskytuje pouze v oblasti slabě zrohovatělého ústního disku, kde způsobuje jeho depigmentaci a mírnější hyperkeratózu (Berger et al. 1998, Rachowicz & Vredenburg 2004). Tato místa jsou tak refugii patogenu a zdrojem pro následnou intenzivnější nákazu metamorfovaných jedinců, u nichž je už rohovitá vrstva pokožky (*stratum corneum*) vytvořena plošně, což je činí vůči nemoci zranitelnějšími.

Bsal. Jedinci napadení *Bsal* vykazují mnohem viditelnější klinické příznaky, rovněž průběh nemoci bývá u citlivých druhů mnohem vážnější. Martel et al. (2013) popisují úhyny mloků skvrnitých v průběhu sedmi dnů. Během této doby byli nakažení jedinci apatičtí a nepřijímali potravu. Díky schopnosti vytvářet koloniální stélky napadá *Bsal* větší oblasti pokožky, proniká do jejích hlubších vrstev a vytváří zde otevřené léze (Martel et al. 2013, Obr. 2). Podrobný popis symptomů a fyziologie působení obou patogenů je uveden v práci Van Rooij et al. (2015).

Diagnostika se provádí mikroskopicky identifikací baňkovitých sporangií a přepážkovitých stélek uvnitř pokožky (Berger et al. 2005). S jistotou lze chytridiomykózu (tj. onemocnění) potvrdit pouze histologickým vyšetřením (Berger et al. 1999) v kombinaci s PCR (viz dále). Průkaz přítomnosti patogenů, resp. jejich DNA, se provádí pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), za použití příslušných primerů a podle postupů dle standardizovaných protokolů (*Bd* – Boyle et al. 2004, Hyatt et al. 2007; *Bsal* – Blooi et al. 2013). Intenzita nákazy se vyjadřuje pomocí hodnoty GE (genomic equivalent), vyjadřující počet zoospor na stěr. Za hraniční hodnotu, od které je infekce zpravidla letální, je považováno GE = 10 000 (Vredenburg et al. 2010).

Analyzovat lze ústřížky prstů, kousky kůže nebo celé juvenilní jedince. Pro svou nedestruktivnost a dostatečnou výpovědní hodnotu jsou však nepoužívanější metodou stěry pokožky za použití vatových špiček, např. standardně používanými mikrobiologickými výtěrkami Dryswab™ MW 100 (Obr. 3). Získaný stěr se až do zpracování musí uchovat v originálním obalu výtěrnice, nejlépe v lednici při teplotě 4 °C. Nalezená těla uhynulých obojživelníků je ideální konzervovat ve zmrazeném stavu. Pokud to není možné, lze je pro případné pozdější histologické vyšetření uchovat v 10% formalínu nebo v 96% lihu (Civiš et al. 2010). Novou progresivní metodou je PCR analýza vzorků vody z biotopu obývaného obojživelníky, namísto stěrů z pokožky odchycených jedinců, tzv. environmentální DNA (eDNA, Lastra González et al. 2021, blíže v metodice Baláže et al. 2023).

Obr. 3: Odběr vzorků – buněk z povrchu kůže – specializovanými vatovými štětičkami u ropuchy zelené (*Bufotes viridis*). Při odběru vzorků je nutno dodržovat hygienická pravidla a s každým jedincem manipulovat v nových jednorázových rukavicích, aby se zabránilo šíření nákazy.



3.2 Ranaviry

Ranaviry z čeledi *Iridoviridae* způsobují vážné onemocnění obojživelníků – **ranavirózu**. Ranaviry napadají studenokrevné obratlovce – ryby, plazy a obojživelníky (Hyatt et al. 2000). Jedná se o obalené a neobalené viry, které mají dvouvláknovou DNA a jsou přítomny ve sladké i slané vodě (Chinchar et al. 2017).

Ranaviry patří do skupiny nově se šířících a globálně se vyskytujících patogenů, byly nalezeny na všech kontinentech kromě Antarktidy (Daszak 2000, Duffus et al. 2015). Ranaviróza se tak stává velkou hrozbou pro studenokrevné obratlovce (Chinchar 2002, Williams et al. 2005) a předpokládá se, že ranaviry jsou, společně s chytridiomýkózou, spoluodpovědné za globální poklesy populací obojživelníků (Chinchar 2002). Například u skokana hnědého ve Velké Británii dokonce ohrozily celou populaci (Cunningham et al. 1996, Gray et al. 2009). Mezinárodní obchod se zvířaty (např. se skokanem volským, *Lithobates catesbeianus*), společně s chovem ryb, šíření těchto virů podporují (Schloegel et al. 2009, 2010, Brunner et al. 2015).

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

Ranaviróza je často detekována u časně metamorfovaných jedinců (Blaustein et al. 2018), ale běžně napadá také dospělé. Druhy ranavirů napadající obojživelníky jsou:

- Bohle iridovirus (BIV), u žab
- Frog Virus 3 (FV3), především u žab
- *Ambystoma tigrinum* virus (ATV), u severoamerických mloků
- Common midwife toad virus (CMTV), u různých druhů obojživelníků

Důležitou a znepokojivou vlastností ranavirů je jejich schopnost přenosu na další obratlovce, konkrétně ryby (FV3 and BIV) a plazy (FV3, CMTV).

Typickým projevem ranavirózy je začervenání podkoží a orgánů jako důsledek vnitřního krvácení (Pessier 2018). Tuto diagnózu je však možné snadno zaměnit za tzv. syndrom červené nohy, tedy bakteriální infekci, viz níže (Cunningham et al. 1996). Ranavirózy jsou rozšířeny i ve střední Evropě a v některých případech vytváří koinfekce s *Bd* (Baláž, pers. data).

Většinu aktuálních případů hynutí obojživelníků v Evropě na ranavirus má na svědomí právě evropská linie **CMTV – common midwife toad virus**. Jedná se o nedávno identifikovaný druh ranaviru (Balseiro et al. 2009). Zdá se, že tento ranavirus se momentálně v Evropě a Asii šíří (Price et al. 2017, Rosa et al. 2017) a postihuje celou řadu obojživelníků (čolek horský, ropuška starostlivá, mlok skvrnitý; Balseiro et al. 2009, 2010, Kik et al. 2012). Byl zaznamenán i případ úhynu užovky *Natrix maura* po pozření infikované žáby (Price et al. 2014).

3.3 Herpesviry

Prvním známým žabím herpesvirem byl ranid herpesvirus-1 (RaHV-1). Byl popsán v roce 1934 a je zodpovědný za rakovinu ledvin postihující skokany levhartí (*Rana pipiens*) (Carlson et al. 1994). Celogenomové sekvenování RaHV-1 a RaHV-2, jiného druhu herpesviru prozatím nezaznamenaného u obojživelníků, prokázalo blízkou příbuznost s Ictalurid herpesvirem-1 nalezeného u severoamerických sumečků (Pessier 2018).

Posledním popsánými druhy jsou prozatím ranid herpesvirus-3 (Origgi et al. 2017), který postihuje skokany štíhlé a hnědé. Bufonid herpesvirus (Origgi et al. 2018) způsobuje různé deformace kůže, nejčastěji přebujelý růst kožních buněk (epidermalní hyperplasii).

Příznaky herpesvirózy byly zjištěny v Německu v roce 2008, kdy došlo k projevům blízkým nákaze RaHV-3 u skokana hnědého, skokana ostronosého (*Rana arvalis*) a blatnice skvrnitě (*Pelobates fuscus*), a dále ve Velké Británii v roce 2015 u skokana hnědého (Franklinos et al. 2018, Allain & Duffus 2019). Situace v Německu je kvůli geografické blízkosti pro naše území velmi významná.

Bufonid herpesvirus 1 BfHV-1 je jediný herpesvirus, který byl zjištěn u ropuchy obecné (*Bufo bufo*) (Origgi et al. 2018). Byl pozorován v období rozmnožování. Jedinci, u kterých byl tento virus potvrzen, byli nacházeni mrtví i živí, ovšem ve špatné kondici (Origgi et al. 2018). Stejně jako u Ranid herpesviru 3 je pravděpodobné, že kožní léze způsobené ropuším herpesvirem jsou jen přechodné (Origgi et al. 2021). Rovněž také nedochází k žádnému závažnému souvisejícímu zánětu (Boutier et al. 2019). Bufonid herpesvirus byl v ČR molekulárně potvrzen ve vzorcích z roku 2022 z Krkonoš, a také z archivních vzorků z Mostecka z roku 2013.

3.4 Saprolegnie a mikrosporidie

Saprolegnia ferax a další řasovky

Saprolegniózu způsobují parazitické řasovky (Oomycota, zejména *Saprolegnia ferax*), které napadají vejce i larvy obojživelníků a narušují průběh metamorfózy (Robinson et al. 2003, Uller et al. 2009), což vede ke zvýšené úmrtnosti dospělců (Altwegg & Reyer 2003). Druhy rodu *Saprolegnia* vyvolávají saprolegniózu také u ryb a způsobují značné ekonomické škody (West 2006).

Oomycety jsou přirozeně přítomné ve sladké vodě a v půdě, oba typy se vyznačují saprofytickým a parazitickým způsobem života (Romansic 2007). Zoospory se dokáží volně pohybovat ve vodě a uchytit se na jedinci, avšak častějším způsobem bývá přenos přímým kontaktem (Robinson et al. 2003). Jakkoliv oslabená vajíčka (např. UV zářením) jsou k infekci náchylnější. Výskyt onemocnění je pozitivně korelován s nadmořskou výškou (Muir et al. 2015) a pH (Leuven et al. 1986). Patogen byl doložen u řady druhů, kde způsobil významné poklesy celých populací, např. u skokana hnědého v Evropě (Robinson et al. 2003) či ropuchy západoamerické (*Anaxyrus boreas*) (Kiesecker et al. 2001, Ortiz-Santaliestra et al. 2011, Perotti et al. 2013). V ČR bývají oomycety pozorovány spíše jako saprofyty na již uhynulých obojživelnících, ale existují ojedinělé pozorování infikovaných živých jedinců (např. pulců rosničky; Baláž pers. obs.). Oomycety jsou běžnou komplikací v chovech, kdy snadno infikují oslabená a zraněná zvířata.

Microsporidium

Mikrosporidie (Microsporidia), tradičně klasifikované jako prvoci, jsou intracelulárními parazity tvořícími sesterskou skupinu k houbám (Fungi) (Hibbett et al. 2007). Lze je nalézt jak u volně žijících obojživelníků, tak v chovech. Typickými příznaky při makroskopickém vyšetření jsou bílé odbarvená tkáň a pruhování svalů (Pessier 2018). Histologicky byly v sarkoplazmě kosterních svalových buněk a v cytoplazmě makrofágů pozorovány nesčetné 3,2–4,5 μm spory. *Pleistophora*-like mikrosporidium bylo příčinou zánětu hřbetních svalů a následné deformace páteře u mloků (Gamble et al. 2005). Infekce *Alloglugea bufonis* způsobují, že střevní buňky hostitele jsou zvětšené (xenomy) a obsahují mikrosporidiové spory. Byla zaznamenána u pulců a čerstvě metamorfovaných jedinců ropuchy obrovské (*Rhinella marina*) z Brazílie (Paperna & Lainson 1995). Při pitvě měli postižení pulci bílé uzliny nebo cysty na střevech, slezině a ledvinách.

Infekce neidentifikovanými mikrosporidii byly příčinou nekrotizací na játrech volně žijících pulců skokanů maskovaných (*Rana muscosa*) a zánětu střev u pulců rosnic siných (*Ranoidea caerulea*) (Vergneau-Grosset & Larrat 2016). Další neidentifikované mikrosporidie byly pozorovány ve vaječnících a méně často ve varlatech několika druhů obojživelníků (Pessier 2018).

3.5 “Prvoci (Protozoa)”

I pro prvoky platí totéž, co pro jiné parazity zmíněné výše – jsou klinicky významní pouze v případě masového napadení hostitelského organismu nebo potencionálního zavlečení do nových oblastí. U řady onemocnění se také nikdy nepodařilo prokázat konkrétního původce. Příkladem mohou být úhyny kriticky ohrožených afrických ropuch *Nectophrynoides asperginis*, které byly způsobeny blíže neurčenými obrvenými nálevníky (Garner et al. 2005).

Tradiční skupina Protozoa byla nicméně v moderním systému rozdělena do několika nepřibuzných říší. Níže uvádíme nejdůležitější zástupce jednotlivých říší, ve kterých se vyskytují paraziti obojživelníků (Amoebozoa, Chromalveolata a Opisthokonta).

Říše měňavkovci (Amoebozoa)

Amébové průjmy, způsobované blíže neidentifikovanou amébou rodu *Entamoeba*, byly rozeznány jako příčina zánětů ledvin u ropuch obrovských (Valentine & Stoskopf 1984). *Entamoeba ranarum* je běžným obyvatelem gastrointestinálního traktu obojživelníků, ale její přítomnost není téměř nikdy spojena s vypuknutím nemoci.

Říše Alveolata

Do říše protist Alveolata, spadá velké množství druhů od fototrofních, přes “spásače” bakteriálních povlaků, až po vnitrobuněčné parazity. Nejdůležitější patogeny obojživelníků patří do tří skupin – kokcidie (Coccidia) a hromadinky (Gregarinidae) z kmene Apicomplexa a zástupci samostatného kmene Perkinsozoa (Chambouvet et al. 2020). Tito parazité přednostně napadají jaterní buňky, červené krvinky a makrofágy.

kokcidie (*Coccidia*, *Apicomplexa*)

Významnými kokcidiemi jsou pro obojživelníky především rody *Eimeria*, *Isospora* a *Goussia* (Duszynski et al. 2007). U rodu *Goussia* byly popsány dva druhy infikující pravděpodobně všechny druhy našich skokanů a ropuchy obecné (Jirků et al. 2009). Narozdíl od rodu *Eimeria*, který se vyskytuje jak u pulců, tak u larev, je infekce rodem *Goussia* omezena pouze na pulce (Paperna et al. 1997). Nakažení pulci vykazují významné histopatologické změny (např. rozpad výstelky střeva) a vylučují oocysty parazita ve svém trusu. Přesto nebyla zaznamenána ani žádná viditelná zánětlivá reakce, úmrtnost či narušení metamorfózy (Jirků et al. 2009), což naznačuje, že přítomnost parazita není pro pulce významně nebezpečná. Ze Severní Ameriky byl popsán případ masového úhynu čolků zelenavých (*Notophthalmus viridescens*), způsobený novým druhem *Eimerie* (Hardman et al. 2023).

hromadinky (*Gregarinidae*, *Apicomplexa*)

Hromadinky jsou běžnými obyvateli tělních dutin bezobratlých živočichů, ale až do roku 2016 nebyly nalezeny u obratlovců. Nicméně v tomto roce byl v okolí Brna detekován druh *Nematopsis temporariae* v makrofázích pulců skokanů štíhlých, s. hnědých a rosniček (Chambouvet et al. 2016). Rovněž v tomto případě, stejně jako u kokcidií, nevede infekce k rozvoji nemoci.

Perkinsozoa

Davis et al. (2007) zaznamenali masové hynutí skokanů východoamerických (*Rana sphenoccephalus*) v severovýchodní Georgii (USA). Infikovaní pulci vykazovali letargický pohyb a nejružnější abnormality, jako např. zarudnutí a krevní výrony v kůži, nebo naopak odbarvené (světlé) plošky kůže. Genetická analýza prokázala, že patogen zodpovědný za toto onemocnění patří do kmene Perkinsozoa. Tento kmen by tradičně považován za mořskou skupinu, která infikuje měkkýše a obrněnky (Chambouvet et al. 2015). Některé mořské druhy (*Perkinsus marinus*, *P. olseni*) jsou dokonce významnými a šířícími se patogeny, takže je OIE (WOAH) uvádí na svém seznamu významných nákaz.

V případě obojživelníků napadají Perkinsozoa především pulce, ačkoli bylo zaznamenáno i několik infekcí dospělců (Landsberg et al. 2013). Perkinsozoa jsou považována za šířící se nákazu a jsou možným původcem masových úhynů pulců na mnoha místech USA (Davis et al. 2007, Isidoro-Ayza et al. 2017).

říše Opisthokonta

plísňovky (*Mesomycetozoea*)

Vyskytují se jak v mořích, tak ve sladkých vodách a žijí komenzálně nebo paraziticky v tělech bezobratlých, ryb, obojživelníků, ptáků a savců (Pessier 2018), jeden druh (*Rhinosporidium seeberi*) napadá i člověka. Životní cyklus plísňovek infikujících obojživelníky (např. rody *Amphibiocystidium*, *Amphibiothecum* a *Rhinosporidium*) není znám.

Nový druh plísňovky, prozatím zvaný *Ichthyophonus*-like, byl nalezen u obojživelníků v Severní a Jižní Americe (Mikaelian et al. 2000, Borteiro et al. 2015). Je morfologicky podobný *Ichthyophonus hoferi*, jenž infikuje ryby. Životní cyklus není znám, ale u čolka zelenavého jsou možnými přenašeči pijavice (např. *Plactobella picta*) (Raffel et al. 2006).

Na rozdíl od mnoha výše zmíněných patogenů, jsou plísňovky široce rozšířeny i po Evropě (González-Hernández et al. 2010, Courtois et al. 2013, Fiegna et al. 2017, Martínez-Silvestre et al. 2017). Jeden z prvních záznamů na světě pochází z Hradce Králové (Broz & Privora 1952). Zajímavý je rovněž fakt, že plísňovky mohou vytvářet koinfekci s chytridiomykózami (Borteiro et al. 2014, Ayres et al. 2020), přičemž efekt kombinované infekce oběma patogeny není dosud prozkoumán.

3.6 Bakterie (Bacteria)

Bakterie způsobující Red leg syndrome

Toto onemocnění ("syndrom červené nohy") bylo připisováno na vrub bakterii *Aeromonas hydrophila*, jež bývá ve vzorcích nejčastěji izolována. Pozdější výzkumy prokázaly u postižených zvířat přítomnost mnoha dalších druhů bakterií, např. *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Streptococcus inae* (Schadich & Cole 2010). Jde o akutní septikémii, resp. dermatoseptikémii, jež je v chovech obojživelníků poměrně častá. Příznaky jsou podobné ranaviróze a je možné, že se v tomto případě jedná o sekundární onemocnění poté, co je organismus infikován ranavirem (Green et al. 2002). Onemocnění mohou iniciovat nevhodné podmínky v chovu – teplota a kvalita vody.

Brucella inopinata-like

Brucelóza, daleko známější u savců, se může vyskytovat také u obojživelníků. Dříve byla tato bakterie mylně identifikována jako *Ochrobactrum anthropic*. Nemoc postihuje měkké tkáně, kdy vznikají podkožní abscesy na svrchní straně končetin. Dále dochází k infekci kostní tkáně a zduření obratlů. Tato nemoc prozatím nebyla zaznamenána u evropských volně žijících druhů, ale je známa z Ameriky, Afriky a Austrálie. Některé kmeny mají potenciál způsobovat vysokou úmrtnost v chovech a není je jednoduché odhalit pomocí běžně používané diagnostiky (Muhldolfer et al. 2016).

rod *Chlamydia*

Tyto Gram-negativní bakterie se nacházejí jak u ocasatých, tak u žab. Jako původce infekcí obojživelníků byly prozatím rozeznány dva druhy, *C. psittaci* a *C. pneumoniæ* (Berger et al. 1999), ale jejich význam spočívá spíše v možném přenosu na člověka než v ohrožení samotných obojživelníků. Výzkum ve Švýcarsku (Blumer et al. 2007) prokázal vysokou míru prevalence těchto bakterií u obojživelníků, kteří tak mohou plnit roli rezervoárů tohoto patogenu. U nakažených jedinců jsou někdy pozorovány nespecifické léze v kůži a nadměrné svlékání. Průkaz chlamydiózy se provádí pomocí PCR na 16s RNA a ompA genech (Pessier 2018).

3.7 Další patogeny

Mnohobuněční (Metazoa)

Velké množství zástupců z tohoto kmene může parazitovat obojživelníky, ale pouze malé množství z nich způsobuje vznik onemocnění (Koprivnikar et al. 2012). Příkladem nepříliš škodlivých parazitů mohou být hlístice háďata (rod *Rhabdias*), které žijí v tělech obojživelníků bez toho, aby napadení jedinci projevovali příznaky onemocnění (Pessier 2018).

Někteří parazité využívají obojživelníky jako své mezihostitele a vytvářejí cysty v jejich kůži (např. hlístice *Eustrongylides* sp. nebo *Angiostrongylus cantonensis*) (Pessier 2018). U motolic (Trematoda) *Clinostomum marginatum* jsou známy případy, kdy velký počet zapouzdřených metacerkárií (larev) vedl ke vzniku boulí na hlavě. Ty negativně ovlivňovaly základní životní funkce postižených jedinců čolků zelenavých, např. přijímání potravy (Perpiňán et al. 2010). Cysty motolic *Ribeiroia ondatrae* jsou častou příčinou malformací končetin u amerických žab a prevalence této infekce je ještě zvyšována eutrofizací prostředí (Rohr et al. 2008).

Mezi další parazity obojživelníků patří **rybomorky** (Myxozoa), jejichž definitivními hostiteli jsou vodní bezobratlí a mezihostiteli obojživelníci nebo ryby. Různé druhy se vyskytují v ledvinách, žlučníku, varlatech a kůži. Rody *Chloromyxum*, *Sphaerospora* a *Hoferellus* napadají ledvinné kanálky a glomeruly, přičemž z okolí Brna pochází záznam o výskytu rodu *Sphaerospora* (Jirků et al. 2007). Nejznámějším onemocněním způsobeným rybomorkami je zvětšení ledvin (Frog kidney enlargement disease) u afrických rákosníček (Hyperoliidae) způsobené druhem *Hoferellus anurae* (Mutschmann 2004).

Kromě výše zmíněných endoparazitů je třeba zmínit také mnohobuněčné ektoparazity. Příkladem může být **červok kapří** (*Lernaea cyprinacea*), buchanka parazitující na rybách, která příležitostně napadá i pulce a juvenilní jednice žab (Kupferberg et al. 2009). Hlava parazita proniká kůží a ukotví se v měkké tkáni pod ní, zatímco prodloužený zadeček s párem vaječných vaků trčí z kůže ven. **Kapřivci** (rod *Argulus*) jsou krevsající paraziti ryb, kteří se nacházejí také na zástupcích žab i ocasatých ve vodní fázi života.

Některé mouchy, jako jsou rody *Notochaeta*, *Batrachomyia* a *BufoLucillia*, způsobují tzv. **myiázy** žab (Pessier 2018). V Evropě se vyskytuje pouze jeden druh, a to bzučivka *Lucilia bufonivora* (Arias-Robledo et al. 2019a), která napadá zejména ropuchy obecné (Arias-Robledo et al. 2019b). Infikuje přednostně dospělé a svá vejce klade do okolí nosních otvorů postižených jedinců. Larvy následně požírají měkké tkáně uvnitř hlavy a kuklí se v mrtvém těle uhynulé žáby (Goddard et al. 2020).

4. Právní souvislosti a východiska na evropské a globální úrovni

Vývoj strategií omezujících šíření patogenů je aktivitou, která se dotýká politiky, ekonomiky, vědy i zdraví a spadá do působnosti lékařské, veterinární, zemědělské a rovněž do agendy ochrany přírody (Garner et al. 2016). V boji proti infekčním nemocem lze využít mnoha přístupů. Základními jsou proaktivní (preventivní) a reaktivní (zmírňující) opatření (viz Kap. 5). Ta ovšem musí být právně zakotvena. Je tedy nutné stanovit závazná pravidla a následně je respektovat. Pokud je právní regulace aplikována včas, tj. ještě před existencí rizika, je sama o sobě důležitým preventivním nástrojem.

Vzhledem k tomu, že v globalizovaném světě patogeny snadno překračují hranice států, je nutné uplatňovat právní nástroje na mezinárodní úrovni. V následujícím přehledu jsou stručně popsány nejdůležitější právní prameny, které se infekčními nemocemi obojživelníků zabývají. Největší pozornost je věnována právním nástrojům uplatňovaným v Evropě, resp. EU (Kap. 4.1), a to zejména těm, které problematiku infekčních onemocnění přímo řeší. Kap. 4.2 je věnována regulaci obchodu s obojživelníky na celosvětové úrovni, zejména v souvislosti s Úmluvou CITES. V širším kontextu se ochranou (nejen) obojživelníků a jejich biotopů včetně problematiky invazních druhů zabývá řada dalších mezinárodních úmluv, jejich rozbor však překračuje zaměření této metodiky. Podrobnější informace k nim lze nalézt např. v publikaci Stejskala (2006) či na stránkách AOPK ČR a MŽP. V poslední části (Kap. 4.3) jsou uvedeny příklady přístupů některých zemí, zejména stran zákazu či omezení obchodu s (vybranými) obojživelníky.

4.1 Legislativa EU

Právní rámec ochrany obojživelníků v souvislosti s infekčními nemocemi a patogeny na území EU je dán zejména Úmluvou o ochraně evropské fauny a flóry a přírodních stanovišť (Bernská úmluva), a to prostřednictvím doporučení Stálého výboru Bernské úmluvy, a dále rozhodnutím Komise (EU) č. 2018/320.

Doporučení Stálého výboru Bernské úmluvy

Cílem Bernské úmluvy je ochrana rostlin a živočichů i jejich stanovišť (biotopů), zejména pak ohrožených a stěhovavých druhů, jejichž ochrana vyžaduje celoevropskou spolupráci. Řídícím orgánem úmluvy je Stálý výbor. Významnými právními prameny, které se problematikou nemocí obojživelníků přímo zabývají, jsou dvě doporučení Stálého výboru. Na rozdíl od směrnic, nařízení či rozhodnutí Komise EU jsou však tato doporučení pro členské státy EU nezávazná.

Doporučení č. 176/2015 se zabývá preventivními opatřeními k omezení šíření patogenu *Bsal* ve volné přírodě i v chovech. Zdůrazňuje potřebu přípravy a implementace pravidel pro manipulaci s obojživelníky ve volné přírodě a znalost postupů léčby. Požaduje vytvořit národní systém monitoringu populací ocasatých i patogenu *Bsal* a celoevropský systém včasného varování včetně pohotovostních plánů pro případ zavlečení *Bsal*. Doporučení zdůrazňuje nezbytnost podpory výzkumu patogenů, ochrany ocasatých obojživelníků a osvěty na národních úrovních.

Navazující **doporučení č. 197/2017** to předchozí rozšiřuje o problematiku dalších nemocí obojživelníků, ale i plazů, bez uvedení konkrétních patogenů tak, aby bylo platné i pro dosud neznámé patogeny a nákazy. Obě doporučení požadují po signatářských státech reporting o

prováděných aktivitách a jejich výsledcích. V tomto ohledu je u nás zodpovědným MŽP, ve spolupráci s AOPK ČR (AOPK ČR 2023). Nastavená pravidla by měla být dodržována do té doby, dokud nebudou EU navržena nezbytná preventivní opatření proti zavlečení *Bsal* prostřednictvím obchodu se zvířaty.

Rozhodnutí Komise (EU) č. 2018/320

Jedním z nejvýznamnějších předpisů EU, který se týká prevence a kontroly šíření patogenů obojživelníků, bylo **rozhodnutí Komise (EU) č. 2018/320**, o některých ochranných veterinárních opatřeních pro obchod s mloky uvnitř Unie a dovoz těchto zvířat do Unie v souvislosti s plísni *Batrachochytrium salamandrivorans* (dále jen „rozhodnutí“). Komise EU dále nařízením č. 2018/1882 zařadila patogen *Bsal* mezi druhy, které představují značné riziko šíření vybraných nákaz zvířat (v tomto případě chytridiomykózy).

Podle rozhodnutí se mloky rozumí všichni obojživelníci řádu Caudata (ocasatí). Ochranná veterinární opatření se vztahují pouze na obchod s nimi. Neobchodní přesuny mloků, resp. všech obojživelníků v zájmovém chovu, spadají do oblasti působnosti nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) č. 576/2013 (viz dále). Rozhodnutí stanovuje ochranná veterinární opatření pro obchod se zásilkami mloků uvnitř EU a dovoz těchto zásilek ze třetích zemí do EU.

Veškeré obchodní zásilky mloků **uvnitř EU** musí být doprovázeny veterinárním osvědčením, mloci nesmí vykazovat klinické příznaky (léze a vředy) během 24 před odesláním do členské země EU a musí pocházet z populace, v níž nedošlo k žádnému úhynu v důsledku chytridiomykózy způsobené *Bsal*. Při nesplnění těchto podmínek je odesílání zásilek s mloky mezi členskými státy EU zakázáno. **Dovoz mloků do EU** je rovněž zakázán, pokud nejsou splněny podmínky definované v článku 4 tohoto rozhodnutí, tj. mloci musí mít příslušné veterinární osvědčení, nesmí vykazovat příznaky *Bsal* (viz výše) a musí být dodržena pravidla karantény dle článku 6 rozhodnutí. Veškeré náklady na karanténu, testování, příp. opatření ke zmírnění rizika a ošetření nese provozovatel nebo dovozce. Členské státy předkládají každoročně Komisi EU report (v ČR zodpovědné MŽP), jehož náležitosti jsou uvedeny v článku 9 rozhodnutí.

S ohledem na toto rozhodnutí Státní veterinární správa (SVS) upravila dozor při obchodu se zásilkami mloků uvnitř EU a podmínky jejich dovozu do ČR. V případě obchodu z ČR do jiného členského státu EU a v případě dovozu do ČR ze třetí země je nutné provést na území ČR karanténu mloků, která musí být registrována a pod dozorem příslušné krajské veterinární správy (KVS). Karanténa musí splňovat veškeré požadavky rozhodnutí, např. odpovídající dozor nad mloky, čistitelné a dezinfikovatelné prostory, příslušné nakládání s odpadem a odpadními vodami, testy a ošetření mloků, vedení evidence a další. Každá zásilka mloků musí být mimo jiné také doprovázena veterinárním osvědčením, které odpovídá vzoru stanovenému v rozhodnutí. Během karantény mloků musí provozovatel nebo dovozce zajistit na své náklady požadované vyšetření, odběr vzorků a příslušná testování nebo ošetření mloků (SVS 2023). Žádost o registraci karantény mloků je dostupná na internetových stránkách SVS <https://www.svscr.cz/>.

Nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) č. 576/2013

Toto nařízení stanovuje veterinární podmínky pro neobchodní přesuny zvířat v zájmových chovech. Neobchodním se myslí přesun, jehož cílem není prodej ani převod vlastnictví zvířete v zájmovém chovu (např. převoz zvířat na soutěže či výstavy). Zvířetem v zájmovém chovu je pak

zvíře některého z druhů uvedených v příloze I, které po celou dobu neobchodního přesunu provází svého majitele nebo oprávněnou osobu. Obojživelníci patří v rámci přílohy I tohoto nařízení do části B a na jejich neobchodní přesuny mezi členskými státy EU se, dle článku 9 tohoto nařízení, vztahují následující podmínky: (i) zvířata musí být označena či popsána tak, aby byla zajištěna spojitost mezi daným zvířetem a jeho identifikačním dokladem; (ii) vyhovují preventivním zdravotním opatřením proti nákazám či infekcím; (iii) jsou provázena řádně vyplněným identifikačním dokladem. Podobné podmínky platí i pro přesuny zvířat z třetích zemí do členských států EU.

4.2 Regulace mezinárodní obchodu s obojživelníky

Obchod s obojživelníky jako ohrožující faktor

Mezinárodní obchod s obojživelníky hraje při šíření patogenů a nákaz zásadní roli. Obojživelníci jsou obchodováni za kulinařskými, vědeckými či chovatelskými účely (Yap et al. 2017). Jejich patogeny se tak dostávají do nových oblastí a infikují naivní hostitelské populace (Cunningham et al. 2003). Současně může značný objem zvířat odebíraných z volné přírody vést k vyhubení populací i celých druhů (Schlaepfer et al. 2005, Auliya et al. 2016). Ohrožena je např. řada druhů ocasatých obojživelníků z jihovýchodní Asie (Rowley et al. 2016).

Předmětem obchodu (legálního i nelegálního) jsou řádově miliony jedinců ročně (Yuan et al. 2018). Největším světovým dovozcem volně žijících obojživelníků jsou USA. V letech 2002–2004 zde bylo legálně obchodováno s více než 26 miliony jedinců obojživelníků. Tento obchod zahrnoval mj. 127 nepůvodních druhů (Schlaepfer et al. 2005, Jenkins et al. 2007). V období 2005–2015 bylo do USA dovezeno dalších 28 mil. jedinců obojživelníků (Richgels et al. 2016). Jen v letech 2010–2014 šlo o téměř 780 000 živých ocasatých obojživelníků. Z nich přibližně 99 % pocházelo z Asie a 91 % tvořily druhy rodů *Cynops* a *Paramesotriton* (Baláž et al. 2017). Naopak hlavními vývozci asijských ocasatých obojživelníků jsou Čína (65 %), Hongkong (22 %) a Japonsko (9 %) (UNEP-WCMC 2016). Objem obchodu s obojživelníky v Evropě je rovněž nezanedbatelný. Odhaduje se, že v letech 2005–2015 bylo do EU dovezeno přibližně 620 000 kusů ocasatých obojživelníků (Baláž et al. 2017). Stejně jako v případě USA, i zde naprostá většina dovozů pochází z Asie, resp. tří výše uvedených zemí. Hlavními dovozci v rámci EU jsou Německo (více než 70 %), ČR a Španělsko (UNEP-WCMC 2016). Naše republika tak čelí značnému riziku zavlečení nákaz z chovů do volné přírody (Baláž et al. 2018).

Úplné údaje o obchodu s obojživelníky nicméně chybí (Rowley et al. 2016). Z databáze CITES vyplývá, že většina jedinců dovezených do EU byla předmětem obchodu z neznámých zdrojů (Baláž et al. 2017). Kromě legálního obchodu existuje také černý trh. Odhadnout jeho objem je prakticky nemožné. Jisté je, že značná část obojživelníků je získávána z volné přírody a následně prodávána jako jedinci odchovaní v zajetí (Auliya et al. 2016, Baláž et al. 2017).

Omezení a kontrola obchodu s obojživelníky tak představují klíčová opatření, která by měla snížit pravděpodobnost zavlečení patogenů do dosud nedotčených oblastí a populací ve volné přírodě (Auliya et al. 2016).

Úmluva CITES

Účelem Úmluvy o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (CITES) není zamezení veškerého obchodu, ale nastavení kontrolních mechanismů, které budou legální obchod s exempláři CITES regulovat a nelegální potlačovat. Exemplářem CITES jsou nejen živé rostliny a živočichové, ale také výrobky z nich. Vybrané druhy jsou podle ohroženosti zařazeny do tří kategorií (přílohy I–III úmluvy). U druhů z přílohy I je např. obchod prakticky zakázán, obchod s druhy v příloze II je regulován na základě vývozních a dovozních povolení (tzv. permity CITES, Stejskal 2006). V současné době ke smlouvě přistoupilo více než 180 států světa včetně všech 27 zemí EU (AOPK ČR 2023). Ratifikací smlouvy se členský stát zavazuje implementovat požadavky z úmluvy do své legislativy. V případě členských zemí EU k tomu došlo prostřednictvím nařízení Rady (ES) č. 338/97 (Stejskal 2006).

Od 26. listopadu 2019 vešlo v platnost rozšíření úmluvy CITES o několik druhů obojživelníků, zejména kvůli chytridiomykóze, resp. patogenu *Bsal*. Nově zapsanými rody obojživelníků byly pačolek (*Paramesotriton*) a trnočolek (*Tylototriton*), z druhů trnočolek Čangův (*Echinotriton chinhaiensis*) a trnočolek *Echinotriton maxiquadratus*. Regulace mezinárodního obchodu je pro tyto taxony obojživelníky velice důležitá, neboť jsou předmětem intenzivního obchodu a současně se jedná o druhy přenášející patogen *Bsal*. Jmenovaní obojživelníci byli zařazeni do přílohy II CITES (resp. přílohy B podle předpisů EU). V současnosti je v přílohách I až III úmluvy CITES pouze 222 taxonů obojživelníků. To znamená, že mezinárodní obchod v rámci této úmluvy je sledován ve velmi malém měřítku u necelých 3 % druhů. Obchod s ostatními druhy nelze podchytit kvůli absenci specifických jedinečných identifikačních kódů obojživelníků v systému TRACES (systém EU pro kontrolu obchodu a vývozu, Spitzen-van der Sluijs 2018). Většina obchodu s obojživelníky tak není pod kontrolou, stejně tak šíření jejich nákaz do dalších oblastí.

Závažným problémem při kontrolách obchodu s obojživelníky je fakt, že celní správa spadající pod organizaci WCO (World Customs Organization) postrádá specifické označení pro obojživelníky ve svém systému. Obojživelníci spadají buď do kategorie „ostatní“ nebo jsou řazeni do kategorie „tropické ryby“ (Gerson et al. 2008). Tento nedostatek vesměs znemožňuje kontrolovat jakýkoliv obchod s druhy nebo dokumentovat počty dovážených obojživelníků do EU. To znamená, že i nadále bude velice obtížné vysledovat obchod s obojživelníky a provádět příslušná opatření, jako např. dodržování mezinárodních norem týkajících se obchodu, dopravy, kontroly nemoci, hygienických opatření a povinné karantény (Auliya et al. 2016).

V souvislosti s úmluvou CITES je důležité, že OIE (WOAH) uvedla v roce 2017 chytridiomykózu, jejímž původcem je patogen *Bsal*, na seznam nemocí obojživelníků podléhajících oznamovací povinnosti (OIE/WOAH 2020). Dohoda mezi OIE (WOAH) a CITES ohledně spolupráce o globálních otázkách zdraví zvířat je důležitým krokem vpřed, ovšem záleží i na budoucím naplnění jejích cílů. Dohoda si klade za cíl chránit druhy uvedené na seznamu CITES, biologickou rozmanitost a podniknout příslušné kroky ohledně chorob volně žijících živočichů (OIE/WOAH 2015).

4.3 Regulace obchodu – příklady

Ve světle dopadů šíření nových nákaz na biodiverzitu obojživelníků jsou v některých zemích uplatňována omezení, či dokonce zákazy dovozu vybraných obojživelníků.

USA

Spojené státy patří mezi několik zemí světa, kde je zakázán dovoz vybraných druhů obojživelníků, konkrétně pak 20 rodů ocasatých, kteří by mohli být přenašeči patogenu *Bsal* (Yap et al. 2015). Správa Spojených států pro ryby, planě rostoucí rostliny a volně žijící živočichy (U. S. Fish and Wildlife Service, USFWS) ustanovila prozatímní pravidla podle zákona Lacey Act (18 USC 42- USFWS 2016), jež omezují mezinárodní a mezistátní přesuny vybraných druhů (White et al. 2016)⁹. Aktuální předpisy USFWS umožňují ukládat dovozní omezení pro živočišné druhy, které by mohly potenciálně ohrozit druhy původní, avšak předpisy nezahrnují regulaci týkajících se mikroorganismů, respektive patogenů. Další mezerou v zákoně je nedostatečné opatření ohledně dovozu volně žijících zvířat. Zatímco u dovážených domestikovaných zvířat vyžaduje ministerstvo zemědělství USA platné veterinární osvědčení¹⁰, u volně žijících živočichů žádný důkaz o přepravě nenakažených zvířat vyžadován není (Gray et al. 2015).

Kanada

Narozdíl od USA přišel v roce 2015 kanadský Pet Industry Joint Advisory Council (PIJAC) s návrhem dobrovolného moratoria na dovoz čolků východních (*Hypselotriton orientalis*) a č. pyskatých (*Pachytriton labiatus*) do Kanady (PIJAC 2015). V květnu 2017 vyhlásila kanadská vláda jednorozhodný zákaz dovozu všech ocasatých obojživelníků, který následně změnila na trvalý (Canada Government 2022). Tento zákaz se týká všech jedinců, ať už živých či mrtvých, jejich vajíček, spermií, tkáňových vzorků, embryí a veškerých dalších částí těla. Výjimku uděluje pouze organizace Environment and Climate Change Canada (ECCC). Podobně jako v USA, se toto omezení nevztahuje na vnitrostátní transfer.

Švýcarsko

Švýcarsko se stalo první evropskou zemí, která začala využívat právních nástrojů v souvislosti s šířením patogenu *Bsal*. V roce 2015 Swiss Federal Food Safety and Veterinary Office (FSVO) stanovil zákaz importu všech ocasatých obojživelníků do této země (Schmidt 2016).

Maďarsko

Podobně striktní opatření zavedlo následně i Maďarsko, jehož vláda zakázala chov, držení, nákup a prodej ocasatých obojživelníků čeledi Hynobidae a Salamandridae a dále druhu *Karsenia koreana* z čeledi Plethodontidae.

⁹ Odvolací soud však rozhodl ve prospěch Americké asociace chovatelů plazů (U.S. Association of Reptile Keepers, USARK) a zrušil zákaz vnitrostátního obchodu.

¹⁰ Pokud se jedná o druh, který je jako potencionální hostitel uvedený na seznamu OIE (WOAH).

5. Příklady preventivních a zmírňujících opatření

V boji proti infekčním nemocem lze využít mnoha přístupů, které se liší mj. i podle etapy, ve které se ve vztahu k nákaze nacházíme. **Preventivní** (též proaktivní) opatření se uplatňují ještě před vniknutím patogenů/nákaz na dané území. Jejich cílem je zamezit jejich šíření do dosud nezasazených oblastí, protože prevence je mnohem efektivnější (tj. účinnější i levnější) než uplatňování **zmírňujících** (reaktivních či mitigačních) opatření (Grant et al. 2016), jejichž úkolem je snížení negativních dopadů nákaz u zasažených populací a zabránit dalšímu šíření patogenů (Kap. 5.3). Hypotetickým cílem může být rovněž eliminace patogenu z prostředí, což je ovšem nesmírně náročné (Kap. 5.4). Nedílnou součástí tohoto boje je rovněž osvěta (Kap. 5.1) a vytváření systémů včasného varování včetně monitoringu obojživelníků a patogenů (Kap. 5.2).

Na základě dostupných informací jsou vytvářeny komplexní systémy opatření proti konkrétním nákazám, tzv. akční plány (Kap. 5.5). Zdaleka nejpropracovanějším je v tomto ohledu evropský akční plán pro boj s patogenem *Bsal* (Gilbert et al. 2020), který vznikl v rámci projektu financovaného Komisí EU (tendr ENV.B.3/SER/2016/0028, Mitigating a new infectious disease in salamanders to counteract the loss of biodiversity, <http://bsaleurope.com/>).

Níže uvedené příklady opatření vychází převážně ze zahraničních zkušeností, zejména s patogeny *Bd* a *Bsal*, které jsou současně pro naše obojživelníky největší hrozbou. Přehled těchto opatření lze nalézt například v publikacích Woodhams et al. (2011), Baláž et al. (2017), EFSA (2018) Thomas et al. (2019) či Martel et al. (2020) či). Asi nejkomplexnějším informačním zdrojem je závěrečná zpráva (report) výše zmíněného projektu zaměřeného na *Bsal* (Gilbert et al. 2020). Navržená opatření se dají z části uplatnit i v rámci boje proti dalším patogenům a nákazám obojživelníků. Pro shrnutí je v této kapitole věnována pozornost následujícím tématům:

- Informační zdroje a osvěta (Kap. 5.1)
- Systémy včasného varování (Kap. 5.2)
- Preventivní opatření (Kap. 5.3)
- Zmírňující opatření (Kap. 5.4)
- Akční plány (Kap. 5.5).

5.1 Informační zdroje a osvěta

Osvěta stran potenciálních dopadů nákaz a uplatnění možných, zejména preventivních opatření, je naprosto zásadní. Potenciální cílovou skupinou jsou v tomto případě nejen profesionální ochránci přírody a jiní odborníci (např. veterináři), ale i hospodařící subjekty (např. rybáři) a široká veřejnost. Níže jsou uvedeny příklady těchto aktivit.

Výuková videa (RAVON)

Využití moderních způsobů komunikace je klíčové pro oslovení co nejširšího spektra populace a vytvoření obecného povědomí o problematice. Proto je tvorba videí důležitou formou komunikace. Příkladem může být nizozemská nevládní organizace RAVON (Reptile, Amphibian & Fish Conservation Netherlands, <https://www.ravon.nl/>), která vytvořila dvě videa, jež jsou dostupná na YouTube. První obsahuje obecné informace o *Bsal*, druhé je zaměřené na důležitost

bezpečného obchodu s obojživelníky a jeho snahou je informovat chovatele. Obě videa jsou k dispozici v 18 jazycích včetně češtiny (Obr. 4).

- Obecné informace o *Bsal*: https://www.youtube.com/watch?v=kss8B7V_zAA
- Bezpečný obchod: <https://www.youtube.com/watch?v=s5JQFWQPkFE>

Obr. 4: Snímek z české verze videa o patogenu *Bsal* z produkce nizozemské nevládní organizace RAVON

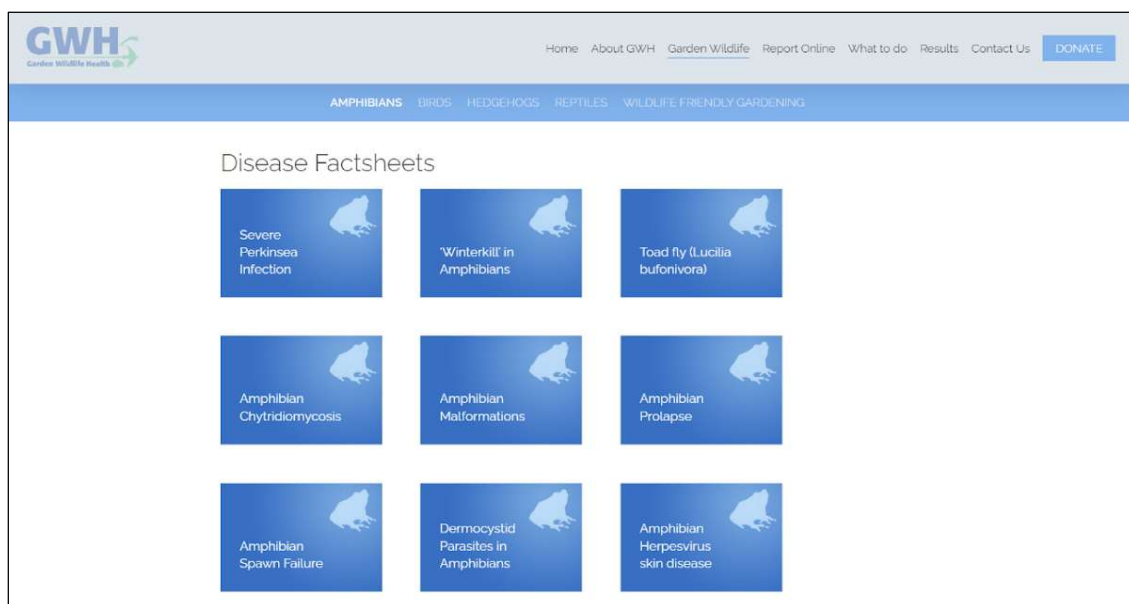


BsAlert

Cílem projektu BsAlert byl monitoring výskytu *Bsal* u ohrožených druhů obojživelníků v pohoří Cordillera Cantábrica včetně národního parku Picos de Europa na severu Španělska v autonomních oblastech Asturie, Kantábrie, Galicie, Kastilie a Leon. ČZU Praha (J. Vojar, D. Lastra González) byla důležitou součástí tohoto projektu financovaného španělským ministerstvem životního prostředí. V návaznosti byl také spuštěn projekt pro veřejnost, který využívá mobilní aplikaci ve španělštině (<https://bsalert.ihcantabria.com/#/info>). Místní lidé nebo turisté tak mohou poslat upozornění na potenciální výskyt *Bsal* v horách severního Španělska. Rovněž proběhla propagace tohoto projektu v médiích (např. YouTube, Facebook a Twitter newsletter atd.).

Projekt Garden Wildlife Health (GWH)

Internetové stránky projektu GWH (<https://www.gardenwildlifehealth.org/>, Obr. 5) jsou zaměřené na reporty nemocných či mrtvých živočichů nalezených v zahradách. Součástí stránek je sekce „Garden Wildlife“, kde jsou po jednotlivých skupinách (obojživelníci, ptáci, ježci a plazi) představeny nemoci a potenciální příčiny ohrožení jednotlivých taxonů. V případě obojživelníků jde o poměrně komplexní soubor informací obsahující popis řady patogenů i nálezů včetně chytridiomykózy. Součástí stránek jsou volně stažitelné informační materiály, např. s pokyny pro bezpečnou likvidaci odpadních vod a dalších materiálů z chovů obojživelníků.

Obr. 5: PrintScreen stránky projektu Garden Wildlife Health s popisem patogenů a nálezů obojživelníků

Online kurz MOOC (EAZA)

Organizací, která přispěla k šíření informací stran patogenu *Bsal*, především mezi zaměstnanci zoologických zahrad a akvárií, je EAZA (European Association of Zoos and Aquaria). Ta spustila online kurz nazvaný Massive Open Online Course (MOOC). Cílem kurzu bylo poskytnout účastníkům znalosti a praktické porozumění v následujících oblastech:

- Původ, rozšíření, riziko pro biodiverzitu a ochranná opatření
- Veterinární opatření: jak rozeznat *Bsal* v laboratoři a v terénu, prevence a léčba
- Ochrana *ex situ*: uplatnění, informace o rozmnožování obojživelníků, případové studie
- Prioritizace výzkumných otázek a pravidla rozhodování tváří v tvář nejistotě.

V době vydání metodiky byl na stránkách EAZA k dispozici online kurz zaměřený na patogen *Bsal* (<https://www.eaza.net/academy/courses/>).

5.2 Systémy včasného varování

Princip a význam. Systém včasného varování (SVV) je zásadním nástrojem pro rychlou detekci a reakci na jakýkoliv nebezpečný patogen a je nezbytnou součástí akčních plánů (Kap. 5.4). SVV maximalizuje šanci brzkého zachytu infekce u volně žijících jedinců a umožňuje zavedení zmírňujících opatření nejrychlejším a nejekonomičtějším způsobem. Když se patogen dostane do divoké populace, jeho kontrola se stává čím dál obtížnější a existuje pouze krátké časové okno, ve kterém je možné nákazu potlačit bez vynaložení astronomických nákladů. Systém by měl cílit na jedince z volné přírody i z chovů, kde se doporučuje testovat rutinně. Naprosto zásadní pro funkčnost těchto systémů je zapojení veřejnosti včetně chovatelů.

Zapojení veřejnosti. Důležité je vytvořit obecné povědomí o problematice nálezů a podporovat ohlašování všech podezřelých nálezů. Veřejnost musí mít jasné informace, komu mají tyto nálezy nemocných či mrtvých jedinců hlásit nebo kam se obrátit v případě úhynů v chovech. Všechny takto získaná zvířata musí být uschována a vyšetřena. Zapojení veřejnosti výrazně zvyšuje pokrytí

monitoringu, přitom minimalizuje dodatečné náklady (příkladem může být španělský projekt BsAlert, na kterém spolupracovala ČZU Praha, viz výše).

Aktivity týmu RACE v souvislosti s *Bd*

Risk Assessment of Chytridiomycosis to European Amphibian Biodiversity (RACE) tým byl vytvořen v roce 2009, kdy bylo již zcela zřejmé, že patogen *Bd* představuje vážné ohrožení obojživelníků v Evropě. Cílem intenzivního výzkumu bylo: (i) zjištění míry rizika pro evropské druhy a (ii) zavedení prvních celoevropských pokusů o snížení dopadů nákazy.

RACE tým využil data z terénních sběrů a sekvenování pomocí metody next-generation sequencing k identifikaci jednotlivých linií *Bd* přítomných v Evropě. Dále studoval možné přenašeče nemoci, její šíření a podmínky prostředí, které mají vliv na závažnost choroby. Celkem bylo v rámci tohoto projektu prostudováno 226 lokalit ve 12 zemích (<https://www.biodiversa.eu/2022/11/01/race/>) a zjištěné údaje umožnily posouzení rizika. Do intenzivního monitoringu byla zapojena rovněž ČR, prostřednictvím V. Baláže (VETUNI Brno), J. Vojara a P. Civiše (ČZU Praha). RACE také vyvinul mapovací nástroje, pomocí kterých je možné sledovat šíření choroby, a protokoly dezinfekce. Značné úsilí bylo věnováno komunikaci s politickými činiteli, od místní až po evropskou úroveň, ve snaze využít výstupy projektu a zajistit aplikaci vhodných regionálních i mezinárodních opatření. Získané zkušenosti byly dále využity pro návrh opatření v souvislosti s následně objeveným patogenem *Bsal*. Jednalo se tak o první SVV v rámci infekčních nákaz obojživelníků.

Evropský systém včasného varování v souvislosti s *Bsal*

Velmi záhy po objevení patogenu *Bsal*, a jeho vážných negativních dopadů na ocasaté obojživelníky v Evropě, byl vytvořen evropský SVV, jehož cílem bylo: (i) stanovit rozšíření patogenu v Evropě, (ii) vytvořit nástroj umožňující včasné varování v případě výskytu nákazy, (iii) vyhotovit krátkodobý plán opatření pro případ výskytu patogenu v daném území a v návaznosti (iv) nastínit dlouhodobou koncepci řešení (Stark et al. 2018). U sesterské chytridiomycety *Bd* byl SVV zaveden se značným zpožděním, což vedlo k poklesu a vymírání populací i celých druhů (Scheele et al. 2014). Prvním krokem je stanovit ohlašovací místa, kde se nahláší podezřelé nálezy a úhyny obojživelníků. V Evropě byla taková místa v souvislosti s patogenem *Bsal* zřízena místa v Belgii, Francii, Itálii, Lucembursku, Německu, Nizozemsku, Rakousku, Španělsku a Velké Británii. Následně probíhá odběr vzorků a určení příčiny úhynu.

Za tímto účelem byla vytvořena internetová stránka www.BsalEurope.com. Poskytuje základní informace o patogenu *Bsal* včetně aktuálního rozšíření. Sekce „Public Awareness Material“ obsahuje edukační videa a informační letáky zaměřené na symptomy nemoci, diagnózu onemocnění, ošetřování napadených jedinců i prostředky prevence v chovech či ve volné přírodě. Všechny materiály jsou v angličtině, některé i v dalších světových jazycích. Součástí stránek je záložka „Report cases“, kde lze nahlášovat nálezy podezřelých jedinců. Obsahuje rovněž odkazy na národní koordinátory („National Hotlines“), kde by měly být v budoucnu umístěny kontakty i za ČR (ČZU i VFU). V rámci záložky „Diagnostic Centres“ jsou uvedeny evropské laboratoře schopné diagnostikovat patogen *Bsal*. Podmínkou zahrnutí do této sítě bylo důsledné prověření schopnosti laboratoří patogen spolehlivě detekovat. Laboratoř v rámci VFU Brno (kontaktní osoba V. Baláž) je součástí sítě 16 laboratoří ve 12 zemích Evropy. Výše uvedené

internetové stránky se staly inspirací pro vytvoření obdobných stránek v rámci tohoto projektu <https://amphidis.fzp.czu.cz/cs> (blíže Kap. 6).

Obr. 6: PrintScreen titulní strany (vlevo) stránek www.BsalEurope.com. Vpravo QR kód (vpravo) odkazující na jeden z letáků zaměřených na hygienická pravidla při práci v terénu.



Monitoring patogenů a nákaz

Monitoring patogenů i jejich hostitelů je nedílnou součástí SVV, provádí se v rámci prevence i během realizace zmírňujících opatření včetně zjišťování jejich účinnosti. **Aktivní** monitoring představuje cílené sledování jedinců či populací včetně těch bez příznaků (preventivní charakter), zatímco **pasivní** monitoring se týká pouze jedinců se symptomy či šetření uhynulých zvířat (reaktivní opatření). Oba typy monitoringu mají svůj význam, výhody i nevýhody.

Pasivní monitoring se typicky provádí hlášením pozorovaných podezřelých případů (jedinců se symptomy či uhynulých zvířat) na regionální horkou linku ustanovenou v rámci systému včasného varování. Pozorovateli mohou být profesionální ochránci přírody, zoologové i laici. Výhodou je nízká finanční náročnost. Zejména při zapojení veřejnosti může být prováděn ve velkém měřítku. Omezující může být nízká pravděpodobnost zjištění některých obojživelníků, resp. jejich skrytý způsob života, jako je tomu u řady ocasatých. Svou roli hraje také schopnost pozorovatelů identifikovat nákazu (význam osvěty) a pravděpodobnost, že všechna zjištěná nemocná zvířata budou nahlášena příslušnému orgánu. Pasivní sledování se v současné době jeví jako nejrealnější přístup k odhalování výskytu ohnisek nákaz v Evropě, přinejmenším u druhů s velkým areálem rozšíření (EFSA 2018). Nedávno byl zahájen pasivní dohled nad nákazami obojživelníků na národní úrovni v Belgii, Francii, Německu, Itálii, Nizozemsku, Španělsku a Švýcarsku. Již od roku 1989 probíhá takový monitoring ve Spojeném království (Lawson et al. 2015). Pro zavedení pasivního monitoringu je vhodné:

- Podávat časté informace co nejširšímu spektru veřejnosti (sociální sítě, místní prezentace, televize, rádio, tisk atd.).
- Legálně umožnit sběr mrtvých ocasatých obojživelníků a stěrů za účelem monitoringu.
- Poskytnout laboratořím, institucím a centrálním organizacím dostatečný a dlouhodobý rozpočet pro sběr a analýzu mrtvých ocasatých obojživelníků a odebraných vzorků.
- Poskytovat zpětnou vazbu lidem, kteří ohlásili nález mrtvých jedinců nebo poskytli vzorky.

Aktivní monitoring. Celoevropský systém aktivního monitoringu by byl spolehlivým způsobem zjištění nákaz, ovšem finančně velmi nákladným. Reálnější je zaměřit se na lokality, kde již bylo zjištěno ohnisko nákazy nebo poklesy početních stavů. Takový monitoring proběhl v Rakousku, Belgii, Chorvatsku, ČR, Francii, Německu, Portugalsku, Slovinsku, Španělsku, Švýcarsku, Nizozemsku a Spojeném království (EFSA 2018). Nabízí se zapojení i širší veřejnosti, přičemž takové akce mohou být koncipovány jako projekty občanské vědy (Dickinson et al. 2012). Zásadní je dodržovat veškerá hygienická opatření. Se vzrůstajícím počtem zapojených subjektů se totiž zvyšuje riziko šíření patogenů. Základní aktivní monitoring v ideálním případě obsahuje:

- Mapovací síť pokrývající území státu, v rámci které jsou pravidelně sledovány všechny ochranářské jednotky (druhy, poddruhy, genetické linie) ohrožených obojživelníků s dostatečnou frekvencí a intenzitou v průběhu několika let. Dlouhodobý monitoring je klíčový, pokud chceme zaznamenat změny velikosti populací v čase.
- Národní organizaci, která sbírá, analyzuje a ověřuje sebraná data, sleduje trendy a poskytuje zpětnou vazbu vládě. Tato organizace je jako první schopná zachytit nákazu a měla by být součástí SVV.

Screening v chovech

Samotný zákaz obchodu s obojživelníky není schopen zavlečení nákaz zabránit, jelikož se tím zvýší objem obchodu nelegálního, který zůstává mimo kontrolu (viz výše). Kromě samotného obchodu s obojživelníky dochází k jejich vzájemné výměně mezi chovateli. Tyto přesuny jsou zcela mimo kontrolu. Navíc některé patogeny se již v evropských chovech obojživelníků prokazatelně vyskytují. Pravděpodobnost zachytu se v případě přítomnosti patogenu obecně zvyšuje s počtem testovaných jedinců. Stoupá tak význam intenzivního screeningu (preventivní testování na přítomnost patogenu), jako tomu bylo např. v Německu (Sabino-Pinto et al. 2018) či ve Francii (Marquis et al. 2019). Pro další opatření je totiž nezbytné vědět, zdali a v jakém rozsahu se v daném území patogen či nákaza vyskytuje. Na základě odhadu počtu chovatelů obojživelníků a počtu obojživelníků v zájmových chovech by celkové počáteční náklady na screening *Bsal* v Evropě byly výrazně nižší než jeden milion EUR (Thomas et al. 2019). Výhodou jsou tak poměrně nízké náklady, nevýhodou nedostatečné informace o chovech a neochota některých chovatelů nechat jedince testovat (často v případě nelegálně držených jedinců nebo neochoty testování platit).

Používané diagnostické metody

Klíčová je rovněž citlivá diagnostická technika použitá pro průkaz patogenu, která vykazuje vysokou mezilaboratorní reprodukovatelnost výsledků. Pro detekci *Bd* byl vyvinut citlivý a specifický test s mezilaboratorní reprodukovatelností (Boyle et al. 2004). V případě *Bsal* spočívá v kvantifikaci ekvivalentů genomu (GE) *Bsal* v neinvazivně odebraných kožních stěrech (Blooi et al. 2013, Thomas et al. 2018). Pro detekci patogenů lze využít řady diagnostických metod včetně nově se rozvíjejících. Jde např. o využití environmentální DNA (eDNA), tj. odběru vzorků prostředí (typicky vody), namísto klasických stěrů z pokožky obojživelníků. Podrobný rozbor těchto metod a postupů obsahuje metodika Baláže et al. (2023).

5.3 Preventivní opatření

Preventivní opatření jsou v boji proti patogenům a nákazám zdaleka nejefektivnější. Jejich základním cílem je předejít vniknutí patogenu do dané oblasti, resp. jeho zavlečení z chovů do volné přírody. Nejpropracovanější systém opatření byl vyhotoven pro patogen *Bsal* v Evropě (Thomas et al. 2019, Gilbert et al. 2020). Získané poznatky lze ale přenést a použít i v případech ochrany před dalšími patogeny či nákazami. V rámci prevence byla doposud použita níže uvedená opatření, zejména v souvislosti s patogeny *Bsal* a *Bd*.

Omezení obchodu a kontroly importů

Mezinárodní obchod s obojživelníky je hlavní příčinou šíření jejich nákaz (Kap. 4.2). V případě *Bsal* je zřejmé, že patogen byl do Evropy zavlečen společně s importy ocasatých obojživelníků z Asie (Kap. 3). Zákazy či omezení obchodu s obojživelníky, spolu s kontrolami na dovozních cestách, jsou tak nejúčinnějšími preventivními opatřeními. Součástí tohoto systému by měl být rovněž předimportní screening na přítomnost patogenů u obojživelníků určených k prodeji. Podrobnější rozbor právních nástrojů k regulaci obchodu na globální a evropské úrovni je uveden v Kap. 4.

- **Výhody:** získání přehledu o legálním dovozu; relativně nízké náklady související čistě se zavedením regulace.
- **Nevýhody:** největší efekt opatření je dosažen hlavně před zavlečením nákazy; omezení legálního obchodu podpoří nelegální importy, samo o sobě tak proti zavlečení patogenů nestačí; další náklady související s kontrolami (testy) a karanténou importovaných obojživelníků.

Dodržování hygienických pravidel (biosecurity)

Cílem je předejít šíření nákazy, zejména pokud již byla do chovu či do volné přírody zavlečena. Tato skutečnost nemusí být ovšem známá (asymptomatický výskyt, přehlédnutí jedinců se symptomy), proto je nutné hygienická pravidla dodržovat za všech okolností. To se týká jednak veškerých terénních prací (např. monitoring, výzkum, záchranné transfery), ale i chovů. V extrémních případech se taková opatření mohou týkat i veřejnosti (např. uzavření infikovaných oblastí). Problém však je s vymahatelností těchto opatření (absence právní opory) a jejich dodržováním.

Dezinfekce veškerého terénního oblečení a vybavení včetně např. automobilů některým z níže uvedených přípravků (Tab. 2) je základním opatřením. Široce používaným, vysoce účinným a relativně bezpečným dezinfekčním přípravkem je Virkon S (Pfizer Limited). Účinně lze použít také komerční dezinfekční prostředky na bázi ethanolu (a pravděpodobně i methanolu). Vysoce účinné je také Savo. Namáčení vybavení v 10% chloridu sodném po dobu 10 minut se jeví rovněž jako nadějně, navíc levné a bezpečné řešení. Doposud však nebyla dostatečně ověřena jeho účinnost. Bohužel běžně používaný a relativně levný dezinfekční prostředek, peroxid vodíku, není proti *Bsal* příliš účinný (Van Rooij et al. 2017), obdobně není účinné použití UV světla (Johnson et al. 2003).

Tab. 2: Přehled přípravků, jejich koncentrací a doporučené doby působení pro 100% usmrcení zoospor a sporangí *Bsal* (upraveno podle Van Rooij et al. 2017).

Desinfekční prostředek	Doporučená koncentrace	Minimální doba expozice (100% účinnost)
Ethanol (EtOH)	70%	30 s
Disolol®	neředěný	30 s
Hibiscrub®	0,25% / 0,5% / 0,75%	30 s
Chloramin-T®	0,5% / 1%	5 min. / 2 min.
Savo	4%	30 s
Kickstart®	0,05% / 0,1%	5 min. / 2 min.
Manganistan draselný (hypermangan, KMnO ₄)	1% 2%	10 min. 5 min.
Virkon S®	0,5% / 1%	5 min. / 2 min.
Dettol medical®	1:20	5 min.
Biocidal®	neředěný	30 s
Safe4®	neředěný	30 s
F 10®	1:100 / 1:250 / 1:500 / 1:1000	30 s
Chlorid sodný (kuchyňská sůl, NaCl)	10%	10 min.

Sušení (ideálně na přímém slunci) či tepelné ošetření je samo o sobě dostatečným ošetřením v případě patogenu *Bd*. V případě tepelného ošetření je doporučováno vystavení materiálů teplotě 60 °C po dobu 5 minut nebo 100 °C po dobu 1 minuty (Johnson et al. 2003). U sesterského patogenu *Bsal* bylo v rámci experimentu zjištěno, že jeho kultury byly usmrceny po pěti dnech vystavení při 25 °C (Bloo et al. 2015a). Není však dosud známo, do jaké míry jsou odolné encystované spory, který tento patogen rovněž vytváří (Stegen et al. 2017). Proto se sušení v případě ochrany před tímto patogenem jako jediný desinfekční postup nedoporučuje. Dále jsou uvedena další hygienická opatření, a to podle jejich využití v terénu nebo v chovech.

Terén. Důležité je omezení translokací obojživelníků mezi populacemi včetně reintrodukcí. Vypouštět obojživelníky chované v zajetí do volné přírody lze jen v případě schválených transferů a po vyšetření na přítomnost patogenů s negativním výsledkem (Mutschmann 2015). Při práci s obojživelníky v terénu by měli všichni používat jednorázové rukavice (Goka et al. 2009). Ty by měly být vyměňovány s každým manipulovaným jedincem, použité ukládány do plastových sáčků a bezpečně likvidovány.

Chovy. Všichni nově držení obojživelníci by měli být ponecháni v karanténě po dobu nejméně šesti až osmi týdnů (Mutschmann 2015). Noví jedinci by také měli být vyšetřeni na klinické příznaky nemoci. U jedinců, kteří uhynou během karantény, by měla být provedena pitva a histologické vyšetření, příp. detekce standardními molekulárními metodami (Baláž et al. 2023). Pro karanténu se doporučují plastové boxy z důvodu snadného čištění a dezinfekce. Dekontaminace by měla probíhat dvakrát týdně v autoklávu nebo pomocí vhodného přípravku (Tab. 2). Veškerý environmentální materiál, který byl ve styku s obojživelníky (půda a voda), by měl být považován za kontaminovaný, a proto musí být řádně zlikvidován jako biologicky nebezpečný odpad. Před touto likvidací je doporučeno zahřívání tohoto materiálu na 60 °C po dobu pěti minut (Young et al. 2007).

- **Výhody:** efektivita – snížení pravděpodobnosti vniknutí nákazy z chovů do volné přírody a mezi lokalitami ve volné přírodě, a tedy i snížení nákladů na eradikaci; zájem a motivace slušných chovatelů; dostupnost ověřených hygienických protokolů.
- **Nevýhody:** finanční a časová náročnost – vysoké nároky na chovatele; komplikace spojené s dodržováním pravidel v terénu – téměř nekontrolovatelné (význam samokontroly a vnitřní motivace); omezení terénních prací, např. nižší počet navštívených lokalit v rámci monitoringu či výzkumu kvůli dezinfekci materiálu atp.; chemické látky mohou kontaminovat prostředí či ohrozit zdraví lidí.

Zvýšení odolnosti obojživelníků

Odolnost hostitelů (obojživelníků) vůči patogenům lze teoreticky zvýšit vakcinací, pomocí probiotik nebo v rámci cílené selekce odolných jedinců.

Vakcinace. Ačkoliv některé pokusy vyvinout účinnou vakcínu proti patogenu *Bd* byly nadějně, nikoliv však přesvědčivé (Woodhams et al. 2011, McMahon et al. 2013), v případě *Bsal* byly zcela neúspěšné – vakcinace mloků nevedla k jejich odolnosti (Stegen et al. 2017). Důvodem je pravděpodobně to, že *Bsal* silně potlačuje imunitu u infikovaných hostitelů (Farrer et al. 2017). Vývoj vakcíny bývá nákladný. Z ekonomických důvodů je tak žádoucí, aby vakcína byla použitelná u vícero druhů. Odolnost jednotlivých druhů (ale i v rámci nich) vůči patogenům se však velmi liší. Kromě toho se ukázalo, že vytvoření vakcín proti plísním je mnohem obtížnější než proti virům nebo bakteriím, o čemž svědčí neexistence antimykotických vakcín pro zvířata. V neposlední řadě by očkování jedinců ve volné přírodě bylo logisticky velmi náročné až nereálné, zejména pokud by byly vyžadovány posilovací dávky (Garner et al. 2016, Canessa et al. 2018).

Bioaugmentace. Relativně nová strategie, jež využívá přirozené nepřátele patogenů. Vesměs jde o aplikaci probiotik či jiných prospěšných bakterií. Probiotika mohou být izolována z půdy, vody nebo pokožky obojživelníků (Loudon et al. 2014). Mechanismy, kterými bakterie podporují rezistenci vůči chorobám, nejsou dobře známy. Některé jsou schopné podporovat imunitu hostitele, další přímo soupeří s invazními patogeny (Woodhams et al. 2016). S různým úspěchem byla tato metoda vyzkoušena v případě patogenu *Bd* (Bletz et al. 2013). V případě *Bsal* bylo dosaženo odolnosti pouze opakovanou aplikací vysokých dávek probiotik *in vitro* (Bletz et al. 2018). Aplikace probiotik do prostředí má navíc svoje rizika s potenciálními dopady na celé ekosystémy (Garner et al. 2016, Frenken et al. 2019).

Zajímavé výsledky stran posílení odolnosti obojživelníků vůči patogenu *Bd* přinesl výzkum Greener et al. (2020). Záměrná infekce méně virulentním izolátem globální pandemické linie patogenu (*Bd*GPL) – *Bd*BE1 – ochránila jedince ropušky starostlivé (*Alytes obstetricans*) před virulentnějším izolátem téže linie *Bd*JEL423 a čolky mramorované (*Triturus marmoratus*) před patogenem *Bsal*. U mloků skvrnitých se tento efekt bohužel neprokázal.

Selektivní chov. Cílem je získání co nejvíce odolných jedinců šlechtěním (výběr a následná řízená reprodukce odolnějších jedinců) či metodami genetického inženýrství, což vyžaduje znalost faktorů zodpovědných za náchylnost/odolnost vůči patogenu. V tomto ohledu jsou ovšem limity jednak nedostatečné znalosti, etické důvody (potřeba značného počtu pokusných jedinců) a právní regulace (blíže k problematice např. Thomas et al. 2019).

Využití zvýšení odolnosti hostitelů vůči nákazám je z výše uvedených důvodů doposud velmi omezené a rovněž do budoucna najde uplatnění nejspíše jen při ochraně nejohroženějších druhů *in situ*.

5.4 Zmírňující opatření

Jde o nástroje zaváděné v případě zavlečení patogenu do volné přírody nebo jeho identifikace v chovech. Čím dříve jsou opatření aplikována, tím jsou efektivnější (účinnější a levnější). Systém zmírňujících opatření by proto měl být nastaven s předstihem (viz Kap. 5.4). Níže jsou představeny základní typy reaktivních opatření.

Dodržování hygienických pravidel (biosecurity)

Jde o zásadní nástroj prevence popsany výše, nicméně jeho význam stoupá v případě zavlečení nákazy. V tomto případě je hlavním cílem zabránit dalšímu šíření nákazy.

Léčba

Bd. Při léčbě infikovaných jedinců se používá **antimykotikum Sporanox** s účinnou látkou itrakonazol, jako lázeň o koncentraci zpravidla 0,01 % (Williams et al. 2002). Martel et al. (2011) úspěšně vyzkoušeli i další antimykotikum – vorikonazol. Koncentraci roztoku je třeba upravit s ohledem na rozdílnou citlivost druhů a jejich vývojových stádií, přičemž larvy a metamorfovaní jedinci jsou mnohem citlivější (Havlíková et al. 2015). Jako nadějný, ekonomicky výhodný a relativně dostupný postup je antimykotikum F10®, které lze aplikovat formou vodní lázně a při doporučených koncentracích nemá toxický dopad na obojživelníky (Van Rooij et al. 2017, De Jong et al. 2018). Součástí léčby je i **dezinfekce** kontaminovaného zařízení, vybavení, chovných nádob apod. (Van Rooij et al. 2017)¹¹, jež byla podrobně popsána v rámci preventivních opatření.

Chytridiomyceta *Bd* roste v širokém teplotním rozmezí od 4 do 25 °C, optimálně při teplotách 17 až 25 °C. Mimo toto teplotní optimum houba neroste nebo roste pomalu, infekce tak nemusí být smrtelná (Piotrowski et al. 2004). Toho se využívá při **termoléčbě**, kdy jsou infikovaní jedinci dočasně (zpravidla několik hodin) vystaveni vyšším teplotám okolo 37 °C (Woodhams et al. 2003)¹². Podáním antimykotik či zvýšením teploty lze vyléčit jedince spíše v časném stádiu nemoci a léčba nezaručuje rezistenci vůči opětovnému nakažení.

Bsal. Metody léčby nakažených jedinců jsou u tohoto patogenu prozatím v počátcích. Doporučované je dočasné (10 dní) vystavení infikovaných jedinců vyšším teplotám¹³ (okolo

¹¹ V citované publikaci je tabulka účinných koncentrací i časů nezbytných k ošetření. Důležitým je zjištění, že *Bd* je naprosto imunní vůči UV sterilizaci.

¹² Potvrzení schopnosti vysoké teploty potlačovat infekci přinesla také studie Forrest & Schlaepfer (2011), realizovaná v Arizoně v jezeře napájené geotermálním pramenem, a tudíž s proměnlivou teplotou vody. Tam, kde teplota vody dosahovala nad 30 °C, prevalence nákazy byla menší než 10 %, zatímco ve studené vodě do 15 °C bylo nakaženo 75–100 % jedinců. Autoři považují za pravděpodobné, že nakažení jedinci vyhledávají teplou vodu záměrně, aby se infekce zbavili.

¹³ U chytridiomycety byl experimentálně zjištěn její největší rozvoj v teplotním rozmezí 15–25 °C. Při vystavení vyšší či nižší teplotě docházelo ke zpomalení až zastavení šíření patogenu a k vyléčení všech experimentálně infikovaných jedinců mloka skvrnitého. Vyléčení však nezaručovalo rezistenci. V případě opětovného výskytu *Bsal* byli mloci znovu vystaveni teplotě 25 °C po dobu 10 dnů (Bloo et al. 2015a).

20–25 °C) ve vodní lázni obsahující kombinaci antimykotik vorikonazolu a polymyxinu E (Bloo et al. 2013, 2015a,b)¹⁴.

- **Výhody:** relativně vysoká úspěšnost v chovech, příp. v kontrolovaném prostředí, zejména u patogenu *Bd*.
- **Nevýhody:** prakticky nerealizovatelné ve volné přírodě (riziko zpětné infekce, pokud není patogen z prostředí zcela eliminován); nedostatek znalostí, zejména v případě *Bsal*.

Dekontaminace prostředí a manipulace s ním

Výše popsané postupy léčby nakažených jedinců se uplatní zejména v chovech. Podmínkou jejich aplikace u volně žijících jedinců nebo jedinců do volné přírody vypouštěných je eliminace patogenu v prostředí. Toho může být teoreticky dosaženo **biologickými** (např. predátory patogenu), **chemickými** (antimykotika, fungicidy, dezinfekce) nebo **fyzickými** (odvodnění a vysušení vodního biotopu, zvýšení teploty vody) **prostředky**. Cílem je omezit další šíření nákazy, snížit zastoupení patogenu, příp. jej eliminovat zcela, a tím zvýšit šanci na přežití obojživelníků (Woodhams et al. 2011). Je zřejmé, že se jedná o mimořádně obtížné opatření, jež bylo doposud použito zcela výjimečně. Dále je představeno několik možných postupů. Pro zvýšení účinnosti je důležité tyto vhodné způsoby kombinovat.

Biologický boj – predátoři patogenu. Dosavadní zkušenosti s mikropredátory chytridiomycety *Bd* (vodní bezobratlí) naznačují určitý potenciál jejich využití (Buck et al. 2011, Searle et al. 2013). Bylo zjištěno, že mikropredátoři odstraňující *Bd* přispívají k vytváření útočišť před chytridiomykózou. Situace v případě *Bsal* je složitější, protože tento patogen produkuje dva typy

Tato teplota se ovšem blíží kritickému teplotnímu maximu řady ocasatých (Bury 2008), termoléčba je tudíž druhově velmi omezená. Dynamika nemoci má řadu dalších ovlivňujících faktorů, patří mezi ně virulence patogenu, citlivost hostitele či faktory okolního prostředí (Bloo et al. 2015a). Nové poznatky navíc dokazují, že *Bsal* není tak citlivá na vyšší teploty, jak se původně předpokládalo (Martel et al. 2013). Na místech původního výskytu *Bsal* (Vietnam) byli infikováni jedinci pačolků rodu *Paramesotriton* a trnočolků rodu *Tylotriton* běžně nacházení ve vodních nádržích o teplotě vody mezi 20–25 °C, maximum 26,43 °C. Na infikovaných zvířatech nebyly nalezeny příznaky onemocnění, mohou tak sloužit jako rezervoáry patogenu v případě obchodu s těmito jedinci z volné přírody (Laking et al. 2017).

¹⁴ Existují tři hlavní způsoby používané pro testování interakcí mezi sloučeninami v antimykotické aktivitě: E-test (Kontoyiannis et al. 2000), „time-kill“ test (Keele et al. 2001) a diluční metody (Lewis et al. 2002). V laboratorních podmínkách dochází k inhibici růstu *Bsal* po aplikaci vorikonazolu, polymyxinu E, itraconazolu a terbinafinu, nikoli však florfenikolu. Synergické účinky mezi polymyxinem E a azolovými antimykotiky (vorikonazolem nebo itraconazolem) signifikantně snížily kombinované MIC nutné k inhibici růstu *Bsal*. Lokální léčba infikovaných mloků se samostatně podaným vorikonazolem nebo itraconazolem, či v kombinaci s polymyxinem E při teplotě okolo 15 °C během 10 dnů, snížila množství chytridiomycety, ale nedošlo k odstranění infekce. Lokální léčba infikovaných zvířat v kombinaci polymyxinu E a vorikonazolu při teplotě okolo 20 °C vedla k odstranění infekce. Tento léčebný protokol byl odzkoušen na přirozeně a experimentálně infikovaných mlocích, v obou případech s pozitivním výsledkem (Bloo et al. 2015a).

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

spor: spory a encystované zoospory. Ukázalo se, že encystované zoospory jsou vůči predaci odolnější (Stegen et al. 2017). Širšímu použití mikropredátorů chytridiomycet však brání nedostatek informací stran dopadů na trofické sítě v ekosystému (Thomas et al. 2019).

Fyzické manipulace s prostředím. Jde zejména o vysušování kontaminovaných vodních ploch, příp. o zvýšení teploty vody (termoléčba, viz výše). **Odvodňování a vysušování** je ovšem spojeno s mnoha komplikacemi – ohrožení jiných chráněných druhů, technické obtíže s odvodněním (pokud je např. vysoko hladina spodní vody je nutné stálé odčerpávání), šíření nákazy kontaminovanou vodou či obojživelníky unikajícími z nevhodného prostředí atp. Experimentální odvodnění a vysušení rybníka v kombinaci s aplikací itrakonazolu nevedlo k eliminaci *Bd*, ale pouze ke krátkodobému snížení intenzity infekce. K eradikaci patogenu došlo až při použití dezinfekce (Bosch et al. 2015). Odstranění encystovaných zoospor *Bsal*, které jsou mnohem odolnější vůči vyschnutí, bude ještě problematičtější. **Zvýšení teploty vody** prosvětlením porostů v okolí vodní plochy bude omezeno spíše na menší mělké a rychle se prohřívající vody s výskytem obojživelníků tolerantních vůči vyšším teplotám. Aby opatření bylo účinné, musela by teplota vody překonat hranici tolerance patogenů, tedy min. 25 °C (Blooi et al. 2015a), spíše však více. Taková teplota však zároveň ohrožuje naprostou většinu ocasatých obojživelníků.

Chemické prostředky. Aplikace dezinfekčního přípravku **Virkon S 1%** (se kterým experimentoval Bosch et al. 2015 na místech rozmnožování *Alytes muletensis*), nebo přidání **mořské soli** ke zvýšení salinity (Stockwell et al. 2015), dokázaly eliminovat či snížit infekci *Bd* ve vodním prostředí. Vytváření míst s vyšší salinitou (solných úkrytů) bylo navrženo jako proveditelná metoda ochrany při *Bd* infekci u žab, která je relativně levnější než jiné metody. Jejím principem je narušení růstu a pohyblivosti *Bd* (Stockwell et al. 2015). Bylo ale prokázáno, že má škodlivé účinky na vodní organismy (Denoël et al. 2010, Karraker & Gibbs 2011, Tollefsen et al. 2015). Fungicidy byly použity pouze v jednoduchých systémech s jedním hostitelem a v kontrolovaných izolovaných biotopech (Garner et al. 2016). Je třeba prokázat, zda by mohly fungovat i ve složitějších systémech. Předběžné studie ovšem naznačují, že fungicidy a dezinfekční prostředky jsou při omezování *Bsal* neúčinné (Van Rooij et al. 2017).

Použití antimykotik *in situ*. Dosud nebyly provedeny žádné studie, které by se zabývaly léčbou *in situ* obojživelníků infikovaných *Bsal*. Hudson et al. (2016), Geiger et al. (2017) a Cook et al. (2022) hodnotili dopad a proveditelnost léčby *Bd in situ* pomocí antimykotika itrakonazolu. Jejich výsledky ukázaly, že léčba snížila pravděpodobnost infekce *Bd* i mortalitu infikovaných zvířat. Jakmile však byla ukončena, veškeré výhody zmizely a infekce i mortalita se zvýšily na úroveň neléčených jedinců (Hudson et al. 2016, Geiger et al. 2017). V případě výsledků studie Cook et al. (2022) opakované přeléčení žab krátce po metamorfóze zvýšilo přežívání a stabilizovalo populaci.

Výsledky naznačují, že léčba infekce obecně nevyvolává ochranné imunitní reakce na *Bd* (Hudson et al. 2016) a pokud vychází z empirických údajů bez řádného posouzení toxicity, může mít dokonce škodlivé účinky na přežití druhu (Loyau et al. 2016). Tato metoda ošetření *in situ*, která je pracná a omezená na druhy obojživelníků, u nichž je míra zpětného odchyty relativně vysoká, by mohla být použita jako krátkodobý ochranný nástroj ke snížení úmrtnosti způsobené *Bd* nebo *Bsal* v obdobích vysokého rizika onemocnění nebo k získání času během propuknutí onemocnění, než se najde trvalejší řešení (Hudson et al. 2016, Geiger et al. 2017).

Účinná léčba populace mloků infikované *Bsal* by vyžadovala téměř úplné pokrytí populace v kombinaci se 100% účinnou léčbou k přerušení přenosu (Canessa et al. 2018). Nedostatečná účinnost by mohla mít nepříznivé následky: prodloužení přežívání infikovaných zvířat by zvýšilo potenciál šíření nemoci v rámci ohniskové populace i mimo ni. Opravdu účinné ošetření lze ovšem provést pouze *ex situ*, protože vyžaduje opakovanou a důslednou aplikaci buď pomocí relativně vysokých teplot (25 °C), nebo kombinací antimikrobiálních léčiv polymyxin E a vorikonazol (Blooi et al. 2015a,b). V praxi by to znamenalo odstranění všech infikovaných zvířat z jejich stanoviště a vypuštění po ošetření.

Bioaugmentace a vakcinace *in situ*. Možnosti těchto metod jsou popsány výše včetně důvodů, které doposud limitují jejich použití *ex situ*.

- **Výhody:** ve specifických případech (menší izolovaný biotop s jedním či několika málo nakaženými druhy) a při vhodné kombinaci metod potenciálně úspěšné.
- **Nevýhody:** nedostatek znalostí; poškození prostředí či jiných druhů včetně chráněných; časově, technicky a finančně náročné; odolnost encystovaných zoospor *Bsal* vůči vysušení; často neslučitelné s ekologickými nároky obojživelníků; závislé na dokonalém provedení.

Odstranění hostitelů nákazy z prostředí. Odstranění infikovaných nebo dokonce všech vnímavých hostitelů (včetně neinfikovaných) z populace by mohlo být strategií zmírnění dopadů, která stojí za prozkoumání. U vnímavých druhů bude eradikace *Bsal* pravděpodobně vyžadovat odstranění podstatné části (> 90 %) hostitelů i všech dalších druhů ve stejné oblasti, které působí jako přenašeči (Canessa et al. 2018). Navíc bylo prokázáno, že *Bsal* přetrvává v prostředí i bez přítomnosti hostitelů z řad obojživelníků. To znamená, že eradikace z lokality je nepravděpodobná, ačkoli pravděpodobnost se bude zvyšovat tím více, čím déle bude lokalita udržována bez obojživelníků. Nicméně i v případě, že eradikace nelze dosáhnout, odstraňování infikovaných zvířat snižuje pravděpodobnost šíření *Bsal* do sousedních populací (Canessa et al. 2018, Spitzen-van der Sluijs et al. 2018). Lze očekávat, že reakce veřejnosti na odstraňování hostitelů se bude lišit v závislosti na osudu odstraněných zvířat. Přemístění těchto živočichů na jiné lokality se důrazně nedoporučuje. Opětovné vysazení na původní lokalitě je přijatelné až poté, co se prokáže eradikace *Bsal* po přiměřenou dobu. V opačném případě může dojít k novému vzplanutí infekce s pravděpodobností dalšího šíření do sousedních lokalit. Ačkoli utracení může být nejracionalnější možností a je přijímáno v programech OIE (WOAH) pro tlumení nákazy, je pravděpodobnější, že se setká s nežádoucími reakcemi veřejnosti ve srovnání s přemístěním zvířat do zajetí s následnou léčbou.

Vytváření překážek pro šíření patogenů. Jednoduché matematické modely naznačovaly, že *Bsal* se bude rychle šířit v homogenní krajině (Schmidt et al. 2017), což se však v reálu nepotvrdilo. Ve skutečnosti existují náznaky, že přirozené (autonomní) šíření *Bsal* je relativně pomalé a může být přerušeno bariérami, které omezují šíření infikovaných obojživelníků, jako jsou řeky, dálnice, nevhodná stanoviště a ploty (Spitzen-van der Sluijs et al. 2018). Místní pohyb infikovaných hostitelů je pravděpodobně rozhodující pro šíření *Bsal* na krátké vzdálenosti, zatímco přenos zprostředkovaný člověkem bude nejdůležitější cestou šíření na vzdálená místa. Pochopení základů rozšiřování areálu by nabídlo možnosti pro vývoj strategií založených na instalaci bariér kolem ohnisek. Taková opatření mohou být účinná v krátkodobém horizontu a mohla by

významně snížit riziko šíření *Bsal*, ale jejich účinnost ve střednědobém až dlouhodobém horizontu je nejasná. Nicméně přetrvávání neinfikované populace mloků po dobu více než 8 let pouze 800 m od ohniska výskytu *Bsal* naznačuje, že management krajiny, využívající stávajících bariér a vytváření nových, může být relativně levnou možností, kterou stojí za to prozkoumat.

Záchranné chovy. Introdukce za účelem obnovy původních populací vyžaduje předchozí úspěšné odstranění *Bsal* z volné přírody (IUCN 2013, Muths & McCallum 2016). Postižené hostitelské druhy by mohly být reintrodukovány buď pomocí přenosů z jiných volně žijících populací, nebo s využitím jedinců, kteří byli odchyceni a ošetřeni nebo odchováni v zajetí. Posílení existujících populací může být realizováno v kombinaci s dalšími zmírňujícími opatřeními, která zvyšují odolnost hostitelů vůči infekci nebo nemoci. Mezi radikálnější postupy může patřit také asistovaný přesun ohrožených druhů do oblastí s nižším rizikem patogenů (Gagliardo et al. 2008). Zkušenosti ukazují, že snahy o založení záchranných chovů by měly být zahájeny již na počátku procesu zmírnění dopadů nákazy (Martin et al. 2012). Vzhledem k omezeným zdrojům je nevyhnutelné stanovit priority a vymezit jednotky ochrany (od úrovně populací až po druhy).

Zakládání záchranných chovů je v současné době jediným účinným opatřením pro zachování druhů s malým areálem rozšíření nebo jinak cenných populací po invazi *Bsal*. Ačkoli se jedná o proveditelnou možnost, každá taková akce by měla být od počátku pečlivě plánována a prováděna s jasným ohledem na budoucí možnosti reintrodukce (Canessa et al. 2016). To zahrnuje vysokou úroveň ochrany zvířat před patogeny, aby se zabránilo nákaze a šíření patogenu společně s hostiteli či jejich potomky, jako v případě ropušek *Alytes muletensis* na Mallorce infikovaných *Bd* (Walker et al. 2008). Chovy v zajetí musí mít propracovaný genetický a veterinární management – což často vyžaduje zapojení více center – a musí být provozovány v souladu s pokyny IUCN (Pessier et al. 2014). Protokoly pro takové záchranné chovy a zdroje by měly být zavedeny pro všechny vysoce rizikové populace nebo druhy. Odborné znalosti pro udržování a chov evropských ocasatých jsou široce dostupné, i když se do značné míry omezují na soukromý sektor. Užitečná by tak byla širší spolupráce s profesními organizacemi (zoologické zahrady, akvária) a výzkumnými institucemi (Pasmans et al. 2017).

Reintrodukce. Pro úspěšnou reintrodukci je klíčové pochopení biologie hostitele a patogenu (Garner et al. 2016). Pokusy o reintrodukci populací obojživelníků postižených chytridiomykózou byly provedeny v Evropě, Severní Americe, Karibiku a v Africe, ale žádný z nich nevedl k úspěšnému výsledku (Alfan et al. 2011, Woodhams et al. 2011, Muths et al. 2014). Většinou došlo k opětovnému výskytu chytridiomykózy u reintrodukovaných druhů, přičemž příčina selhání nebyla jasně stanovena (Muths et al. 2014). Je možné, že v některých případech se chytridiomykóza projevuje pouze jako důsledek oslabení obojživelníků jinými ohrožujícími vlivy a zaměření všech opatření pouze na chytridiomyceta může být nesprávné (Fellers et al. 2007, Alfan et al. 2011). Neschopnost jednoznačně identifikovat příčinu ukazuje relativní nezralost vědy v rámci reintrodukcí obojživelníků (IUCN 2013).

5.5 Akční plány

Ke zmírnění dopadů nálezů v přírodě je možné využít řady opatření, jež mají svoje výhody i nevýhody (viz výše). Je vhodné jednotlivé metody kombinovat (Mutschmann 2015) a mít připraven plán akce pro případ zavedení patogenu. Zdaleka nejpropracovanějším je v tomto ohledu **evropský akční plán** (AP) pro boj s patogenem *Bsal* (Gilbert et al. 2020), dostupný na internetových stránkách BsalEurope (<http://bsaleurope.com/>). Ten mj. předpokládá vytváření národních AP a navrhuje jejich strukturu i náležitosti, jež jsou dále stručně popsány. Rámec národního akčního plánu (NAP) je představen v Kap. 6.

Cíle, obsah a východiska národních AP

Hlavní cíle: (i) minimalizovat risk dalšího rozšíření patogenu, (ii) jeho izolace nebo vymýcení a (iii) záchrana nakažené populace. Každý národní AP by měl **obsahovat** v dané zemi reálná, resp. realizovatelná opatření (přehled viz Kap. 5.3 a 5.4), stanovené priority a role jednotlivých subjektů.

Stanovení priorit. Ještě před propuknutím nákazy je zapotřebí určit, které druhy, poddruhy a mezidruhové linie vyskytující se na daném území (ochranné jednotky) budou v případě nákazy prioritně chráněny. Zpravidla půjde o území s výskytem ohrožených druhů, například endemitů. To umožňuje cílenou a rychlou odpověď při výskytu nákazy (Canessa et al. 2018).

Mezioborový přístup. Znalost biologie a ekologie obojživelníků i jejich nemocí je naprosto zásadní. Nicméně některá opatření, zejména ty, která se týkají dezinfekce či jiných zásahů do prostředí (Kap. 5.3), vyžadují vhléd i dalších odborníků, např. hydrologů, ekotoxikologů, právníků a úředníků. Je dobré současně zapojit do akce místní, národní i mezinárodní komunitu odborníků a udržet silnou vazbu mezi vedením projektu a výzkumem.

Důslednost. V případě eradikace nebezpečných nálezů obojživelníků je třeba reagovat rychle a tvrdě, podobně jako u nálezů hospodářských zvířat a lidí (Martel et al. 2020). Zároveň je možné, že některá opatření stran managementu lokality mohou trvat i několik let kvůli vysoké perzistenci *Bsal* v prostředí (Stegen et al. 2017).

Doporučené kroky před zavedením *Bsal*

- Omezení dálkového transportu patogenu lidskou činností.
- Snížení rizika šíření patogenu v krajině.
- Posílení odolnosti ohrožených druhů.

Riziko, resp. intenzita transportů patogenu na velké vzdálenosti se dá snížit legislativně – omezit, regulovat a kontrolovat obchod se zvířaty, která mají potenciál být zdroji nákazy. Rozšiřování nákazy nesmí lidi podporovat svými aktivitami – přenosem kontaminovaných materiálů, vybavení, oblečení nebo přímo zvířat. Samovolné šíření nákazy v populaci, lze omezit zvýšením strukturovanosti prostoru – bariérami. Poslední, avšak nejsložitější a potenciálně neúčinnější možností je posílení obranyschopnosti populací na principu vakcinace, což je v případě obojživelníků dosud nepříliš reálné (Kap. 5.3).

Doporučené kroky pro po vypuknutí nákazy *Bsal*

- Identifikace nakažené oblasti (aktivní a pasivní monitoring) a její izolace.
- Management nakažených jedinců (odstranění × léčba a chov v zajetí).
- Management prostředí (biologické, chemické a fyzické prostředky).
- Dodržování hygienických pravidel při pohybu lidí a materiálu (dezinfekce aj., Kap. 5.3).

Identifikace, monitoring a izolace nakažené oblasti. Jde o aktivní monitoring přítomnosti patogenu v bezprostředním okolí nálezu (v koncentrických kruzích od místa nálezu) pomocí analýz kožních stěrů z obojživelníků, doplněný o analýzy eDNA (z vody či půdy, blíže v metodice Baláže et al. 2023). Velikost okolí, ve které bude probíhat aktivní monitoring, se bude měnit podle prostupnosti prostředí pro hostitele. Vždy je lepší být opatrnější a zvolit větší rozsah území. To samé platí pro pasivní monitoring, který se týká širšího okolí. Počet vzorků by měl být dostatečný pro vysokou míru spolehlivosti výsledků, především pokud je předpokládána nízká prevalence. Je velmi důležité skutečně potvrdit přítomnost patogenu *Bsal* na lokalitě dříve, než budou provedena jakákoliv další opatření. Aby se zabránilo falešným pozitivitám, doporučuje se brát 1.0 genetický ekvivalent jako detekční limit běžně užívané metody duplex real-time PCR (Thomas et al. 2018). Molekulární metody je v případě úhynů vhodné doplnit histologickým nebo histopatologickým vyšetřením.

I vizuálně zdravá zvířata mohou být přenašeči *Bsal*, především v raných stádiích infekce nebo u tolerantních druhů. To je důležité mít na paměti především při transferu nebo reintrodukcii jedinců. V takovém případě se doporučuje karanténa po dobu šesti týdnů následovaná vyšetřením na přítomnost *Bsal*. Nicméně v některých případech může být přenášeno množství patogenu velmi malé, čímž se snižuje šance spolehlivého zachytu *Bsal* pomocí dostupných metod (detekce DNA z povrchu zvířete). Vyřešení tohoto problému by vyžadovalo vývoj nových diagnostických postupů, které by se doplňovaly se stávajícími. Díky sezónnosti nákazy a přežívání patogenu v prostředí by měl monitoring probíhat alespoň do dalšího roku po objevení nákazy (Bozzuto & Canessa 2019).

Oblast, kde se patogen vyskytuje, je nutné důsledně **izolovat**, aby nedošlo k jeho dalšímu šíření. Slouží k tomu nastavení bezpečnostních pravidel včetně omezení přístupu nebo fyzické ohrazení pomocí dočasných zábran/bariér.

Management nakažených jedinců. V zásadě jsou možné dva přístupy – eliminace jedinců nebo jejich léčba. Neexistuje jednotné optimální pravidlo ohledně toho, které druhy odstraňovat, omezovat či provádět jejich léčbu. Odstranit je třeba maximální počet jedinců všech druhů, které mohou být potenciálními hostiteli, rezervoáry nebo přenašeči *Bsal* (Canessa et al. 2019). Je ale třeba zvážit dopad potenciálního odstranění druhu z ekosystému. Celý proces musí proběhnout rychle a intenzivně, aby se minimalizovala šance šíření patogenu. Zárok je třeba provádět opakovaně v průběhu roku (Bozzuto & Canessa 2019). Při odstranění hostitele musí být lokalita dokonale izolována od okolních biotopů, aby se zabránilo opětovné kolonizaci.

V případě **léčby** se tato provádí mimo zasaženou lokalitu. Tato ochrana *ex situ* se kvůli své náročnosti bude týkat zejména vysoce ohrožených druhů, které je současně možné vyléčit. Principem je sběr jedinců z lokality, jejich přeléčení a následný chov *ex situ*, případně jejich vypuštění do prostředí bez přítomnosti patogenu.

Management prostředí. Týká se zasažené lokality. Spory *Bsal* přežívají ve vodě: lze zvážit opatrné odstranění nebo “přeléčení” vody (viz dále). Není možné jednoduše vypustit vodní plochu dolů po proudu, protože tím by mohlo dojít k rozšíření spor na další území. Vodu lze nechat přirozeně vyschnout či odebrat, přefiltrat (dezinfikovat chemicky či fyzikálně pomocí vysoké teploty) a vrátit. Vysušení lokality může vést k tomu, že obojživelníci budou mít snahu jí opouštět. Proto je nutností její dokonalé ohrazení.

Je třeba si uvědomit, že jde o drastická opatření s nejistým úspěchem. Recentní příklad zavlečení patogenu *Bsal* z chovů prostřednictvím vypuštěním nakažených jedinců do volné přírody popisuje Martel et al. (2020). V březnu 2020 byl tento patogen detekován v severním Španělsku (Katalánsku) v oblasti Montnegre i el Corredor Natural Park v rámci kampaně snažící se o eradikaci místně nepůvodního druhů *Triturus anatolicus* a *Ichthyosaura alpestris*. Následovaly nálezy mrtvých jedinců původního druhu *Triturus marmoratus* v květnu 2018. Celkem bylo testováno 690 jedinců ocasatých obojživelníků a 184 jedinců žab, jež mohou potenciálně sloužit jako vektor nemoci. Aplikována byla celá řada opatření od přísného dodržování hygienických pravidel, přes dezinfekci biotopu, jeho ohraničení zábranami, testování jedinců atd. (Martel et al. 2020). Opatření si vyžádala zapojení místních úřadů a intenzivní spolupráci s vědci a ochranáři. Přes všechna i poměrně drastická opatření je velmi pravděpodobné, že se patogen nepodařilo z postižené lokality eliminovat.

Plán opatření by měl být přizpůsobený tomu, jak riziková je daná oblast pro propuknutí nákazy. Níže je příklad pro každou kategorii. Tyto podklady byly využity pro přípravu konkrétních protokolů v rámci NAP pro řešení nákaz v chovech (Kap. 6.6) a ve volné přírodě (Kap. 6.7).

Vysoké riziko

- Zavedení bezpečnostních opatření k prevenci zavlečení patogenu lidskou činností.
- Zajištění správného managementu lokality.
- Zavedení dlouhodobého sledování populace.
- Zavedení aktivního a pasivního monitoringu.
- Příprava a zahájení opatření *ex situ*.

Střední riziko

- Zavedení bezpečnostních opatření k prevenci zavlečení patogenu lidskou činností.
- Zajištění správného managementu lokality.
- Zavedení pasivního monitoringu.
- Zavedení dlouhodobého sledování populace, alespoň na lokalitách s velkou pravděpodobností zavlečení nákazy.
- Příprava opatření *ex situ*.

Nízké riziko

- Zavedení bezpečnostních opatření k prevenci zavlečení patogenu lidskou činností.
- Zajištění správného managementu lokality.
- Zavedení pasivního monitoringu, alespoň na lokalitách s velkou pravděpodobností zavlečení nákazy.

6. Návrh systému opatření pro Českou republiku

Obsahem této části je konkrétní návrh systému opatření pro ochranu obojživelníků v souvislosti s nákazami v ČR, resp. **národní akční plán** (NAP), který vychází z doporučení evropského AP pro patogen *Bsal* (Gilbert et al. 2020), dostupného na internetových stránkách BsalEurope (<http://bsaleurope.com/>). Předkládaný NAP je modifikovaný pro podmínky ČR a současně rozšířen i na další patogeny či nákazy potenciálně nebezpečné pro naše obojživelníky. V rámci tvorby AP je zásadní stanovit **prioritní druhy** (dle jejich ohroženosti a citlivosti vůči patogenům) a **oblasti**, resp. ochrannářské jednotky (viz Kap. 5.4). Nezbytné je ujasnění role a odpovědnosti jednotlivých subjektů, vycházející mj. z právních předpisů. Každý NAP by měl obsahovat v dané zemi reálná, resp. realizovatelná opatření, která se liší podle toho, v jaké fázi vůči naze se právě nacházíme:

- **Fáze před zavlečením nákazy** (preventivní opatření, Kap. 5.3).
- **Zavlečení nákazy – epidemická fáze** (zmírňující a preventivní opatření, Kap. 5.3 a 5.4).
- **Endemická fáze – ustálení** (zmírňující a preventivní opatření, Kap. 5.3 a 5.4).

Dále jsou stručně shrnuty cíle, obsah a struktura navrhovaného NAP.

Cíle

- Minimalizovat riziko zavlečení a rozšíření patogenů do ČR.
- V případě výskytu izolace nebo vymýcení patogenů.
- Záchrana nakažené populace.

Obsah a struktura

- Vymezení řešených patogenů a nákaz (Kap. 6.1).
- Vymezení prioritních druhů obojživelníků (Kap. 6.2).
- Vymezení prioritních oblastí (Kap. 6.3).
- Úlohy a kompetence dotčených subjektů (Kap. 6.4).
- Systém včasného varování (Kap. 6.5).
- Protokoly reakcí na patogeny v chovech a při obchodu s obojživelníky (Kap. 6.6).
- Protokoly reakcí na patogeny ve volné přírodě (Kap. 6.7).

NÁRODNÍ AKČNÍ PLÁN V SOUVISLOSTI S NÁKAZAMI OBOJŽIVELNÍKŮ (RÁMEC)

6.1 Vymezení řešených patogenů a nákaz

NAP řeší patogeny, vůči kterým jsou naše druhy **citlivé** (snadno se infikují, časté úhyny) nebo **vnímavé** (mohou se nakazit, dopad onemocnění je však různý a závisí na řadě faktorů, např. počáteční míře infekce, podmínkách prostředí, Příloha 2). Současné tyto nákazy ohrožují podstatnou část našich druhů. **V rámci tohoto NAP jsou řešeny patogeny:**

- ***Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)*** – vnímavá je většina našich druhů, citlivý žádný.
- ***B. salamandrivorans (Bsal)*** – citliví jsou všichni zástupci ocasatých, ostatní druhy jsou potenciální přenašeči.
- **Ranaviry** – citliví jsou skokani rodů *Rana* i *Pelophylax* a také blatnice skvrnitá, většina ostatních druhů je vnímavých.

6.2 Vymezení prioritních druhů obojživelníků

Volně žijící druhy

V rámci NAP je třeba řešit problematiku nákaz u **všech** našich volně žijících druhů obojživelníků. Většina z nich je totiž citlivá vůči některému z řešených patogenů (Kap. 6.1, Příloha 2), navíc odolnější druhy mohou sloužit jako přenašeči. V případě rozsáhlejšího výskytu nákaz je třeba věnovat pozornost zejména citlivým druhům vůči patogenu *Bsal*, čili všem zástupcům ocasatých. V rámci nich jsou pak na území ČR ohroženy především ty druhy, jenž u nás mají okraj svého areálu rozšíření, tj. čolek hranatý, č. karpatský, č. dunajský a č. dravý. Nicméně i v rámci citlivých druhů vůči *Bsal* existují rozdíly, např. mortalita čolků velkých záleží na počáteční intenzitě nákazy a existuje šance na jejich přeléčení, zatímco u mloků skvrnitých je mortalita 100% (Stegen et al. 2017). Při řešení nákaz je tedy nutné se věnovat všem našim druhům. Pokud toto není z různých důvodů možné, je třeba přednostní ochrana následujících druhů (v uvedeném pořadí):

- **nejvyšší priorita** – mlok skvrnitý, čolek hranatý, č. karpatský, č. dunajský a č. dravý
- **vysoká priorita** – všichni ocasatí (mlok + všichni čolci)
- **prioritní druhy** – všechny druhy citlivé vůči *Bd*, *Bsal* a ranavirům (Příloha 2).

Druhy chované v zajetí

S ohledem na reálné riziko zavlečení nákaz z chovů do volné přírody je třeba sledovat jejich výskyt u **všech druhů**. Nebezpečný patogen *Bsal* totiž mohou přenášet nejen ocasatí obojživelníci, ale i ostatní zástupci obojživelníků (Stegen et al. 2017).

6.3 Vymezení prioritních oblastí

Jde o vymezení oblastí, kde je třeba provádět aktivní i pasivní monitoring obojživelníků ve volné přírodě, resp. screening v chovech. Oba typy monitoringu mají své výhody i omezení, např. aktivní monitoring není možné pro jeho náročnost provádět v rámci celé naší republiky (Kap. 5.2).

- **Celé území ČR – pasivní monitoring**, oportunistické hlášení jedinců se symptomy, příp. nálezů uhynulých jedinců, jakožto součást systému včasného varování (Kap. 6.5).
- **Lokality s výskytem druhů s nejvyšší prioritou** (viz Kap. 6.2) – **aktivní monitoring**, tj. sledování přítomnosti a početnosti obojživelníků, příp. úhynů či symptomatických jedinců. U většiny čolků s nejvyšší prioritou probíhá jejich pravidelný monitoring, jakožto předmětů ochrany v rámci EVL (zajišťuje AOPK, podrobnosti v Kap. 6.5). Krom toho je takto monitorován ještě čolek velký (vysoce prioritní druh), z žab obě kuňky (prioritní druhy). Dva druhy s nejvyšší prioritou, pro které není zajišťován pravidelný monitoring, jsou **mlok skvrnitý** a **čolek hranatý**.
- **Screening v chovech a na dovozních cestách**. S ohledem na riziko přenosu patogenů (zejména chytridiomycet) do volné přírody je vhodné provádět pravidelný screening (preventivní šetření na přítomnost nákaz) u všech jedinců v chovech. **Prioritně** je třeba nechat vyšetřit veškeré zjištěné úhyny, jedince se symptomy nákaz a dále všechny nově dovezená zvířata.

6.4 Vymezení a kompetence dotčených subjektů

Dále je uveden přehled subjektů, v jejichž kompetenci a možnostech je řešení nákaz obojživelníků v ČR včetně stručného uvedení jejich kompetencí či možných (Tab. 3).

Pracovní skupina. Při vypuknutí nákazy ve volné přírodě s vysokým stupněm rizika (úhyny druhů s nejvyšší prioritou v důsledku Bsal) je nezbytné okamžitě svolat pracovní skupinu složenou ze zástupců MŽP, AOPK, SVS (KVS), obcí, místně příslušného orgánu ochrany přírody na úrovni krajského úřadu, příp. RP AOPK či správy NP, akademických pracovníků (ČZU, VETUNI, kontakty viz Kap. 6.5), příp. dalších odborníků, a **aktivovat NAP**.

Zásadní subjekty, jako MŽP, AOPK, SVS/SVÚ by měly mít své zástupce vyčleněné s předstihem. Detailní postup a rozdělení činností proběhne na první schůzce. Koordinátorem bude zástupce MŽP nebo MŽP určená osoba. Pro aktivity související s likvidací nákazy musí být uvolněno dostatečné množství finančních prostředků i lidských kapacit.

Tab. 3: Přehled subjektů, v jejichž kompetenci a možnostech je řešení nákaz obojživelníků v ČR

Zkratka	Celý název	Působnost, kompetence, možnosti
MŽP	Ministerstvo životního prostředí	Nejvyšší orgán ochrany přírody; reporting, koordinace při aktivování NAP
AOPK ČR	Agentura ochrany přírody a krajiny	Podíl na přípravě a při aktivaci NAP, koordinace aktivního monitoringu, osvěta mezi mapovateli (dodržování hygienických pravidel při monitoringu a práci v terénu obecně)
ČIŽP	Česká inspekce životního prostředí	Kontroly importů, prodejců, burz, výstav, chovatelů
CS ČR	Celní správa ČR	Kontroly importů, prodejců, burz, výstav, chovatelů
SVS	Státní veterinární správa	Sdělují dovozní podmínky a postup v souladu se zák. č. 166/1999 Sb.
KVS	Krajská veterinární správa	Registrace karantény mloků (Caudata) dle rozhodnutí Komise (EU) č. 2018/320
SVÚ	Státní veterinární ústav	Spolupráce při přípravě NAP, provádění diagnostických testů.
KÚ	Krajské úřady	Kompetentní k ochraně zvláště chráněných druhů, udělování výjimek potřebných pro monitoring a sběr uhynulých či zraněných jedinců ZCHD (mimo NP, CHKO, NPP a NPR)
RP AOPK	Regionální pracoviště AOPK	Příslušné k výše jmenovaným činnostem na území CHKO (vyjma CHKO Labské pískovce a CHKO Šumava), NPR a NPP
NP	Národní parky	Správa NP je příslušná k výše jmenovaným činnostem na území NP
	Univerzity, vědecká pracoviště (ČZU, VETUNI, příp. další)	Ve spolupráci s dalšími subjekty příprava NAP, odborné vedení při jeho aktivaci, provádění detekcí, osvěta
	Komerční laboratoře	Provádění detekcí patogenů
ČHS	Česká herpetologická společnost	Odborný konzultant při přípravě a aktivaci NAP, osvěta, komunikace s veřejností
ZOO	Zoologické zahrady	Osvěta, záchranné chovy, ochrana <i>ex situ</i>
	Subjekty disponující deponačními nádržemi	Karanténa, léčba, chov <i>ex situ</i> atp.
	Obchodníci, dovozci obojživelníků	Spolupráce s příslušnými subjekty, nahlašování úhynů, pravidelný screening, dodržování právních předpisů a hygienických pravidel
	Soukromí chovatelé	Zapojení se do screeningu.
	Veřejnost	Zapojení se do pasivního monitoringu (hlášení nálezů)
	Biologové, výzkumníci	V rámci přírodovědných průzkumů zapojení se do aktivního i pasivního monitoringu; dodržování hygienických pravidel.

6.5 Systém včasného varování (SVV)

Systém včasného varování (SVV) je zásadním nástrojem pro rychlou detekci a reakci na jakýkoliv nebezpečný patogen (Kap. 5.2). SVV je založen na aktivním a pasivním monitoringu patogenů ve volné přírodě a screeningu jedinců v chovech. **Aktivní** monitoring představuje cílené sledování jedinců či populací včetně těch bez příznaků (preventivní charakter), zatímco **pasivní** monitoring se týká pouze jedinců se symptomy či šetření uhynulých zvířat (reaktivní opatření). **Screening v chovech** by měl být ideálně prováděn preventivně u všech jedinců, zcela nezbytné je testovat všechny dovezené jedince, zvířata se symptomy či úhyny. Aby byl SVV účinný, je důležité do něj zapojit co nejširší okruh subjektů včetně chovatelů a veřejnosti. Zásadní roli má v tomto ohledu **osvěta**. Pro komunikaci, hlášení nálezů i osvětu je vhodné založit tematické **internetové stránky**.

Aktivní monitoring

Měl by se týkat všech lokalit s výskytem druhů s nejvyšší prioritou (viz Kap. 6.2). Sleduje se přítomnost a početnost obojživelníků, příp. úhynů či symptomatických jedinců. U většiny čolků s nejvyšší prioritou (viz Kap. 6.2), vyjma č. hranatého, probíhá jejich pravidelný monitoring, jakožto předmětů ochrany v rámci EVL, který je koordinován AOPK ČR. Krom toho je takto monitorován čolek velký (vysoce prioritní druh), z žab obě kuňky (prioritní druhy). Mezi druhy s nejvyšší prioritou, které nejsou pravidelně monitorovány, náleží mlok skvrnitý a čolek hranatý.

Pravidelně jsou tak sledovány vybrané EVL, kde je předmětem ochrany druh uvedený v příloze II směrnice o stanovištích (Tab. 1), celkově jde o necelých 200 lokalit. Výsledky jsou zaznamenávány do NDOP AOPK ČR a následně vyhodnocovány v rámci pravidelného reportingu. Všichni monitorovatelé (pracovníci AOPK ČR a externisté) jsou informováni o potenciálním nebezpečí nálezů a hygienických pravidlech (v rámci setkání mapovatelů obojživelníků a plazů organizovaném AOPK ČR). Mapování výskytu obojživelníků probíhá i v širším kontextu veřejností, např. prostřednictvím aplikací BioLog či iNaturalist, což zvyšuje množství získávaných informací, ale na druhou stranu i riziko přenosu patogenů. Zásadní je proto osvěta široké veřejnosti stran dodržování hygienických pravidel.

Zhodnocení a návrhy: U většiny druhů s nejvyšší prioritou je rozsah aktivního monitoringu populací dostatečný a zajištěn organizačně i finančně. Sledovány jsou i některé další druhy (čolek velký a oba druhy kuněk). Není však zajištěn systematický monitoring mloka skvrnitého a čolka hranatého. Ten probíhá v současné době pouze v omezené míře a na základě dobrovolnosti. Zejména pro mloka by měly být stanoveny trvale monitorované lokality, především v blízkosti velkých měst, kde je riziko přenosu patogenu z chovů do volné přírody nejvyšší. Podobně v blízkosti hranic s Německem, neboť se výskyt nákazy potvrdil již v Bavorsku, necelých 200 km západně od našich hranic (Thein et al. 2020). Návrhem je stanovit alespoň 20 takových lokalit a zajistit prostředky i metodickou podporu pro tento monitoring. Odhad finanční náročnosti je v řádech nižších stovek tisíců Kč ročně.

Pasivní monitoring

Provádí se hlášením oportunisticky pozorovaných podezřelých případů (jedinců se symptomy i uhynulých zvířat) na zavedenou horkou linku (viz dále), příp. prostřednictvím aplikací BioLog či iNaturalist (viz dále). Pozorovateli mohou být profesionálové i laici. Výhodou je nízká finanční náročnost. Zejména při zapojení veřejnosti může být prováděn ve velkém měřítku. Podmínkou je ovšem osvěta a dodržování hygienických pravidel.

Zhodnocení a návrhy: zvýšit rozsah pasivního monitoringu v ČR širším zapojením veřejnosti prostřednictvím osvěty, zapojení sociálních sítí (Kap. 6.5). Umožnit sběr uhynulých jedinců zvláště chráněných druhů vybraným osobám na základě dohody dle § 56 odst. 5 zákona č. 114/1992 Sb.¹⁵). Rozšíření technik sběru vzorků nevyžadujících manipulaci s jedinci, např. využití eDNA (viz Baláž et al. 2023). Umožnění záznamu i negativních nálezů patogenů do NDOP.

¹⁵ Dle citovaného zákona je manipulace s jedinci zvláště chráněných druhů (ZCHD) zakázána, a to včetně mrtvých jedinců. Většina obojživelníků, druhy s nejvyšší a vysokou prioritou pak všechny, patří mezi ZCHD. Bez příslušné výjimky podle § 56 citovaného zákona tak nelze sbírat uhynulé jedince pro jejich vyšetření. Udělení výjimky může trvat i několik měsíců, což může znamenat, že se nákaza mezitím značně rozšíří a ochrana se stane nereálnou či neúměrně drahou a neefektivní.

Screening v chovech

Aktivní preventivní testování všech jedinců nebo chovných nádrží (využití eDNA) a zejména hlášení a následné testování jedinců z dovozů, se symptomy nemocí a uhynulých zvířat (viz výše).

Zhodnocení a návrhy: screening a vyšetřování úhynů či symptomatických jedinců v chovech probíhá pouze na základě dobrovolnosti chovatelů. Většina z nich je mimo kontrolu, a to včetně prodejců. Je nezbytné dodržovat hygienické protokoly (Kap. 6.7). Vymahatelnost těchto opatření je ovšem problematická (chybí právní opora, často i zájem příslušných subjektů). Význam osvěty.

Osvěta a tematické internetové stránky

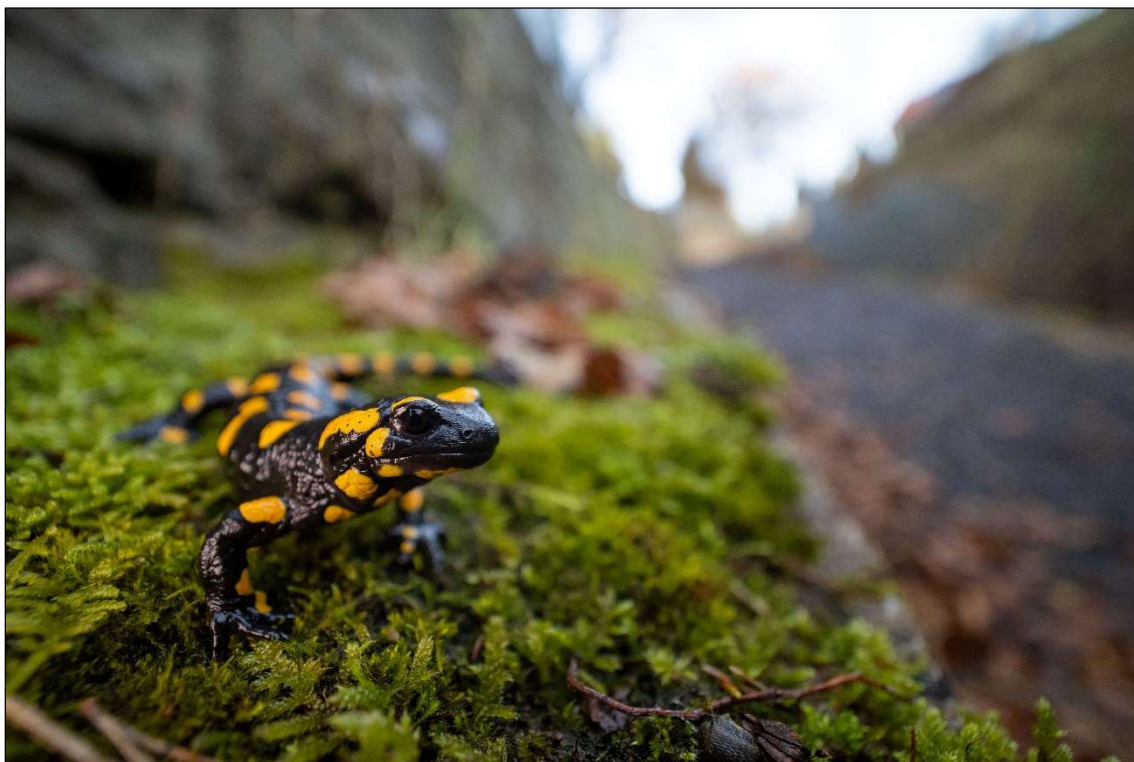
Osvěta stran potenciálních dopadů nálezů a uplatnění možných, zejména preventivních opatření, je naprosto zásadní. Cílovou skupinou jsou osoby provádějící aktivní monitoring, profesionální ochránci přírody, vlastníci pozemků a hospodařící subjekty (např. rybáři), chovatelé a obchodníci s obojživelníky i široká veřejnost. Dopad osvěty by měl být na co nejširší spektrum lidí. Kromě zahraničních (Kap. 5.1) jsou u nás k dispozici následující informační zdroje:

- **Tematické internetové stránky Amphibian Disease Web**, zkráceně “Amphidis” (<https://amphidis.fzp.czu.cz/cs>), které obsahují základní údaje o nálezích obojživelníků, projektu TAČR, kterým byla podpořena tvorba této metodiky, kontakty a hlášení, kde je možné nahlásit zejména úhyny obojživelníků.
- **Internetové stránky chovatelů ocasatých obojživelníků – Caudata** (<https://caudata.cz/>). Krom informací o druzích a pokynů pro chov jsou zde informace k obchodování a dovozu s ocasatými obojživelníky včetně zmínky o patogenu *Bsal*.
- **Internetové stránky České herpetologické společnosti** (ČHS, <http://herp.cz/>). Jedna sekce je věnována chytridiomykóze obojživelníků. Byla založena v roce 2010, spravována několik let. V současnosti je neaktuální.
- **Internetové stránky Obojživelníci ČR** <https://obojzivelnici.wbs.cz/Ochrana-objzivelniku.html>, kde lze nalézt přehled našich druhů obojživelníků i jejich příčin ohrožení včetně zmínky o problematice jejich onemocnění.
- **Články v odborných, veřejnosti dostupných časopisech** (Civiš et al. 2010, Baláž & Jirků 2021).
- **Výuka.** Problematika je součástí výuky na některých vysokých školách (ČZU, VETUNI). Cílovou skupinou jsou studenti VŠ.
- **Konference, semináře pořádané AOPK ČR.** Cílovou skupinou jsou zejména osoby provádějící monitoring obojživelníků.
- **Další zdroje.** Anekdotické zmínky o problematice, zejména ve článcích na internetu. Různá kvalita příspěvků.

Zhodnocení a návrhy: osvěta je pravděpodobně stále nedostatečná. Chybí údaje o informovanosti širší veřejnosti. Bylo by vhodné provést řádný sociologický průzkum týkající se informovanosti a vnímání nebezpečí nákaz veřejností, chovateli atp. (např. v rámci diplomové práce). Dále umístit na internetové stránky AOPK ČR a MŽP odkaz na základní informace o nákazách (cílová skupina veřejnost). Výše uvedené stránky Amphidis mají nízkou návštěvnost, pro přiblížení tématu veřejnosti by bylo dobré používat sociální sítě, např. Instagram.

Kontakty – horká linka

- **Nahlášení nálezu** uhynulého či podezřelého jedince lze prostřednictvím emailu nebo telefonicky na některém z kontaktů uvedených na stránkách Amphibian Disease Web. Kontaktními osobami jsou Vojtech Baláž a Jiří Vojar. Je možné rovněž využít hlášenky, pro urychlení je však doporučován přímý kontakt. Po kontaktování proběhne domluva na dalším postupu, zejména stran odběru vzorků.
- **Detekce patogenů.** Tyto detekce provádí pracoviště disponující vybavením a znalostí postupů diagnostických metod. V současnosti jsou tato pracoviště na Veterinární univerzitě v Brně, Státním veterinárním ústavu v Praze a na České zemědělské univerzitě v Praze.



6.6 Protokoly reakcí na patogeny v chovech a při obchodu s obojživelníky

Níže jsou uvedeny typové situace v případě výskytu nákaz představující vysoké, střední a nízké riziko. Vysoké riziko je spojené s masovými úhyny jedinců, k úhynům může dojít ale i v případě dalších dvou situací, zejména, pokud nejsou náležitě řešeny.

Vysoké riziko – např. zaznamenané úhyny v chovu

- Nahlášení úhynů (kontakty viz Kap. 6.5), příp. domluva na dalším postupu.
- Odběr vzorků z živých (stěry) i mrtvých (tkáňové vzorky) jedinců, případně odběr vzorků vody (eDNA).
- Odeslání vzorků na detekce (laboratoře dle doporučení specialistů, viz Kap. 6.5)
- Provedení testů na přítomnost *Bd*, *Bsal*, ranavirů a herpesvirů.
- V případě úhynů pulců cílit na viry a Perkinsozoa.
- V případě chovu ve venkovních prostorách jedince izolovat či přemístit dovnitř.
- Důsledné oddělení infikovaných chovných zařízení od těch negativních – samostatné sady náčiní. Oddělení vodního režimu.
- Zastavit veškeré obchodní a výměnné aktivity.
- Veškerý odpad odstraňovat po jeho desinfekci – teplem, savem, F10 (Kap. 5.3).

Střední riziko – např. v rámci výzkumu zaznamenaná přítomnost *Bd*, ranavirů a herpesvirů

- Odběr vzorků (viz výše).
- Provedení testů na přítomnost *Bd*, *Bsal*, ranavirů a herpesvirů.
- V případě úhynů pulců cílit na viry a Perkinsozoa.
- případně chovu ve venkovních prostorách jedince izolovat či přemístit dovnitř.
- Léčba dle doporučení SVÚ, statní dle příznaků.
- Důsledné oddělení infikovaných chovných zařízení od těch negativních – samostatné sady náčiní. Oddělení vodního režimu.
- Zastavit veškeré obchodní a výměnné aktivity.
- Veškerý odpad odstraňovat po jeho desinfekci – teplem, savem, F10 (Kap. 5.3).

Nízké riziko – např. hubnutí a patologické změny na jednotlivých jedincích v zajetí

- Zlepšení potravní nabídky, kontrola kvality vody a nastavení vhodné teploty dle druhu.
- Odběr eDNA, příp. pomocí jiných nedestruktivních metod.
- Kontrola chemické jakosti vody, výměna substrátu, vody i dekorace. Nový set-up akvária.

6.7 Protokoly reakcí na patogeny ve volné přírodě

Vysoké riziko – zaznamenané úhyny druhů s nejvyšší prioritou (Kap. 6.2)

- Nahlášení úhynů (kontakty viz Kap. 6.5) » odběr vzorků – stěry z živých jedinců, tkáňové vzorky z uhynulých, ev. doplnění vzorky eDNA » odeslání na analýzu (qPCR a histologické/kultivační potvrzení identity patogenu) do laboratoře, ev. na VETUNI, SVÚ nebo ČZU (po domluvě).
- Pokud potvrzen *Bsal* → určení rozsahu rozšíření a provedení následujících kroků:
 1. Osvětová akce – rozšíření informačních letáků na lokalitě, hlášení v rozhlase, místních periodikách, spolupráce s územní samosprávou.
 2. Omezení vstupu veřejnosti, zákaz rybolovu a manipulace s vodními organismy.
 3. Nastavení hygienických pravidel (biosecurity) – desinfekce vybavení, obuvi, aut apod. které byly v přímém kontaktu s vodou z postižených biotopů (Kap. 5.3).
 4. Stavba dočasných bariér (pevný igelit a dřevěné kolíky, viz např. Standardy AOPK) po obvodu území s prokázanou nákazou pro zamezení šíření patogenu. Bariéry stavět **bez** padacích pastí (nádob).
 5. Odchyt všech obojživelníků a jejich léčba (vodní lázně s F10, alternativně postup dle Blooi et al. 2015a,b) a deponace ve vhodném zařízení. Pokud existuje možnost deponace přímo nebo v blízkosti postižené lokality je to výhodou a omezí to riziko zavléčení nákazy na další lokality (v případě úniku pozitivního jedince, transportem substrátu apod.).
 6. V ochranářsky odůvodněných případech (okrajová, geneticky unikátní populace) nastartování programu chovu vybraných druhů z lokality v lidské péči).
 7. Aktivní monitoring populace a výskytu patogenu. Snaha o co nejvyšší počty vzorků ze všech dostupných druhů. Diagnostika přítomnosti eDNA patogenů ve vodě.
 8. Zvýšený pasivní monitoring v širším okolí nákazy (řádově jednotky km).
 9. Úprava biotopu – zlepšení podmínek, budování tůní, jejich čištění, odstranění nepůvodních ryb, redukce nepůvodních predátorů, monitoring kvality vody. Cílem je umožnit populaci přítomnost patogenu přežít a lokálně tak nastartovat koevoluci patogen-hostitel.
 10. Po odeznění nákazy (opakované nezaznamenání patogenu v prostředí a na přítomných obojživelnících) příp. postupná reintrodukce druhů ze záchranného chovu – jedinci mohou být předem ošetřeni podle aktuálních znalostí preventivní léčbou, bioaugmentací apod.
 11. Při zaznamenaných úhynech po reintrodukci tuto přerušit a odložit vypouštění zvířat o sezónu později.

Střední riziko – zaznamenán úhyn obojživelníků s příznaky ranavirózy na lokalitě s výskytem vnímavých druhů

- Nahlášení úhynů (kontakty viz Kap. 6.5) » odběr vzorků – stěry z živých jedinců, tkáňové vzorky z uhynulých, ev. doplnění vzorky eDNA » odeslání na analýzu (qPCR a histologické/kultivační potvrzení identity patogenu) do laboratoře, ev. na VETUNI, SVÚ nebo ČZU (po domluvě).
- Pokud potvrzena přítomnost ranavirů → realizace následujících kroků:
 1. Osvětová akce – rozšíření informačních letáků na lokalitě, hlášení v rozhlase, místních periodikách, spolupráce s územní samosprávou.
 2. Omezení manipulace s obojživelníky a celkově s vodní plochou, kde byla nalezena nákaza (zákaz výlovu, rybolovu, manipulace s obojživelníky).
 3. Nastavení hygienických pravidel (biosecurity) – desinfekce vybavení, obuvi, aut apod. které byly v přímém kontaktu s vodou z postižených biotopů (Kap. 5.3).
 4. Odstraňování uhynulých jedinců z lokality.
 5. Úprava biotopu – zlepšení podmínek, budování nových tůní, jejich čištění, odstranění nepůvodních ryb, redukce nepůvodních predátorů, monitoring kvality vody.
 6. Aktivní monitoring populace a výskytu patogenu.
 7. Po odeznění mortality lze očekávat zpětný nárůst populace.

Nízké riziko – zaznamenána přítomnost *Bd* (qPCR a případně histologicky/kultivačně) v populaci skokana zeleného na lokalitě s výskytem dalších druhů

V rámci výzkumných aktivit nalezena přítomnost *Bd*, potvrzena

1. Zabránění manipulace s obojživelníky v rámci transferů na jiné lokality, pokud neprojdou bioaugmentací, léčbou nebo jiným způsobem eliminace nákazy.
2. Nastavení hygienických pravidel (biosecurity) – desinfekce vybavení, obuvi, aut apod. které byly v přímém kontaktu s vodou z postižených biotopů (Kap. 5.3).
3. Úprava biotopu – zlepšení podmínek, budování tůní, jejich čištění, odstranění nepůvodních ryb, redukce nepůvodních predátorů.
4. Sledování populačního trendu a případně přítomnost citlivých druhů.

7. Použitá literatura

- Alfan, A. R., Khatibu, F. H., Kohi, E. M., & Muheto, R. (2011). Status and reintroduction of the Kihansi spray toad *Nectophrynoides asperginis* in Kihansi gorge: challenges and opportunities. *7th TAWIRI Scientific Conference, December*, 11–20.
- Alford, R. A., & Richards, S. (1999). Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30, 133–165.
- Allain, S. J. R., & Duffus, A. L. J. (2019). Emerging infectious disease threats to European herpetofauna. *Herpetological Journal*, 29(4), 189–206. <https://doi.org/10.33256/hj29.4.189206>
- Altwegg, R., & Reyer, H. U. (2003). Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, 57(4), 872–882. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00298.x>
- American Museum of Natural History. (2023). *Amphibian Species of the World 6.2., an Online Reference* (online) [cit.2023.06.14] <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>
- Anděl, P., Gorčicová, I., Hlaváč, V., Miko, L., & Andělová, H. (2005). *Hodnocení fragmentace krajiny dopravou, metodická příručka*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Paha.
- Anděl, P., Belková, H., Gorčicová, I., Hlaváč, V., Libosvár, T., Rozínek, R., Šíkula, T., & Vojar, J. (2011). *Propustnost silnic a dálnic pro volně žijící živočichy*. Evernia, Liberec.
- AOPK ČR. (2023). *Agentura ochrany přírody a krajiny ČR*. (online) [cit.2023.06.14] <https://www.nature.cz/>
- Arias-Robledo, G., Stark, T., Wall, R. L., & Stevens, J. R. (2019a). The toad fly *Lucilia bufonivora*: its evolutionary status and molecular identification. *Medical and Veterinary Entomology*, 33(1), 131–139. <https://doi.org/10.1111/mve.12328>
- Arias-Robledo, G., Stevens, J. R., & Wall, R. (2019b). Spatial and temporal habitat partitioning by calliphorid blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 33(2), 228–237. <https://doi.org/10.1111/mve.12354>
- Auliya, M., García-Moreno, J., Schmidt, B. R., Schmeller, D. S., Hoogmoed, M. S., Fisher, M. C., Pasmans, F., Henle, K., Bickford, D., & Martel, A. (2016). The global amphibian trade flows through Europe: the need for enforcing and improving legislation. *Biodiversity and Conservation*, 25(13), 2581–2595. <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1193-8>
- Ayres, C., Acevedo, I., Monsalve-Carcaño, C., Thumsová, B., & Bosch, J. (2020). Triple dermocyctid-chytrid fungus-ranavirus co-infection in a *Lissotriton helveticus*. *European Journal of Wildlife Research*, 66(3). <https://doi.org/10.1007/s10344-020-01381-2>
- Baláž, V., Kubečková, M., Civiš, P., Rozínek, R., & Vojar, J. (2013). Fatal chytridiomycosis and infection loss observed in captive toads infected in the wild. *Acta Veterinaria Brno*, 82(4), 351–355. <https://doi.org/10.2754/avb201382040351>
- Baláž, V., Vojar, J., Civiš, P., Andera, M., & Rozínek, R. (2014a). Chytridiomycosis risk among Central European amphibians based on surveillance data. *Diseases of Aquatic Organisms*, 112(1), 1–8. <https://doi.org/10.3354/dao02799>
- Baláž, V., Vörös, J., Civiš, P., Vojar, J., Hettyey, A., Sós, E., Dankovics, R., Jehle, R., Christiansen, D. G., Clare, F., Fisher, M. C., Garner, T. W. J., & Bielby, J. (2014b). Assessing risk and guidance on monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through identification of taxonomic selectivity of infection. *Conservation Biology*, 28(1), 213–223. <https://doi.org/10.1111/cobi.12128>
- Baláž, V., Gortázar Schmidt, C., Murray, K., Carnesecchi, E., Garcia, A., Gervelmeyer, A., Martino, L., Munoz Guajardo, I., Verdonck, F., Zancanaro, G., & Fabris, C. (2017). Scientific and technical assistance concerning the survival, establishment and spread of *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) in the EU. *EFSA Journal*, 15(2), 4739. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4739>

- Baláž, V., Solský, M., Lastra González, D., Havlíková, B., Gallego Zamorano, J., González Sevilleja, C., Torrent, L., & Vojar, J. (2018). First survey of the pathogenic fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in wild and captive amphibians in the Czech Republic. *Salamandra*, 54(1), 87–91.
- Baláž, V., Balážová, A., Lastra González, D., Sedlák, K., & Vojar, J. (2023). *Metodika rychlé detekce infekčních onemocnění obojživelníků*. Certifikovaná metodika MŽP, dostupná online na www.mzp.cr.
- Bales, E. K., Hyman, O. J., Loudon, A. H., Harris, R. N., Lipps, G., Chapman, E., Roblee, K., Kleopfer, J. D., & Terrell, K. A. (2015). Pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, but not *B. salamandrivorans*, detected on eastern hellbenders. *PLoS ONE*, 10(2), e0116405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116405>
- Balseiro, A., Dalton, K. P., Del Cerro, A., Marquez, I., Cunningham, A. A., Parra, F., Prieto, J. M., & Casais, R. (2009). Pathology, isolation and molecular characterisation of a ranavirus from the common midwife toad *Alytes obstetricans* on the Iberian Peninsula. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(2), 95–104. <https://doi.org/10.3354/dao02032>
- Balseiro, A., Dalton, K. P., del Cerro, A., Márquez, I., Parra, F., Prieto, J. M., & Casais, R. (2010). Outbreak of common midwife toad virus in alpine newts (*Mesotriton alpestris cyreni*) and common midwife toads (*Alytes obstetricans*) in Northern Spain: A comparative pathological study of an emerging ranavirus. *Veterinary Journal*, 186(2), 256–258. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.07.038>
- Beja, P., & Alcazar, R. (2003). Conservation of Mediterranean temporary ponds under agricultural intensification: an evaluation using amphibians. *Biological Conservation*, 114(3), 317–326. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00051-X)
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G., & Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 9031–9036. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031>
- Berger, L., Speare, R., & Hyatt, A. (1999). Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. *Declines and Disappearances of Australian Frogs. Environment Australia, Canberra, 1999*, 23–33.
- Berger, L., Hyatt, A. D., Speare, R., & Longcore, J. E. (2005). Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68(1), 51–63.
- Berger, L., Roberts, A. A., Voyles, J., Longcore, J. E., Murray, K. A., & Skerratt, L. F. (2016). History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. *Fungal Ecology*, 19, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.09.007>
- Blaustein, A. R., & Wake, D. B. (1990). Declining amphibian populations: A global phenomenon? *Trends in Ecology & Evolution*, 5(7), 203–204. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(90\)90129-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(90)90129-2)
- Blaustein, A. R., & Dobson, A. (2006). Extinctions: a message from the frogs. *Nature*, 439(7073), 143–144. <https://doi.org/10.1038/439143a>
- Blaustein, A. R., Urbina, J., Snyder, P. W., Reynolds, E., Dang, T., Hoverman, J. T., Han, B., Olson, D. H., Searle, C., & Hambalek, N. M. (2018). Effects of emerging infectious diseases on amphibians: A review of experimental studies. *Diversity*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/d10030081>
- Bletz, M. C., Kelly, M., Sabino-Pinto, J., Bales, E., Van Praet, S., Bert, W., Boyen, F., Vences, M., Steinfartz, S., Pasmans, F., & Martel, A. (2018). Disruption of skin microbiota contributes to salamander disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1885). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0758>
- Bletz, M. C., Loudon, A. H., Becker, M. H., Bell, S. C., Woodhams, D. C., Minbiole, K. P. C., & Harris, R. N. (2013). Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: Characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. *Ecology Letters*, 16(6), 807–820. <https://doi.org/10.1111/ele.12099>

- Blooi, M., Pasmans, F., Longcore, J. E., Spitzen-van der Sluijs, A., Vercammen, F., & Martel, A. (2013). Duplex Real-Time PCR for Rapid Simultaneous Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in Amphibian Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4173–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.02313-13>
- Blooi, M., Martel, A., Haesebrouck, F., Vercammen, F., Bonte, D., & Pasmans, F. (2015a). Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Scientific Reports*, 5(JANUARY), 8037. <https://doi.org/10.1038/srep08037>
- Blooi, M., Pasmans, F., Rouffaer, L., Haesebrouck, F., Vercammen, F., & Martel, a. (2015b). Successful treatment of *Batrachochytrium salamandrivorans* infections in salamanders requires synergy between voriconazole, polymyxin E and temperature. *Scientific Reports*, 5(March), 11788. <https://doi.org/10.1038/srep11788>
- Blumer, C., Zimmermann, D. R., Weilenmann, R., Vaughan, L., & Pospischil, A. (2007). Chlamydiae in free-ranging and captive frogs in Switzerland. *Veterinary Pathology*, 44(2), 144–150. <https://doi.org/10.1354/vp.44-2-144>
- Borteiro, C., Cruz, J. C., Kolenc, F., Manuel Verdes, J., Moraña, A., Martínez Debat, C., Kun, A., Ubilla, M., & Okada, K. (2014). Dermocystid-chytrid coinfection in the neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *Journal of Wildlife Diseases*, 50(1), 150–153. <https://doi.org/10.7589/2013-06-151>
- Borteiro, C., Verdes, J. M., Cruz, J. C., Sabalsagaray, M. J., Kolenc, F., Debat, C. M., & Ubilla, M. (2015). *Ichthyophonus* sp. (Ichthyophonae, ichthyophonida) infection in a South American Amphibian, the Hylid frog *Hypsiboas pulchellus*. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(2), 530–533. <https://doi.org/10.7589/2014-06-149>
- Bosch, J., Martínez-Solano, I., & García-París, M. (2001). Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, 97(3), 331–337. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00132-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00132-4)
- Bosch, J., & Martínez-Solano, I. (2006). Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain. *Oryx*, 40(1), 84–89. <https://doi.org/10.1017/S0030605306000093>
- Boutier, M., Donohoe, O., Keller Kopf, R., Humphries, P., Becker, J. A., Marshall, J., & Vanderplasschen, A. (2019). Biocontrol of carp: The Australian plan does not stand up to a rational analysis of safety and efficacy. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 446369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00882>
- Boyle, D., Boyle, D., Olsen, V., Morgan, J., & Hyatt, A. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(2), 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao060141>
- Bozzuto, C., & Canessa, S. (2019). Impact of seasonal cycles on host-pathogen dynamics and disease mitigation for *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00551. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00551>
- Bridges, C. (1999). Effects of a pesticide on tadpole activity and predator avoidance behavior. *Journal of Herpetology*, 33(2), 303–306.
- Broz, O., & Privora, M. (1952). Two Skin Parasites of *Rana Temporaria*: *Dermocystidium ranae* Guyénot & Naville and *Dermosporidium granulorum* N.SP. *Parasitology*, 42(1–2), 65–69. <https://doi.org/10.1017/S0031182000084286>
- Brunner, J. L., Storfer, A., Gray, M. J., & Hoverman, J. T. (2015). Ranavirus Ecology and Evolution: From Epidemiology to Extinction. In M. J. GRAY & G. V. CHINCHAR (Eds.), *Ranaviruses* (pp. 71–104). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13755-1_4
- Buck, J. C., Truong, L., & Blaustein, A. R. (2011). Predation by zooplankton on *Batrachochytrium dendrobatidis*: Biological control of the deadly amphibian chytrid fungus? *Biodiversity and Conservation*, 20(14), 3549–3553. <https://doi.org/10.1007/s10531-011-0147-4>

- Bury, R. B. (2008). Low thermal tolerances of stream amphibians in the Pacific Northwest: Implications for riparian and forest management. *Applied Herpetology*, 5(1), 63–74. <https://doi.org/10.1163/157075408783489211>
- Canada Government. (2022). *Import restriction on salamanders*. (online) [cit.2023.06.14] <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/convention-international-trade-endangered-species/import-species-harmful-ecosystems/restriction-salamanders.html>
- Canessa, S., Bozzuto, C., Campbell Grant, E. H., Cruickshank, S. S., Fisher, M. C., Koella, J. C., Lötters, S., Martel, A., Pasmans, F., Scheele, B. C., Spitzen-van der Sluijs, A., Steinfartz, S., & Schmidt, B. R. (2018). Decision-making for mitigating wildlife diseases: From theory to practice for an emerging fungal pathogen of amphibians. *Journal of Applied Ecology*, 55(4), 1987–1996. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13089>
- Canessa, S., Genta, P., Jesu, R., Lamagni, L., Oneto, F., Salvidio, S., & Ottonello, D. (2016). Challenges of monitoring reintroduction outcomes: Insights from the conservation breeding program of an endangered turtle in Italy. *Biological Conservation*, 204, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.05.003>
- Carey, C., Cohen, N., & Rollins-Smith, L. (1999). Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental & Comparative Immunology*, 23, 459–472.
- Carlson, D. L., Sauerbier, W., Rollins-Smith, L. A., & McKinnell, R. G. (1994). The presence of DNA sequences of the Lucké herpesvirus in normal and neoplastic kidney tissue of *Rana pipiens*. *Journal of Comparative Pathology*, 110(4), 349–355. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80312-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80312-X)
- Chambouvet, A., Gower, D. J., Jirku, M., Yabsley, M. J., Davis, A. K., Leonard, G., Maguire, F., Doherty-Bone, T. M., Bittencourt-Silva, G. B., Wilkinson, M., & Richards, T. A. (2015). Cryptic infection of a broad taxonomic and geographic diversity of tadpoles by *Perkinsea* protists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), E4743–E4751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500163112>
- Chambouvet, A., Valigurová, A., Pinheiro, L. M., Richards, T. A., & Jirků, M. (2016). *Nematopsis temporariae* (Gregarinasina, apicomplexa, alveolata) is an intracellular infectious agent of tadpole livers. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 675–679. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12421>
- Chambouvet, A., Smilansky, V., Jirků, M., Isidoro-Ayza, M., Itoiz, S., Derelle, E., Monier, A., Gower, D. J., Wilkinson, M., Yabsley, M. J., Lukeš, J., & Richards, T. A. (2020). Diverse alveolate infections of tadpoles, a new threat to frogs? *PLoS Pathogens*, 16(2), e1008107. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008107>
- Cheng, T. L., Rovito, S. M., Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2011). Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), 9502–9507. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105538108>
- Chinchar, V. G. (2002). Ranaviruses (family *Iridoviridae*): Emerging cold-blooded killers. *Archives of Virology*, 147(3), 447–470. <https://doi.org/10.1007/s007050200000>
- Chinchar, V. G., Hick, P., Ince, I. A., Jancovich, J. K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., Whittington, R., Williams, T., & Zhang, Q. Y. (2017). ICTV virus taxonomy profile: *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, 98(5), 890–891. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000818>
- Civiš, P. (2010). *Monitoring chytridiomykózy v České republice*. Diplomová práce, Fakulta životního prostředí ČZU v Praze (nepublikováno).
- Civiš, P., Vojar, J., & Baláž, V. (2010). Chytridiomykóza – hrozba pro naše obojživelníky. *Ochrana Přírody*, 65(4), 18–20.
- Civiš, P., Vojar, J., Literák, I., & Baláž, V. (2012). Current state of Bd occurrence in the Czech Republic. *Herpetological Review*, 43(1), 75–78.

- Collins, J., & Storfer, A. (2003). Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*, 9(2), 89–98.
- Cook, K., Pope, K., Cummings, A., & Piovio-Scott, J. (2022). In situ treatment of juvenile frogs for disease can reverse population declines. *Conservation Science and Practice*, 4(9). <https://doi.org/10.1111/csp2.12762>
- Courtois, E. A., Cornuau, J. H., Loyau, A., & Schmeller, D. S. (2013). Distribution of *Amphibiocystidium* sp. in palmate newts (*Lissotriton helveticus*) in Ariège, France. *Herpetology Notes*, 6(1), 539–543.
- Cunningham, A. A., Langton, T. E., Bennett, P. M., Lewin, J. F., Drury, S. E., Gough, R. E., & Macgregor, S. K. (1996). Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 351(1347), 1539–1557. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0140>
- Cunningham, A. A., Daszak, P., & Rodriguez, J. (2003). Pathogen pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation. *Journal of Parasitology*, 89, 78–83.
- Cunningham, A. A., Beckmann, K., Perkins, M., Fitzpatrick, L., Cromie, R., Redbond, J., O'Brien, M. F., Ghosh, P., Shelton, J., & Fisher, M. C. (2015). Emerging disease in UK amphibians. *Veterinary Record*, 176(18), 468. <https://doi.org/10.1136/vr.h2264>
- Cunningham, A. A., Smith, F., McKinley, T. J., Perkins, M. W., Fitzpatrick, L. D., Wright, O. N., & Lawson, B. (2019). Apparent absence of *Batrachochytrium salamandrivorans* in wild urodeles in the United Kingdom. *Scientific Reports*, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39338-4>
- Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*, 128(2), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.031>
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E., & Speare, R. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6), 735–748. <https://doi.org/10.3201/eid0506.990601>
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science*, 287(5452), 443–449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>
- Davis, A. K., Yabsley, M. J., Kevin Keel, M., & Maerz, J. C. (2007). Discovery of a novel alveolate pathogen affecting southern leopard frogs in Georgia: Description of the disease and host effects. *EcoHealth*, 4(3), 310–317. <https://doi.org/10.1007/s10393-007-0115-3>
- De Jong, M. S., Van Dyk, R., & Weldon, C. (2018). Antifungal efficacy of F10SC veterinary disinfectant against *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Medical Mycology*, 56(1), 60–68. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx023>
- Denoël, M., Bichot, M., Ficetola, G. F., Delcourt, J., Yliff, M., Kestemont, P., & Poncin, P. (2010). Cumulative effects of road de-icing salt on amphibian behavior. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.007>
- Dickinson, J. L., Shirk, J., Bonter, D., Bonney, R., Crain, R. L., Martin, J., Phillips, T., & Purcell, K. (2012). The current state of citizen science as a tool for ecological research and public engagement. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 10(6), 291–297. <https://doi.org/10.1890/110236>
- Duffus, A. L. J., Waltzek, T. B., Stöhr, A. C., Allender, M. C., Gotesman, M., Whittington, R. J., Hick, P., Hines, M. K., & Marschang, R. E. (2015). Distribution and Host Range of Ranaviruses. In M. J. Gray & V. G. Chinchar (Eds.), *Ranaviruses* (pp. 9–57). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13755-1_2
- Duszynski, D. W., Bolek, M. G., & Upton, S. J. (2007). Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of amphibians of the world. *Zootaxa*, 1667, 1–77. <https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.1667.1.1/49469>
- Farrer, R. A., Weinert, L. A., Bielby, J., Garner, T. W. J., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham, A. A., Weldon, C., Du Preez, L. H., Anderson, L., Kosakovsky, S. L., Shahar-Golan, R., Henk, D. A., & Fisher, M. C. (2011). Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a

globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), 18732–18736. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111915108>

Farrer, R. A., Martel, A., Verbrugghe, E., Abouelleil, A., Ducatelle, R., Longcore, J. E., James, T. Y., Pasmans, F., Fisher, M. C., & Cuomo, C. A. (2017). Genomic innovations linked to infection strategies across emerging pathogenic chytrid fungi. *Nature Communications*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms14742>

Fellers, G. M., Bradford, D. F., Pratt, D., & Long Wood, L. (2007). Demise of translocated populations of mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) in Sierra Nevada of California. *Herpetological Conservation and Biology*, 2, 5–21.

Fiegna, C., Clarke, C. L., Shaw, D. J., Baily, J. L., Clare, F. C., Gray, A., Garner, T. W. J., & Meredith, A. L. (2017). Pathological and phylogenetic characterization of Amphibiothecum sp. infection in an isolated amphibian (*Lissotriton helveticus*) population on the island of Rum (Scotland). *Parasitology*, 144(4), 484–496. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001943>

Fischer, D., Jeřábková, L., & Vlach, P. (2015). Jsou čolek obecný a ropucha obecná stále ještě obecní? *Ochrana Přírody*, 2, 32–36.

Fisher, M. C., Garner, T. W. J., & Walker, S. F. (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 291–310. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073435>

Fitzpatrick, L. D., Pasmans, F., Martel, A., & Cunningham, A. A. (2018). Epidemiological tracing of *Batrachochytrium salamandrivorans* identifies widespread infection and associated mortalities in private amphibian collections. *Scientific Reports*, 8(1), 13845. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31800-z>

Flegr, J. (2009). *Evoluční biologie. 2. Vydání*. Academia, Praha.

Franklinos, L. H. V., Rodriguez-Ramos Fernandez, J., Hydeskov, H. B., Hopkins, K. P., Everest, D. J., Cunningham, A. A., & Lawson, B. (2018). Herpesvirus skin disease in free-living common frogs *Rana temporaria* in Great Britain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 129(3), 239–244. <https://doi.org/10.3354/dao03246>

Forrest, M. J., & Schlaepfer, M. A. (2011). Nothing a hot bath won't cure: Infection rates of amphibian chytrid fungus correlate negatively with water temperature under natural field settings. *PLoS ONE*, 6(12), e28444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028444>

Frenken, T., Agha, R., Schmeller, D. S., van West, P., & Wolinska, J. (2019). Biological concepts for the control of aquatic zoosporic diseases. *Trends in Parasitology*, 35(7), 571–582. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.003>

Gagliardo, R., Crump, P., Griffith, E., Mendelson, J., Ross, H., & Zippel, K. (2008). The principles of rapid response for amphibian conservation, using the programmes in Panama as an example. *International Zoo Yearbook*, 42(1), 125–135. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2008.00043.x>

Gamble, K. C., Garner, M. M., West, G., Didier, E. S., Cali, A., & Alvarado, T. P. (2005). Kyphosis Associated with Microsporidial Myositis in San Marcos Salamanders, *Eurycea nana*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 15(4), 14–18. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.15.4.14>

Garmyn, A., Van Rooij, P., Pasmans, F., Hellebuyck, T., Van Den Broeck, W., Haesebrouck, F., Martel, A., Stuart, S., Chanson, J., Cox, N. A., Young, B., Rodrigues, A., Lips, K., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J., Alford, R., Berger, L., Speare, R., ... Francisco, M. (2012). Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 7(4), e35038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035038>

Garner, T. W. J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A. D., Cunningham, A. A., & Fisher, M. C. (2005). Chytrid fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(10), 1639–1641.

Garner, T. W. J., Schmidt, B. R., Martel, A., Pasmans, F., Muths, E., Cunningham, A. A., Weldon, C., Fisher, M. C., & Bosch, J. (2016). Mitigating amphibian chytridiomycoses in nature. *Philosophical*

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 371(1709), 20160207. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0207>

Gascon, C., Collins, J., Moore, R., Church, D., McKay, J., & Mendelson, J. (2007). *Amphibian conservation action plan: IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit 2005*. World Conservation Union (IUCN).

Geiger, C. C., Bregnard, C., Maluenda, E., Voordouw, M. J., & Schmidt, B. R. (2017). Antifungal treatment of wild amphibian populations caused a transient reduction in the prevalence of the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05798-9>

Gendron, A. D., Marcogliese, D. J., Barbeau, S., Christin, M.-S., Brousseau, P., Ruby, S., Cyr, D., & Fournier, M. (2003). Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia*, 135(3), 469–476. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1210-y>

Gerson, H., Cudmore, B., Mandrak, N. E., Coote, L. D., Farr, K., & Baillargeon, G. (2008). Monitoring international wildlife trade with coded species data. *Conservation Biology* 22(1), 4–7. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2007.00857.x>

Gibson, R. C., & Freeman, M. (1997). Conservation at home: recovery programme for the agile frog *Rana dalmatina* in Jersey. *Dodo-Jurnal of the Wildlife Preservation Trusts*, 33, 91–104.

Gilbert, M. J., Spitzen-van der Sluijs, A. M., Canessa, S., Bosch, J., Cunningham, A. A., Grasselli, E., Laudelout, A., Lötters, S., Miaud, C., Salvidio, S., Veith, M., Martel, A., & Pasmans, F. (2020). *Mitigating Batrachochytrium salamandrivorans in Europe. Batrachochytrium salamandrivorans Action Plan for European urodeles*. Nijmegen, the Netherlands.

Gimeno, A., Meikl, M., Pitt, A., Winkler, M., & Berninger, U. G. (2015). Testing of Fire Salamanders around Salzburg for *Batrachochytrium salamandrivorans* within a school project. *Journal on Protected Mountain Areas Research*, 7(1), 72–76. <https://doi.org/10.1553/eco.mont-7-1s72>

Gleason, F. H., Chambouvet, A., Sullivan, B. K., Lilje, O., & Rowley, J. J. L. (2014). Multiple zoosporic parasites pose a significant threat to amphibian populations. *Fungal Ecology*, 11, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.04.001>

Goddard, J., De Jong, G., & Meyer, F. (2020). Unidirectional en masse larval dispersal of blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Food Webs*, 23, e00137. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2019.e00137>

Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T., & Hyatt, A. D. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: Distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18(23), 4757–4774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04384.x>

González-Hernández, M., Denoël, M., Duffus, A. J. L., Garner, T. W. J., Cunningham, A. A., & Acevedo-Whitehouse, K. (2010). Dermocystid infection and associated skin lesions in free-living palmate newts (*Lissotriton helveticus*) from Southern France. *Parasitology International*, 59(3), 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.04.006>

Goverse, E., Smit, G. F. J., Zuiderwijk, A., & van der Meij, T. (2006). The national amphibian monitoring program in the Netherlands and NATURA 2000. *Proceedings of the 13th Congress of the Societas Europaea Herpetologica*, 39–42.

Grant, E. H. C., Muths, E., Katz, R. A., Canessa, S., Adam, M. J., Ballard, J. R., Berger, L., Briggs, C. J., Coleman, J., Gray, M. J., Harris, M. C., Harris, R. N., Hossack, B., Huyvaert, K. P., Kolby, J. E., Lips, K. R., Lovich, R. E., McCallum, H. I., Mendelson III, J. R., Nanjappa, P., Olson, D. H., Powers, J. G., Richgels, K. L. D., Russell, R. E., Schmidt, B. R., Spitzen-van der Sluijs, A., Watry, M. K., Woodhams, D. C., & White, C. L. (2016). Salamander chytrid fungus (*Batrachochytrium salamandrivorans*) in the United States—Developing research, monitoring, and management strategies. *U.S. Geological Survey Open-File Report 2015–1233*, 16 p.

Gray, M. J., Miller, D. L., & Hoverman, J. T. (2009). Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87(3), 243–266. <https://doi.org/10.3354/dao02138>

- Gray, M. J., Lewis, J. P., Nanjappa, P., Klocke, B., Pasmans, F., Martel, A., Stephen, C., Parra Olea, G., Smith, S. A., Sacerdote-Velat, A., Christman, M. R., Williams, J. M., & Olson, D. H. (2015). *Batrachochytrium salamandrivorans*: The North American Response and a Call for Action. *PLoS Pathogens* 11(12), e1005251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005251>
- Green, D. E., Converse, K. A., & Schrader, A. K. (2002). Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 323–339. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04400.x>
- Greenspan, S. E., Lambertini, C., Carvalho, T., James, T. Y., Toledo, L. F., Haddad, C. F. B., & Becker, C. G. (2018). Hybrids of amphibian chytrid show high virulence in native hosts. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27828-w>
- Groom, M., Meffe, G., & Carroll, C. (2006). *Principles of Conservation Biology. Third Edition*. Sinauer Associates, Sunderland, U.S.A.
- Hanlon, S., Lynch, K., Kerby, J., & Parris, M. (2015). *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 112(3), 237–242. <https://doi.org/10.3354/dao02810>
- Hardman, R. H., Ammar, S., Gerhold, R., Sutton, W., Carter, E. D., Snyder, S., da Silva Neto, J., Tarkington, M., Gray, M. J., & Miller, D. L. (2023). Coccidiosis in Wild Eastern Newts (*Notophthalmus viridescens*): An Unexpected Finding in Consecutive Mortality Events in Tennessee, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 12. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-22-00107>
- Havlíková, B., Vojar, J., & Baláž, V. (2015). First systematic monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in collections of captive amphibians in the Czech Republic. *Amphibia-Reptilia*, 36(1), 27–35. <https://doi.org/10.1163/15685381-00002972>
- Herrel, A., & van der Meijden, A. (2014). An analysis of the live reptile and amphibian trade in the USA compared to the global trade in endangered species. *The Herpetological Journal*, 24(2), 103–110.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., & Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hlaváč, V., Anděl, P., Pešout, P., Libosvár, Tomáš., Šíkula, Tomáš., Bartonička, T., Dostál, I., Strnad, M., & Uhlíková, J. (2020). *Doprava a ochrana fauny v České republice*. AOPK ČR, Praha.
- Hudson, M. A., Young, R. P., Lopez, J., Martin, L., Fenton, C., McCrea, R., Griffiths, R. A., Adams, S. L., Gray, G., Garcia, G., & Cunningham, A. A. (2016). In-situ itraconazole treatment improves survival rate during an amphibian chytridiomycosis epidemic. *Biological Conservation*, 195, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.12.041>
- Hyatt, A. D., Gould, A. R., Zupanovic, Z., Cunningham, A. A., Hengstberger, S., Whittington, R. J., Kattenbelt, J., & Coupar, B. E. H. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology*, 145(2), 301–331. <https://doi.org/10.1007/s007050050025>
- Hyatt, A. D., Boyle, D. G., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., & Colling, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(3), 175–192. <https://doi.org/10.3354/dao073175>

- Isidoro-Ayza, M., Lorch, J. M., Grear, D. A., Winzeler, M., Calhoun, D. L., & Barichivich, W. J. (2017). Pathogenic lineage of *Perkinsea* associated with mass mortality of frogs across the United States. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10456-1>
- IUCN. (2013). *Guidelines for reintroductions and other conservation translocations. Version 1.0*. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland.
- IUCN. (2016). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016.3*. IUCN, Gland, Switzerland. (online) [cit.2023.06.14] <http://www.iucnredlist.org/>
- IUCN. (2022). *The IUCN Red List of Threatened Species*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. (online) [cit.2023.06.14] <http://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics>
- Jenkins, P. T., Genovese, K., Ruffler, H., Muffett, C., Burgiel, S., Malsch, K., & Chavarria, G. (2007). The regulation of live Animal imports in the United states. *Broken screens: the regulation of live animal imports in the United States*. (online) [cit.2023.06.14] https://defenders.org/sites/default/files/publications/broken_screens_report.pdf.
- Jeřábková, L., Krása, A., & Svoboda, A. (2013). Obojživelníci v ohrožení. *Ochrana Přírody*, 4, 2–6.
- Jeřábková, L., Krása, A., Zavadil, V., Mikátová, B., & Rozínek, R. (2017). Červený seznam obojživelníků a plazů České republiky. In *Červený seznam ohrožených druhů České Republiky. Obratlovci. Příroda* 34, 83–106.
- Jirků, M., Fiala, I., & Modrý, D. (2007). Tracing the genus *Sphaerospora*: Rediscovery, redescription and phylogeny of the *Sphaerospora ranae* (Morelle, 1929) n. comb. (Myxosporidia, Sphaerosporidae), with emendation of the genus *Sphaerospora*. *Parasitology*, 134(12), 1727–1739. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003241>
- Jirků, M., Jirků, M., Oborník, M., Lukeš, J., & Modrý, D. (2009). *Goussia Labbé*, 1896 (Apicomplexa, Eimeriorina) in Amphibia: Diversity, Biology, Molecular Phylogeny and Comments on the Status of the Genus. *Protist*, 160(1), 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2008.08.003>
- Jirků, M., & Baláž, V. (2021). Soumrak obojživelníků. *Živa*, 5, 259–263.
- Johnson, M. L., & Speare, R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 922–925.
- Karraker, N. E., & Gibbs, J. P. (2011). Road deicing salt irreversibly disrupts osmoregulation of salamander egg clutches. *Environmental Pollution*, 159(3), 833–835. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.11.019>
- Keele, D. J., DeLallo, V. C., Lewis, R. E., Ernst, E. J., & Klepser, M. E. (2001). Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 41(3), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00297-8](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00297-8)
- Kerouš K. (1998). Chronické problémy v ochraně obojživelníků. *Ochrana Přírody*, 53, 276–279.
- Kerouš K. (1999). Reálné možnosti ochrany obojživelníků v praxi. *Ochrana Přírody*, 54(1), 4–6.
- Kiesecker, J. M., Blaustein, A. R., & Belden, L. K. (2001). Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410(6829), 681–684. <https://doi.org/10.1038/35070552>
- Kik, M., Stege, M., Boonyarittichai, R., & van Asten, A. (2012). Concurrent ranavirus and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs (*Phyllobates* and *Dendrobates* species), The Netherlands, 2012: A first report. *Veterinary Journal*, 194(2), 247–249. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.09.016>
- Kilpatrick, A. M., Briggs, C. J., & Daszak, P. (2010). The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(2), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.07.011>

- Klocke, B., Becker, M., Lewis, J., Fleischer, R. C., Muletz-Wolz, C. R., Rockwood, L., Aguirre, A. A., & Gratwicke, B. (2017). *Batrachochytrium salamandrivorans* not detected in U.S. survey of pet salamanders. *Scientific Reports*, 7(1), 13132. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13500-2>
- Kontoyiannis, D. P., Lewis, R. E., Sagar, N., May, G., Prince, R. A., & Rolston, K. V. I. (2000). Itraconazole-amphotericin B antagonism in *Aspergillus fumigatus*: An E-test-based strategy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10), 2915–2918. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2915-2918.2000>
- Konvička, M., Beneš, J., & Čížek, L. (2005). *Ohrožený hmyz nelesních stanovišť: ochrana a management*. Sagittaria, Olomouc.
- Koprivnikar, J., Marcogliese, D. J., Rohr, J. R., Orlofske, S. A., Raffel, T. R., & Johnson, P. T. J. (2012). Macroparasite infections of amphibians: What can they tell us? *EcoHealth*, 9(3), 342–360. <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0785-3>
- Kupferberg, S. J., Catenazzi, A., Lunde, K., Lind, A. J., & Palen, W. J. (2009). Parasitic copepod (*Lernaea cyprinacea*) outbreaks in foothill yellow-legged frogs (*Rana boylei*) linked to unusually warm summers and amphibian malformations in Northern California. *Copeia*, 2009(3), 529–537. <https://doi.org/10.1643/CH-08-011>
- Laking, A. E., Ngo, H. N., Pasmans, F., Martel, A., & Nguyen, T. T. (2017). *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. *Scientific Reports*, 7, 44443. <https://doi.org/10.1038/srep44443>
- Landsberg, J. H., Kiryu, Y., Tabuchi, M., Waltzek, T. B., Enge, K. M., Reintjes-Tolen, S., Preston, A., & Pessier, A. P. (2013). Co-infection by alveolate parasites and frog virus 3-like ranavirus during an amphibian larval mortality event in Florida, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(2), 89–99. <https://doi.org/10.3354/dao02625>
- Lastra González, D., Baláž, V., Solský, M., Thumsová, B., Kolenda, K., Najbar, A., Najbar, B., Kautman, M., Chajma, P., Balogová, M., & Vojar, J. (2019). Recent findings of potentially lethal salamander fungus *batrachochytrium salamandrivorans*. *Emerging Infectious Diseases*, 25(7), 1416–1418. <https://doi.org/10.3201/eid2507.181001>
- Lastra González, D., Baláž, V., Chajma, P., & Vojar, J. (2020). Surveying for *Batrachochytrium salamandrivorans* presence in Spanish captive collections of amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*, 142, 99–103. <https://doi.org/10.3354/DAO03535>
- Lastra González, D., Baláž, V., Vojar, J., & Chajma, P. (2021). Dual detection of the chytrid fungi *Batrachochytrium* spp. with an enhanced environmental DNA approach. *Journal of Fungi*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/jof7040258>
- Lawson, B., Petrovan, S. O., & Cunningham, A. A. (2015). Citizen Science and Wildlife Disease Surveillance. *EcoHealth*, 12(4), 693–702. <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1054-z>
- Leuven, R. S. E. W., den Hartog, C., Christiaans, M. M. C., & Heijligers, W. H. C. (1986). Effects of water acidification on the distribution pattern and the reproductive success of amphibians. *Experientia*, 42(5), 495–503. <https://doi.org/10.1007/BF01946687>
- Lewis, R. E., Diekema, D. J., Messer, S. A., Pfaller, M. A., & Klepser, M. E. (2002). Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(2), 345–351. <https://doi.org/10.1093/jac/49.2.345>
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., & Nichols, D. K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219–227. <https://doi.org/10.2307/3761366>
- Lötters, S., Wagner, N., Albaladejo, G., Böning, P., Dalbeck, L., Düssel, H., Feldmeier, S., Guschal, M., Kirst, K., Ohlhoff, D., Preissler, K., Reinhardt, T., Schlüppmann, M., Schulte, U., Schulz, V., Steinfartz, S., Twietmeyer, S., Veith, M., Vences, M., & Wegge, J. (2020). The amphibian pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in the hotspot of its European invasive range: Past – present – future. *Salamandra*, 56(3), 173–188.

- Loudon, A. H., Holland, J. A., Umile, T. P., Burzynski, E. A., Minbiole, K. P. C., & Harris, R. N. (2014). Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG), 104366. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00441>
- Loyau, A., Cornuau, J. H., Clare, F. C., & Schmeller, D. S. (2016). Side effects of itraconazole on post-metamorphic *Alytes obstetricans* after a cold stress. *Amphibia-Reptilia*, 37(4), 345–357. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003064>
- Mader, D. R. (2006). *Reptile Medicine and Surgery*, 2nd edn. Saunders Elsevier, St Louis.
- Marquis, O., Miaud, C., Gibault, C., & Chai, N. (2019). A first screening of chytrid fungus *Batrachochytrium* in amphibians in French zoos. *International Zoo Yearbook*, 53(1), 217–226. <https://doi.org/10.1111/izy.12210>
- Martel, A., Van Rooij, P., Vercauteren, G., Baert, K., Van Waeyenberghe, L., Debacker, P., Garner, T. W. J., Woeltjes, T., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2011). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 49(2), 143–149. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.508185>
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M. C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., & Pasmans, F. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), 15325–15329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>
- Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M. C., Farrer, R. A., Schmidt, B. R., Tobler, U., Goka, K., Lips, K. R., Mulet, C., Zamudio, K. R., Bosch, J., Lötters, S., Wombwell, E., Garner, T. W. J., Cunningham, A. A., Spitzen-van der Sluijs, A., Salvidio S., Ducatelle R., Nishikawa K., Nguyen T. T., Kolby J. E., Van Bocxlaer I., Bossuyt F. & Pasmans F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, 346(6209), 630–631. <https://doi.org/10.1126/science.1258268>
- Martel, A., Vila-Escale, M., Fernández-Giberteau, D., Martínez-Silvestre, A., Canessa, S., Van Praet, S., Pannon, P., Chiers, K., Ferran, A., Kelly, M., Picart, M., Piulats, D., Li, Z., Pagone, V., Pérez-Sorribes, L., Molina, C., Tarragó-Guarro, A., Velarde-Nieto, R., Carbonell, F., Obon E., Martínez-Martínez D., Guinart D., Casanovas R., Carranza S., & Pasmans, F. (2020). Integral chain management of wildlife diseases. *Conservation Letters*, 13(2). <https://doi.org/10.1111/conl.12707>
- Martínez-Silvestre, A., Melero, A., Verdaguer, I., & Velarde, R. (2017). Clinical assessment in wild newts (Amphibia, Urodela) in Catalonia (NE Spain). *Proceedings. 3rd International Conference on Avian Herpetological and Exotic Mammal Medicine*, 387–389.
- McCaffery, R., Richards-Zawacki, C. L., & Lips, K. R. (2015). The demography of *Atelopus* decline: Harlequin frog survival and abundance in central Panama prior to and during a disease outbreak. *Global Ecology and Conservation*, 4, 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.07.003>
- McMahon, T. A., Brannelly, L. A., Chatfield, M. W. H., Johnson, P. T. J., Joseph, M. B., McKenzie, V. J., Richards-Zawacki, C. L., Venesky, M. D., & Rohr, J. R. (2013). Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), 210–215. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200592110>
- Mikaelian, I., Ouellet, M., Pauli, B., Rodrigue, J., Harshbarger, J. C., & Green, D. M. (2000). Ichthyophonous-like infection in wild amphibians from Quebec, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40(3), 195–201. <https://doi.org/10.3354/dao040195>
- Mikátová, B., & Vlašín, M. (2002). *Ochrana obojživelníků*. EkoCentrum, Brno.
- More, S., Angel Miranda, M., Bicout, D., Bøtner, A., Butterworth, A., Calistri, P., Depner, K., Edwards, S., Garin-Bastuji, B., Good, M., Michel, V., Raj, M., Saxmose Nielsen, S., Sihvonen, L., Spooler, H., Stegeman, J. A., Thulke, H. H., Velarde, A., Willeberg, P., Winckler CH., Baláž V., Martel A., Murray K., Fabris Ch., Munoz-Gajardo I., Gogin A., Verdonck F., & Schmidt, CH. G. (2018). Risk of survival,

- establishment and spread of *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) in the EU. *EFSA Journal*, 16(4), 5259. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5259>
- Muir, A. P., Kilbride, E., & Mable, B. K. (2015). Spatial variation in species composition of Saprolegnia, a parasitic oomycete of amphibian eggs, in Scotland. *Herpetological Journal*, 25, 257–263.
- Muths, E., Bailey, L. L., & Watry, M. K. (2014). Animal reintroductions: An innovative assessment of survival. *Biological Conservation*, 172, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.02.034>
- Muths, E., & McCallum, H. (2016). 10. Why You Cannot Ignore Disease When You Reintroduce Animals. In *Reintroduction of Fish and Wildlife Populations* (pp. 217–244). University of California Press. <https://doi.org/10.1525/9780520960381-012>
- Mutschmann, F. (2004). Pathological changes in African hyperoliid frogs due to a myxosporidian infection with a new species of Hoferellus (Myxozoa). *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(3), 215–222. <https://doi.org/10.3354/dao060215>
- Mutschmann, F. (2015). Chytridiomycosis in Amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24, 276–282. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506315000762>
- O’Hanlon, S. J., Rieux, A., Farrer, R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T. A., Murray, K. A., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M. D., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K. A., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E. A., ... Fisher, M. C. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360(6389), 621–627. <https://doi.org/10.1126/science.aar1965>
- OIE. (2015). *World Organisation for Animal Health (OIE) and CITES agree to collaborate on animal health and welfare issues worldwide to safeguard biodiversity and protect animals*. (online) [cit.2023.06.14] <https://www.oie.int/en/for-the-media/press-releases/detail/article/world-organisation-for-animal-health-oie-and-cites-agree-to-collaborate-on-animal-health-and-welfare/>
- OIE. (2020). *OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2020*. (online) [cit.2023.06.14] <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>
- Olson, D. H., Aanensen, D. M., Ronnenberg, K. L., Powell, C. I., Walker, S. F., Bielby, J., Garner, T. W. J., Weaver, G., & Fisher, M. C. (2013). Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS ONE*, 8(2), e56802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056802>
- Origgi, F. C., Schmidt, B. R., Lohmann, P., Otten, P., Akdesir, E., Gaschen, V., Aguilar-Bultet, L., Wahli, T., Sattler, U., & Stoffel, M. H. (2017). Ranid Herpesvirus 3 and Proliferative Dermatitis in Free-Ranging Wild Common Frogs (*Rana temporaria*). *Veterinary Pathology*, 54(4), 686–694. <https://doi.org/10.1177/0300985817705176>
- Origgi, F. C., Schmidt, B. R., Lohmann, P., Otten, P., Meier, R. K., Pisano, S. R. R., Moore-Jones, G., Tecilla, M., Sattler, U., Wahli, T., Gaschen, V., & Stoffel, M. H. (2018). Bufonid herpesvirus 1 (BfHV1) associated dermatitis and mortality in free ranging common toads (*Bufo bufo*) in Switzerland. *Scientific Reports*, 8(1), 14737. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32841-0>
- Origgi, F. C., Otten, P., Lohmann, P., Sattler, U., Wahli, T., Lavazza, A., Gaschen, V., & Stoffel, M. H. (2021). Herpesvirus-Associated Proliferative Skin Disease in Frogs and Toads: Proposed Pathogenesis. *Veterinary Pathology*, 58(4), 713–729. <https://doi.org/10.1177/03009858211006385>
- Ortiz-Santaliestra, M. E., Fisher, M. C., Fernández-Beaskoetxea, S., Fernández-Benítez, M. J., & Bosch, J. (2011). Ambient Ultraviolet B Radiation and Prevalence of Infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* in Two Amphibian Species. *Conservation Biology*, 25(5), 975–982. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01700.x>
- Paperna, I., & Lainson, R. (1995). *Allogluzea bufonis* nov. gen., nov. sp. (Microsporea: Glugeidae), a microsporidian of *Bufo marinus* tadpoles and metamorphosing toads (Amphibia: Anura) from Amazonian Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23(1), 7–16. <https://doi.org/10.3354/dao023007>

- Paperna, I., Ogara, W., & Schein, M. (1997). *Goussia hyperolisi* n. sp.: A coccidian infection in reed frog *Hyperolis viridiflavus* tadpoles which expires towards metamorphosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31(2), 79–88. <https://doi.org/10.3354/dao031079>
- Parris, M. J., Reese, E., & Storfer, A. (2006). Antipredator behavior of chytridiomycosis-infected northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. *Canadian Journal of Zoology*, 84(1), 58–65. <https://doi.org/10.1139/z05-175>
- Pasmans, F., Hellebuyck, T., Martel, A., Bogaerts, S., Braeckman, J., Cunningham, A. A., Griffiths, R. A., Sparreboom, M., & Schmidt, B. R. (2017). Future of keeping pet reptiles and amphibians: Towards integrating animal welfare, human health and environmental sustainability. *Veterinary Record*, 181(17), 450. <https://doi.org/10.1136/vr.104296>
- Perotti, M. G., Basanta, M. D., Steciow, M. M., Sandoval-Sierra, J. V., & Diéguez-Uribeondo, J. (2013). Early breeding protects anuran eggs from Saprolegnia infection. *Austral Ecology*, 38(6), 672–679. <https://doi.org/10.1111/aec.12014>
- Perpiñán, D., Garner, M. M., Trupkiewicz, J. G., Malarchik, J., Armstrong, D. L., Lucio-Forster, A., & Bowman, D. D. (2010). Scoliosis in a tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) associated with encysted digenetic trematodes of the genus clinostomum. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(2), 579–584. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.2.579>
- Pessier, A. P. (2018). Amphibia-Chapter 38. In *Pathology of Wildlife and Zoo Animals* (pp. 921–947, 947.e1-947.e8, 948–951). Academic Press.
- Pessier, A. P., Baitchman, E. J., Crump, P., Wilson, B., Griffith, E., & Ross, H. (2014). Causes of mortality in anuran amphibians from an ex situ survival assurance colony in Panama. *Zoo Biology*, 33(6), 516–526. <https://doi.org/10.1002/zoo.21166>
- PIJAC. (2015). *Pet Industry Joint Advisory Council*. (online) [cit.2023.06.14] <https://petadvocacy.org/>
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9–15.
- Plesník, J., & Chobot, K. (2017). Červené seznamy a knihy jako významný přístup k hodnocení druhů a dalších vybraných složek biologické rozmanitosti. *Příroda*, 34, 8–35.
- Pounds, J. A. (2001). Climate and amphibian declines. *Nature*, 410(6829), 639–640. <https://doi.org/10.1038/35070683>
- Pounds, J. A., & Crump, M. (1994). Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, 8(1), 72–85.
- Pounds, J. A., Fogden, M. P. L., Savage, J. M., & Gorman, G. C. (1997). Tests of Null Models for Amphibian Declines on a Tropical Mountain. *Conservation Biology*, 11(6), 1307–1322. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1997.95485.x>
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P. L., Foster, P. N., La Marca, E., Masters, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S. R., Sánchez-Azofeifa, G. A., Still, C. J., & Young, B. E. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161–167. <https://doi.org/10.1038/nature04246>
- Price, S. J., Garner, T. W. J., Nichols, R. A., Balloux, F., Ayres, C., Mora-Cabello de Alba, A., & Bosch, J. (2014). Collapse of Amphibian Communities Due to an Introduced Ranavirus. *Current Biology*, 24(21), 2586–2591. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.028>
- Price, S. J., Wadia, A., Wright, O. N., Leung, W. T. M., Cunningham, A. A., & Lawson, B. (2017). Screening of a long-term sample set reveals two Ranavirus lineages in British herpetofauna. *PLoS ONE*, 12(9), e0184768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184768>
- Primack, R. B. (2006). *Essentials of Conservation Biology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Sunderland, U.S.A.
- Raffel, T. R., Dillard, J. R., & Hudson, P. J. (2006). Field evidence for leech-borne transmission of amphibian *Ichthyophonus* sp. *Journal of Parasitology*, 92(6), 1256–1264. <https://doi.org/10.1645/GE-808R1.1>

- Rachowicz, L., & Vredenburg, V. (2004). Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1–2), 75–83. <https://doi.org/10.3354/dao061075>
- Relyea, R. A. (2011). Amphibians Are Not Ready for Roundup®. *Springer*, 3, 267–300. https://doi.org/10.1007/978-0-387-89432-4_9
- Richgels, K. L. D., Russell, R. E., Adams, J., White, C. L., & Campbell, E. H. (2016). Spatial variation in risk and consequence of *Batrachochytrium* introduction in the USA Subject Areas : *Royal Society of Open Science*, 3, 150616. <https://doi.org/10.1098/rsos.150616>
- Robinson, J., Griffiths, R. A., & Jeffries, P. (2003). Susceptibility of frog (*Rana temporaria*) and toad (*Bufo bufo*) eggs to invasion by *Saprolegnia*. *Amphibia Reptilia*, 24(3), 261–268. <https://doi.org/10.1163/156853803322440745>
- Rohr, J. R., Schotthoefer, A. M., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Halstead, N., Hoverman, J. T., Johnson, C. M., Johnson, L. B., Lieske, C., Piwoni, M. D., Schoff, P. K., & Beasley, V. R. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455(7217), 1235–1239. <https://doi.org/10.1038/nature07281>
- Romansic, J. M. (2007). *The Effects of Multiple Pathogens on Amphibians in the Pacific Northwest*. Disertační práce, Oregon State University, Zoology, Oregon. 163 pp. (nepublikováno).
- Rosa, G. M., Sabino-Pinto, J., Laurentino, T. G., Martel, A., Pasmans, F., Rebelo, R., Griffiths, R. A., Stöhr, A. C., Marschang, R. E., Price, S. J., Garner, T. W. J., & Bosch, J. (2017). Impact of asynchronous emergence of two lethal pathogens on amphibian assemblages. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep43260>
- Rowley, J. J. L., Shepherd, C. R., Stuart, B. L., Nguyen, T. Q., Hoang, H. D., Cutajar, T. P., Wogan, G. O. U., & Phimmachak, S. (2016). Estimating the global trade in Southeast Asian newts. *Biological Conservation*, 199, 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.05.001>
- Sabino-Pinto, J., Bletz, M., Hendrix, R., Perl, R. G. B., Martel, A., Pasmans, F., Lötters, S., Mutschmann, F., Schmidt, B. R., Schmeller, D. S., Veith, M., Wagner, N., Vences, M., & Steinfartz, S. (2015). First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Germany. *Amphibia-Reptilia*, 36(4), 411–416. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003008>
- Schadich, E., & Cole, A. L. J. (2010). Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* to brown tree frogs (*Litoria ewingii*). *Comparative Medicine*, 60(2), 114–117.
- Scheele, B. C., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A. A., Burrowes, P. A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De la Riva, I., Fisher, M. C., Flechas, S. V., Foster, C. N., Frías-Álvarez, P., & Pasmans, F. T. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459–1463. <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aav0379>
- Schlaepfer, M. A., Hoover, C., & Dodd, C. K. (2005). Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *BioScience*, 55(3), 256–264. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0256:CJETIO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0256:CJETIO]2.0.CO;2)
- Scheele, B. C., Hunter, D. A., Grogan, L. F., Berger, L., Kolby, J. E., Mcfadden, M. S., Marantelli, G., Skerratt, L. F., & Driscoll, D. A. (2014). Interventions for reducing extinction risk in Chytridiomycosis-Threatened Amphibians. *Conservation Biology*, 28(5), 1195–1205. <https://doi.org/10.1111/cobi.12322>
- Schloegel, L. M., Picco, A. M., Kilpatrick, A. M., Davies, A. J., Hyatt, A. D., & Daszak, P. (2009). Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation*, 142(7), 1420–1426. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.007>
- Schloegel, L. M., Daszak, P., Cunningham, A. A., Speare, R., & Hill, B. (2010). Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): An assessment. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(2–3), 101–108. <https://doi.org/10.3354/dao02140>

- Schmidt, B. (2016). Import ban for salamanders and newts in Switzerland. Why? (Importverbot für Salamander und Molche in die Schweiz: Warum?). *Terraria/Elaphe*, 57(57), 8–9.
- Schmidt, B. R., Bozzuto, C., Lötters, S., & Steinfartz, S. (2017). Dynamics of host populations affected by the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Royal Society Open Science*, 4(3). <https://doi.org/10.1098/rsos.160801>
- Searle, C. L., Mendelson, J. R., Green, L. E., & Duffy, M. A. (2013). Daphnia predation on the amphibian chytrid fungus and its impacts on disease risk in tadpoles. *Ecology and Evolution*, 3(12), 4129–4138. <https://doi.org/10.1002/ece3.777>
- Seimon, T. A., Seimon, A., Daszak, P., Halloy, S. R. P., Schloegel, L. M., Aguilar, C. A., Sowell, P., Hyatt, A. D., Konecky, B., & Simmons, J. E. (2007). Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. *Global Change Biology*, 13(1), 288–299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01278.x>
- Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A., & Krest, S. K. (2010). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles Second Edition*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, Florida. <https://doi.org/10.1201/EBK1420064162>
- Spitzen-van der Sluijs, A. (2018). *It takes three to tango The impact of chytridiomycosis on native amphibians in the Netherlands*. Disertační práce, Ghent University. (nepublikováno) <https://biblio.ugent.be/publication/8580382>
- Spitzen-van der Sluijs, A., Spikmans, F., Bosman, W., Zeeuw, M. de, Meij, T. van der, Goverse, E., Kik, M., Pasmans, F., & Martel, A. (2013). Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia*, 34(2), 233–239. <https://doi.org/10.1163/15685381-00002891>
- Spitzen-van der Sluijs, A., Martel, A., Asselberghs, J., Bales, E. K., Beukema, W., Bletz, M. C., Dalbeck, L., Goverse, E., Kerres, A., Kinet, T., Kirst, K., Laudelout, A., Marin da Fonte, L. F., Nöllert, A., Ohlhoff, D., Sabino-Pinto, J., Schmidt, B. R., Speybroeck, J., Spikmans, F., & Lötters, S. (2016). Expanding Distribution of Lethal Amphibian Fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1286–1288. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160109>
- Stegen, G., Pasmans, F., Schmidt, B. R., Rouffaer, L. O., Van Praet, S., Schaub, M., Canessa, S., Laudelout, A., Kinet, T., Adriaensen, C., Haesebrouck, F., Bert, W., Bossuyt, F., & Martel, A. (2017). Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Nature*, 544(7650), 353–356. <https://doi.org/10.1038/nature22059>
- Stejskal, V. (2006). *Úvod do právní ochrany přírody a péče o biologickou rozmanitost*. Linde, Praha.
- Stockwell, M. P., Clulow, J., & Mahony, M. J. (2015). Evidence of a salt refuge: chytrid infection loads are suppressed in hosts exposed to salt. *Oecologia*, 177(3), 901–910. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3157-6>
- Svobodová Z. [ed.]. (1987). *Toxikologie vodních živočichů*. MZVŽ ČSR, Praha.
- Temple, H. J., & Cox, N. A. (2009). *European Red List of Amphibians*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Thein, J., Reck, U., Dittrich, C., Martel, A., Schulz, V., & Hansbauer, G. (2020). Preliminary report on the occurrence of *batrachochytrium salamandrivorans* in the steigerwald, bavaria, germany. *Salamandra*, 56(3), 227–229.
- Thomas, V., Blooi, M., Van Rooij, P., Van Praet, S., Verbrugghe, E., Grasselli, E., Lukac, M., Smith, S., Pasmans, F., & Martel, A. (2018). Recommendations on diagnostic tools for *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), e478–e488. <https://doi.org/10.1111/tbed.12787>
- Thomas, V., Wang, Y., Van Rooij, P., Verbrugghe, E., Baláž, V., Bosch, J., Cunningham, A. A., Fisher, M. C., Garner, T. W. J., Gilbert, M. J., Grasselli, E., Kinet, T., Laudelout, A., Lötters, S., Loyau, A., Miaud, C., Salvidio, S., Schmeller, D. S., Schmidt, B. R., ... Pasmans, F. (2019). Mitigating *Batrachochytrium*

salamandrivorans in Europe. *Amphibia Reptilia*, 40(3), 265–290. <https://doi.org/10.1163/15685381-20191157>

Tollefsen, K. E., Song, Y., Kleiven, M., Mahrosh, U., Meland, S., Rosseland, B. O., & Teien, H. C. (2015). Transcriptional changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after embryonic exposure to road salt. *Aquatic Toxicology*, 169, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.003>

Trombulak, S. C., & Frissell, C. A. (2000). Review of Ecological Effects of Roads on Terrestrial and Aquatic Communities. *Conservation Biology*, 14(1), 18–30. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.99084.x>

Uller, T., Sagvik, J., & Olsson, M. (2009). Pre-hatching exposure to water mold reduces size at metamorphosis in the moor frog. *Oecologia*, 160(1), 9–14. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1280-6>

UNEP-WCMC. (2016). *Review of the risk posed by importing Asiatic species of Caudate amphibians (salamanders and newts) into the EU*. SRG 76/10. UNEP-WCMC, Cambridge.

Valentine, B. A., & Stoskopf, M. K. (1984). Amebiasis in a neotropical toad. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(11), 1418–1419. <https://europepmc.org/article/med/6439711>

Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2015). Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research*, 46(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0266-0>

Van Rooij, P., Pasmans, F., Coen, Y., & Martel, A. (2017). Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. *PLoS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186269>

van West, P. (2006). *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*, 20(3), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.mycol.2006.06.004>

Vergneau-Grosset, C., & Larrat, S. (2016). Microsporidiosis in vertebrate companion exotic animals. *Journal of Fungi*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.3390/jof2010003>

Vojar, J. (2007). *Ochrana obojživelníků: ohrožení, biologické principy, metody studia, legislativní a praktická ochrana. Doplněk k metodice č. 1 Českého svazu ochránců přírody*. ZO ČSOP Hasina Louny.

Vojar, J., Solský, M., Baláž, V., & Jeřábková, L. (2021). Výskyt patogenní plísně *Batrachochytrium dendrobatidis* v rámci evropsky významných lokalit našich obojživelníků. *Příroda*, 42, 33–44. <http://www.priroda.nature.cz/index.php/priroda/article/view/29>

Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R. A., Skerratt, L. F., & Speare, R. (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5952), 582–585. <https://doi.org/10.1126/science.1176765>

Vredenburg, V. T., Knapp, R. A., Tunstall, T. S., & Briggs, C. J. (2010). Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9689–9694. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914111107>

Walker, S. F., Bosch, J., James, T. Y., Litvintseva, A. P., Oliver Valls, J. A., Piña, S., García, G., Rosa, G. A., Cunningham, A. A., Hole, S., Griffiths, R., & Fisher, M. C. (2008). Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Current Biology*, 18(18), R853–R854. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2008.07.033>

Wake, D. B. (1991). Declining amphibian populations. *Science (New York, N.Y.)*, 13(4), 8–12.

Weldon, C., Du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., & Speare, R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2100–2105. <https://doi.org/10.3201/eid1012.030804>

White, C. L., Forzan, M. J., Pessier, A. P., Allender, M. C., Ballard, J. R., Catenazzi, A., Fenton, H., Martel, A., Pasmans, F., Miller, D. L., Ossiboff, R. J., & Richgels, K. (2016). Amphibian: A case definition for

Batrachochytrium salamandrivorans chytridiomycosis. *Herpetological Review*, 47(2), 207. <https://pubs.er.usgs.gov/publication/70188104>

Whittington, R., & Reddacliff, G. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redbfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Australian Veterinary Journal*, 72(11), 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1995.tb06193.x>

Wilcove, D., McLellan, C., & Dobson, A. (1986). Habitat fragmentation in the temperate zone. In M. E. Soulé (Ed.), *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity* (Vol. 6, pp. 237–256). Sinauer Associates.

Williams, E. S., Yuill, T., Artois, M., Fischer, J., & Haigh, S. A. (2002). Emerging infectious diseases in wildlife. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, 21(1), 139–157. <https://doi.org/10.20506/rst.21.1.1327>

Williams, T., Barbosa-Solomieu, V., & Chinchar, V. G. (2005). A Decade of Advances in Iridovirus Research. *Advances in Virus Research*, 65, 173–248. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)65006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(05)65006-3)

Woodhams, D. C., Alford, R. A., & Marantelli, G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55(1), 65–67. <https://doi.org/10.3354/dao055065>

Woodhams, D. C., Bosch, J., Briggs, C. J., Cashins, S., Davis, L. R., Lauer, A., Muths, E., Puschendorf, R., Schmidt, B. R., Sheafor, B., Voyles, J., Redford, K., Sanjayan, M., Donlon, C., Berger, J., Bock, C., Bock, J., Burney, D., Estes, J., & Boots, M. (2011). Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in Zoology*, 8(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-8-8>

Woodhams, D. C., Bletz, M., Kueneman, J., & McKenzie, V. (2016). Managing Amphibian Disease with Skin Microbiota. *Trends in Microbiology*, 24(3), 161–164. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.010>

Yap, T. A., Koo, M. S., Ambrose, R. F., Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2015). Averting a North American biodiversity crisis. *Science*, 349(6247), 481–482. <https://doi.org/10.1126/science.aab1052>

Yap, T. A., Nguyen, N. T., Serr, M., Shepack, A., & Vredenburg, V. T. (2017). *Batrachochytrium salamandrivorans* and the Risk of a Second Amphibian Pandemic. *EcoHealth*, 14(4), 851–864. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1278-1>

Young, S., Berger, L., & Speare, R. (2007). Amphibian chytridiomycosis: Strategies for captive management and conservation. *International Zoo Yearbook*, 41(1), 85–95. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2007.00010.x>

Yuan, Z., Martel, A., Wu, J., Van Praet, S., Canessa, S., & Pasmans, F. (2018). Widespread occurrence of an emerging fungal pathogen in heavily traded Chinese urodelan species. *Conservation Letters*, 11(4), 11. <https://doi.org/10.1111/conl.12436>

Zavadil, V., Sádlo, J., & Vojar, J. (2011). Biotopy našich obojživelníků a jejich management. *Metodika AOPK ČR. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha*.

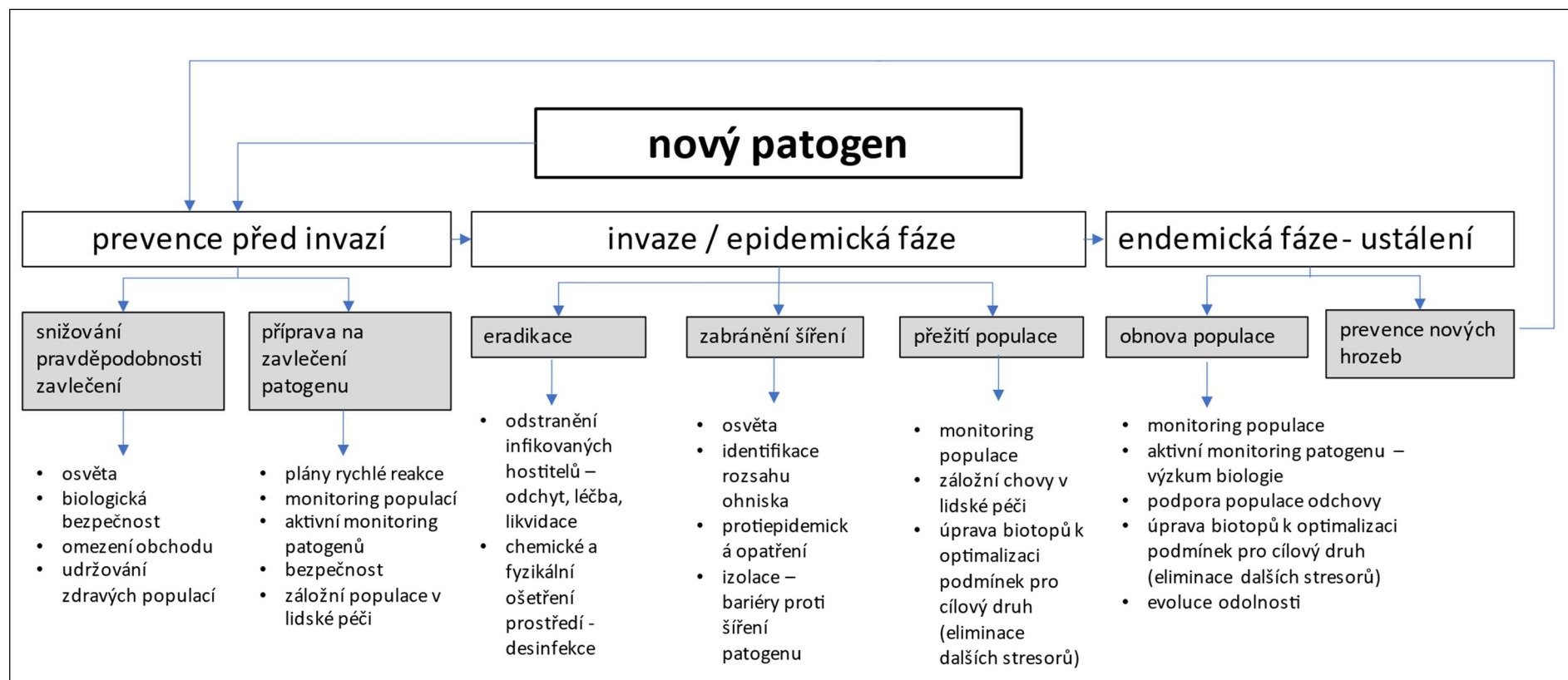
Zhu, W., Xu, F., Bai, C., Liu, X., Wang, S., Gao, X., Yan, S., Li, X., Liu, Z., & Li, Y. (2014). A survey for *Batrachochytrium salamandrivorans* in Chinese amphibians. *Current Zoology*, 60(6), 729–735. <https://doi.org/10.1093/czoolo/60.6.729>

8. Přílohy

Příloha 1: Přehled opatření vůči patogenu *Bsal* v jednotlivých fázích nákazy

Příloha 2: Přehled známé interakce obojživelníků s výskytem v ČR a vybraných patogenů

Příloha 1: Přehled opatření vůči patogenu *Bsal* v jednotlivých fázích nákazy (upraveno podle Spitzen-van der Sluijs et al. 2018).



Příloha 2: Přehled známé interakce obojživelníků s výskytem v ČR a vybraných patogenů

Český název	Latinský název	patogen								
		Chytridiomycety		Viry		Prvoci			Oomycety	Členovci
		<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	Ranavirus	Herpesvirus	Perkinsea	<i>Amphibiocystidium ranae</i>	<i>Amphibiothecum meredithae</i>	<i>Saprolegnia</i> sp.	<i>Lucilia bufonivora</i>
Mlok skvrnitý	<i>Salamandra salamandra</i>	vnímavý	citlivý	vnímavý						
Čolek velký	<i>Triturus cristatus</i>	vnímavý	citlivý	vnímavý						
Čolek dravý	<i>Triturus carnifex</i>	vnímavý	citlivý*	vnímavý						
Čolek dunajský	<i>Triturus dobrogicus</i>	vnímavý	citlivý*	vnímavý						
Čolek horský	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	vnímavý	citlivý	vnímavý						
Čolek obecný	<i>Lissotriton vulgaris</i>	vnímavý	citlivý	vnímavý						
Čolek karpatský	<i>Lissotriton montandoni</i>	vnímavý	citlivý*	vnímavý						
Čolek hranatý	<i>Lissotriton helveticus</i>	vnímavý	citlivý	vnímavý				vnímavý		
Kuňka obecná	<i>Bombina bombina</i>	vnímavý	odolný*							
Kuňka žlutobřichá	<i>Bombina variegata</i>	vnímavý	odolný							
Blatnice skvrnitá	<i>Pelobates fuscus</i>	vnímavý	odolný	citlivý	vnímavý					
Ropucha obecná	<i>Bufo bufo</i>	vnímavý	odolný*	vnímavý	vnímavý					citlivý
Ropucha zelená	<i>Bufo viridis</i>	vnímavý	odolný*	vnímavý						
Ropucha krátkonohá	<i>Epidalea calamita</i>	vnímavý	odolný	vnímavý						
Rosnička zelená	<i>Hyla arborea</i>	odolný	odolný			vnímavý				
Skokan hnědý	<i>Rana temporaria</i>	tolerantní	odolný	citlivý	vnímavý				vnímavý	
Skokan ostronosý	<i>Rana arvalis</i>	tolerantní	odolný*	citlivý	vnímavý					
Skokan štíhlý	<i>Rana dalmatina</i>	tolerantní	odolný*	citlivý	vnímavý					
Skokan skřehotavý	<i>Pelophylax ridibundus</i>	vnímavý	odolný*	citlivý						
Skokan krátkonohý	<i>Pelophylax lessonae</i>	vnímavý	odolný*	citlivý			vnímavý			
Skokan zelený	<i>Pelophylax esculentus</i>	vnímavý	odolný*	citlivý						

*Označuje předpokládanou citlivost k infekci na základě příbuznosti k druhům, u kterých je citlivost dobře prozkoumaná. Dále je uvedena citlivost obojživelníků:

odolný	nedochází k infekci	tolerantní	infekce vzácně, bez následků	vnímavý	infekce nastávají, významnost podle okolností	citlivý	infekce snadná, časté úhyny		bez informací
--------	---------------------	------------	------------------------------	---------	---	---------	-----------------------------	--	---------------

