

15/2022
FUNKČNÍ
VZOREK

DIAGNOSTICKÁ SOUPRAVA
RT-qPCR FLAVident na detekci
a kvantifikaci *Flavobacterium
psychrophilum* ve vzorcích vody,
tkání a kožních stěrů

Mgr. Radek Šindelka, Ph.D.

Mgr. Jan Mendel, Ph.D.

Funkční vzorek 15/2022

**DIAGNOSTICKÁ SOUPRAVA
RT-qPCR FLAVident na detekci
a kvantifikaci *Flavobacterium
psychrophilum* ve vzorcích vody,
tkání a kožních stěrů**

Mgr. Radek Šindelka, Ph.D.

Mgr. Jan Mendel, Ph.D.

Funkční vzorek vznikl za finanční podpory projektu NAZV QK21010030 - Globalizace, moderní technologie a změna klimatu jako zdroje nových možností a ohrožení pro chovný management lososovitých ryb.

Podíl autorů:

Mgr. Radek Šindelka, Ph.D., 50%

Mgr. Jan Mendel, Ph.D., 50%

Adresa autorů:

Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Průmyslová 595, Vestec 252 50

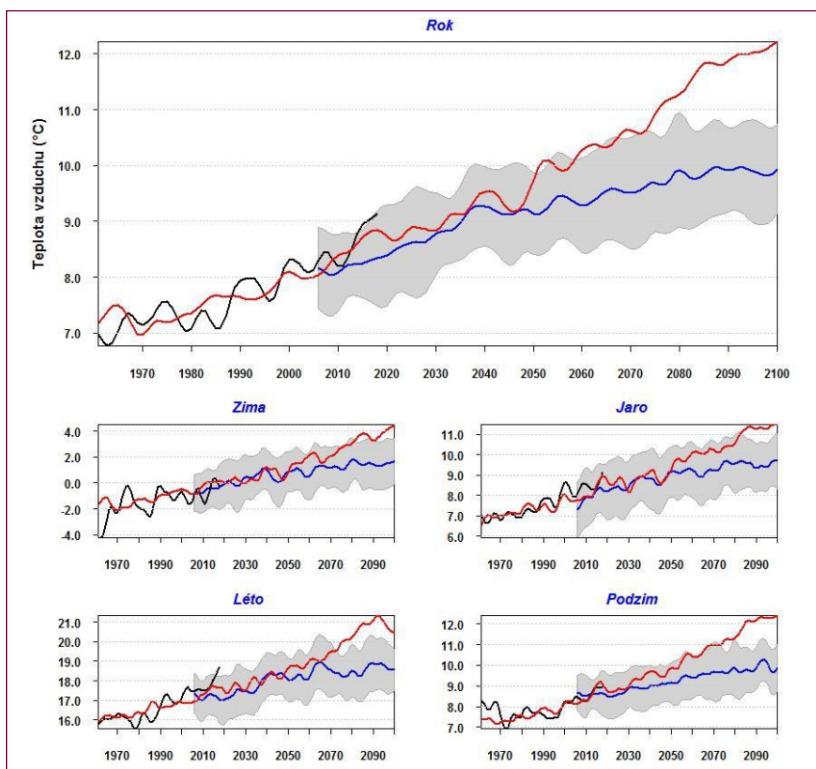
Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 8, Brno 603 00

Obsah

1. Úvod	4
2. Cíl vývoje funkčního vzorku	6
3. Popis funkčního vzorku	6
3.1. Metodika funkčního vzorku	6
3.2. Validace funkčního vzorku	7
4. Srovnání novosti postupů	9
5. Uplatnění funkčního vzorku	9
6. Ekonomické aspekty	9
7. Seznam použité literatury	10

1. Úvod

Změny klimatu i vysoká dynamika obchodu se zbožím jsou realitou, na kterou je třeba adekvátně reagovat. V oblasti udržitelnosti hospodaření s přírodními zdroji je třeba stále hledat nové rovnováhy a zkoušet nové přístupy. Obě skutečnosti - klimatické změny i proces globalizace mohou přinášet rybařství/akvakulturu své výhody i nevýhody a chovatelé by o nich měli vědět a s nimi ve svém chovném managementu adekvátně pracovat. Institut CzechGlobe ve své studii Očekávané klimatické podmínky v ČR (Štěpánek a kol., 2019) předpovídá, že se do roku 2050 pravděpodobně oteplí nejméně o další 2 °C (Obr. 1; modrý scénář). A pokud



Obr. 1.:

Ensemblový průměr z vybraných 12 RCM simulací (modře – RCP4.5 spolu s pásy spolehlivosti, červeně – horší scénář RCP8.5) a průměr za celou ČR (černě) pro teplotu vzduchu, pro rok a jednotlivé sezóny, shlazeno nízkofrekvenčním Gaussovým filtrem pro 10 let.

lidstvo zásadně neomezí emise skleníkových plynů, tak ke konci tohoto století pak lze očekávat oteplení o 3–6 °C (červený scénář). V létě je zmiňován velmi reálný nárůst počtu tzv. tropických dnů, kdy maximální teplota dosáhne alespoň 30 °C a dle nejhoršího scénáře jich na konci století bude mnohem více (až 30), oproti letům 1981–2010, kdy jich bylo za rok evidováno 8. Zvýšený odpar vlivem extrémních teplot je jednou z hlavních příčin současného sucha a ztrát kvalitnějšího hlubinného vodního zdroje. Chovy ryb budou tak stále častěji čelit různým onemocněním typickým pro vyšší teploty a zrychleným vývojovým cyklům patogenů a parazitů, kdy už nepůjde o desítky dnů, ale jen o několik málo hodin (např. *Ichthyophthirius multifiliis*).

Vliv globalizace chápeme spíše pozitivně ve smyslu snazší dostupnosti informací i zkušeností s chovem ryb a snadnějšího obstarávání zahraničního chovného materiálu, včetně větší pestrosti nabídky i směrem k vyšší odolnosti linií než v minulosti. Současně ale vnímáme i její negativní vliv díky zavlečení cizích patogenů s novými liniemi do chovného prostředí nebo zakoupení nevhodných linií více vnímavých k různým onemocněním.

Zvýšení produkce ryb v podmínkách intenzivní akvakultury je jednou z priorit produkce ryb na evropské i národní úrovni. Z OP Rybářství v ČR je v rámci Priority Unie 2 podporován vznik systémů intenzivního chovu a RAS. Tyto systémy minimalizují potřebu vody, dopad intenzivního chovu na recipienty a jsou jedním z adaptačních mechanismů na nevyrovnané hydrologické poměry a další faktory probíhajících klimatických změn.

Podmínkou pro úspěšnou produkci zdravých ryb je však optimalizace podmínek prostředí, optimalizace výživy, znalost a monitoring genetických parametrů, eliminace a kontrola původců onemocnění, příp. mezihostitelů a vývoj i standardizace vhodných preventivních a léčebných zásahů.

V posledních letech byl zahájen cílenější monitoring některých onemocnění v těchto systémech se snahou o přesnější definování podmínek pro vznik i rozvoj nemocí, ale stále je to nedostačující. V českých chovech nejsou doposud zavedeny nejmodernější nástroje a přístupy, především na molekulární i geneticko-genomické bázi. Je zřejmé, že velké ekonomické ztráty v chovech lososovitých ryb způsobují úhyny ryb díky bakteriálním chorobám (furunkulóza, ERM, flavobakterióza) a parazitům (kožovec, rybmorka). Je běžnou praxí bakteriální choroby eliminovat chemoterapeutiky. Jejich časté používání má negativní dopady v podobě rezistentních kmenů a zbytkového množství zatěžující životní prostředí. Nesprávná aplikace chemoterapeutik (nedodržení ochranné lhůty) má negativní dopad i na kvalitu masa a na lidské zdraví (Benbrook, 2002).

Proto v případě managementu chovného prostředí je nezbytné navrhnout nová nebo vylepšená opatření vzhledem k eliminaci nebo snížení nežádoucích faktorů zatěžujících rybí obsádku i člověka (patogen, antibiotika, chemikálie, atd.). V případě managementu monitorovacích procesů je nezbytné prověřit stávající a nastavit nové preventivní (monitorovací) a varovné (ochranné) systémy v chovatelském managementu i s pomocí nejmodernějších molekulárně genetických metod.

2. Cíl vývoje funkčního vzorku

Cílem vývoje funkčního vzorku diagnostické soupravy RT-qPCR FLAVident bylo přinést do rybochovných zařízení spolehlivý a cenově dostupný nástroj pro monitoring chovného prostředí a včasnou detekci míry ohrožení nežádoucími patogeny. Vyvinout a validovat detekční systém založený na reverzně-transkripční PCR v reálném čase (RT-qPCR), který by umožňoval spolehlivou identifikaci a kvantifikaci *Flavobacterium psychrophilum* původce flavobakterióz (cytofagóza, anemický syndrom plůdku pstruha duhového) ve vzorcích vody, tkání a kožních stěrů v intenzivních chovech ryb.

3. Popis funkčního vzorku

3.1. Metodika funkčního vzorku

Metoda je založena na přímé kvantifikaci sekvence *F. psychrophilum* v různých typech vzorků. Po důkladné rešerši literárních zdrojů byl zvolen postup dle Orieux et al. (2011), kdy se sekvence oligonukleotidů navazuje na 16S rRNA oblast. Detekce probíhá v rámci RT-qPCR, kdy jsou RNA vzorky nejprve přepsány do cDNA s použitím random primerů a oligo-dT i Maxima H minus Transkriptase (ThermoFisher). qPCR byla provedena s TATAA SYBR® GrandMaster® Mix (TATAA Biocenter) s použitím firmou doporučeného teplotního profilu PCR reakce na přístroji Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad).

Metoda byla testována na různých vzorcích od izolované RNA z tkání (ledvina, slezina), kožních stěrů, vodních nanofiltrů, až po přímou detekci v odebraném vzorku vody. Všechny vzorky byly transportovány do laboratoře v zamraženém stavu (CO₂ pelety) a dlouhodoběji uchovávány při -20 °C. U vzorku vody po rozpuštění v pokojové teplotě byl odebrán alikvot, ke kterému byla přidána směs pro reverzní transkripci. Z připravené cDNA byla použita 1/15 vzorku

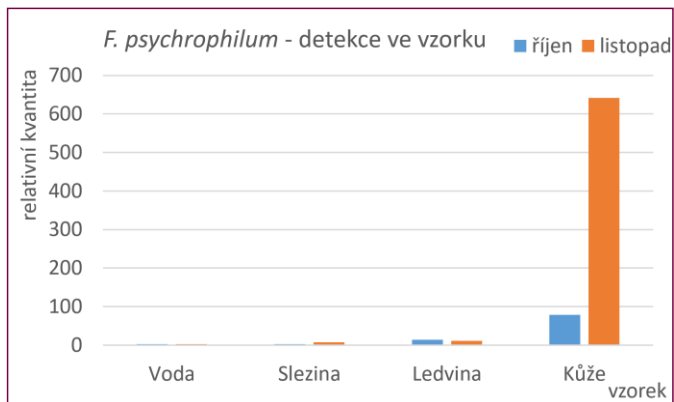
pro qPCR. Vodní nanofiltr byl transportován a uchováván stejně. Pro přípravu vzorku byl vystřižen 1 cm² ze středu a biologický materiál byl eluován do vody bez nukleáz. Roztok byl dále analyzován shodným postupem. Vzorky tkání a kožních stěrů byly izolovány pomocí TriReagent (Sigma-Aldrich) protokolu a 1000 ng RNA bylo použito pro reverzní transkripci a poté byla použita 1/50 pro qPCR. Pro ověření qPCR byla použita analýza křivek tání a všechny náležité kontroly. Jako negativní kontrola reakce bez templátu byla použita H₂O bez nukleáz. Jako pozitivní kontrola reakce byla použita bakteriální suspenze *F. psychrophilum* ATCC 49418 (1,19 × 10⁵ CFU/ml) připravená na pracovišti VETUNI, Brno.

3.2. Validace funkčního vzorku

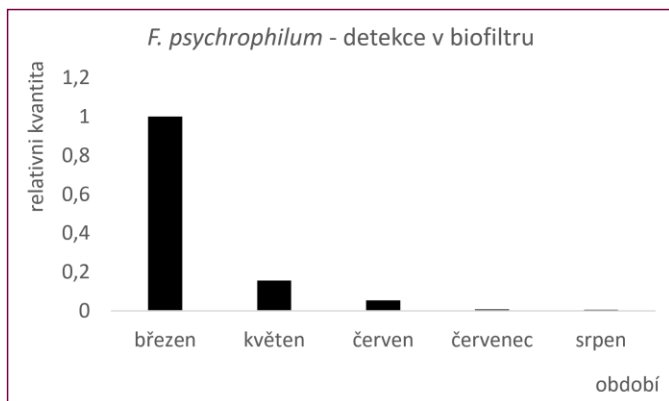
Efektivita funkčního vzorku byla testována a vyhodnocována na souboru vzorků odebíraných pravidelně v měsíčním intervalu v rybochovném zařízení v průběhu let 2021–2022. U některých jedinců bylo provedeno patoanatomické i bakteriální vyšetření a byla prokázána infekce způsobená *F. psychrophilum*.

V prvním kroku byl stanoven vliv teploty při transportu vzorku a nebyl shledán rozdíl mezi zamraženým vzorkem (CO₂ pelety) a vzorkem transportovaným při pokojové teplotě v rámci 1–2 dnů. Testovali jsme také degradaci materiálu během skladování a nepozorovali jsme úbytek při skladování v -20 °C po dobu několika měsíců. V dalším kroku jsme testovali vliv reverzní transkripce na výtěžek reakce a ukázalo se, že tento krok je velmi důležitý a umožňuje dramatické zvýšení výtěžku a tudíž sensitivity více jak 100×.

Detekce *F. psychrophilum* ve vzorcích vod byla prokázána v nižších hladinách i v letních a podzimních měsících u méně kvalitních zdrojů vod. Vysoké hladiny *F. psychrophilum* byly nalezeny také v kožních stěrech, což umožňuje šetrný neinvazivní odběr testovaného materiálu z rybochovných zařízení (Obr. 2). Vyšší hladiny výskytu *F. psychrophilum* byly zaznamenány v biofiltru v měsíci březnu se zřetelným poklesem směrem k letním měsícům (Obr. 3).



Obr. 2.:
Příklad hladin *F. psychrophilum* v různých vzorcích. Hodnoty jsou vztažené k výtěžku z odebrané vody v říjnu a listopadu 2021. Pro detekci jsou vhodné stěry z pokožky.



Obr. 3.:
Příklad hladin detekce *F. psychrophilum* z biofiltru vztažené k odběru v měsíci březnu

4. Srovnání novosti postupů

Motivací vývoje nové soupravy bylo připravit rychlý a obsluze snadno dostupný způsob monitoringu invazivních a neinvazivních vzorků z vodního prostředí pro včasné vyhodnocení míry ohrožení v rybochovných zařízeních. Tento servis chovatelům spolu s možností privátní evidence sezónní historie v e-Modulu Aquaculture softwaru S7iFish není v současné době zaveden a nabízen. Jedná se o nový prvek v chovatelském managementu, který je součástí moderního přístupu geneticky kontrolovaného chovu prosazovaném v celosvětovém měřítku. Současné přístupy detekce využívají kultivačních technik na speciálních půdách nebo pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS a na molekulární úrovni buď detekce přítomnosti patogenní DNA sekvenační technikou anebo izolace RNA, která je časově a finančně náročná. Náš přístup využívá detekci přímo ze vzorku vody, výplachu z nanofiltru či kožního stěru, kdy není třeba vzorek dále ošetřovat před reverzní transkripcí. Tato úprava znamená zrychlení celého postupu a redukci finančních prostředků. Jiné optimalizace kroků v přípravě a přepravě vzorků a detekce s minimální časovou investicí přináší další výraznou redukci finančních nákladů. Vývoj nového systému pro detekci hladin *F. psychrophilum* ve vzorcích vody, tkání a kožních stěrů reaguje na aktuální trendy použití molekulárně-biologických metod v diagnostice infekčních nemocí a přináší nový diagnostický nástroj, který může být využíván zájemci pro svoji jednoduchost, vysokou citlivost, specificitu a nižší náklady.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek soupravy je na autorském pracovišti zaveden a je již využíván k výzkumným a servisním účelům. Diagnostická souprava je zařazena do portfolia služeb Centra aplikovaných služeb při ÚBO AV ČR (CASUBO) a je nabízena ve formě externích zakázek zahraničním klientům, soukromým rybochovným zařízením, vysokým školám, státním institucím, ústavům AV ČR i dalším subjektům zabývajících se chovatelstvím, zemědělstvím, ochrannou přírodou.

6. Ekonomické aspekty

Rod *Flavobacterium* sdružuje původce závažných onemocnění, které působí významné ztráty v chovech sladkovodních ryb. Proto spolehlivá znalost míry nežádoucího zamoření vodního zdroje přivádějící vodu do chovného zařízení v sezónní dynamice a funkční systém včasného varování pro rychlé a cílené použití



méně nákladných preventivních a léčebných opatření přináší velké úspory pro chovatele. Současná úroveň produkce lososovitých ryb pokrývá přibližně 50 % celkové spotřeby v ČR. V dalším období se předpokládá nárůst až o 500 tun ročně. Tento odhad vychází i z díkce programovacího období OP Rybářství a materiálů EU. Nová diagnostická souprava by se mohla podílet až na 10 % tohoto nárůstu. Včasné nastavení léčebných a preventivních opatření v případě ohrožení i celková optimalizace podmínek chovu lososovitých ryb v RAS (zvýšení přežití, snížení nákladů na chov, atd.) by měla pozitivně ovlivnit výši ztrát v průběhu produkčního cyklu na úrovni minimálně 10–20 %. Zvýšení produkce prostřednictvím snížení ztrát, způsobených různými původci a pohybujícími se v průběhu celého produkčního cyklu na úrovni 30–50 %, třeba i o 1 %, přinese při realizační ceně 100 Kč za 1 kg tržních ryb vyšší tržby o 50–60 tis. Kč.

7. Seznam použité literatury

Benbrook CM. 2020: Organochlorine Residues Pose Surprisingly High Dietary Risks. *J Epidemiol Community Health*, 56: 822–3, <https://doi.org/10.1136/jech.56.11.82288>.

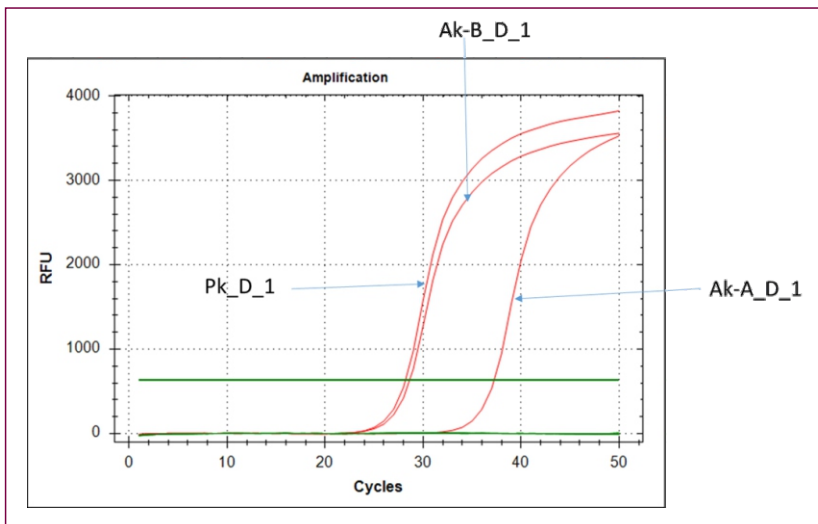
Orieux N, Bourdineaud JP, Douet DG, Daniel P, Le Hénaff M. 2011. Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), tissues by qPCR. *J Fish Dis.*, 34(11): 811–21.

Štěpánek P, Trnka M, Meitner J, Dubrovský M, Zahradníček P, Lhotka O, Skalák P, Kyselý J, Farda A, Semerádov D. 2019: Očekávané klimatické podmínky v České republice. *CzechGlobe*, AV ČR, 71 s, ISBN 978-8-87902-28-8.

Diagnostická souprava RT-qPCR FLAVident na detekci a kvantifikaci *Flavobacterium psychrophilum* ve vzorcích vody, tkání a kožních stěrů
Funkční vzorek 15/2022

Mgr. Radek Šindelka, Ph.D.
Mgr. Jan Mendel, Ph.D.

Vydavatel: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 170/8, 603 00 Brno
Grafická úprava a zalomení: Ján Otradovec
Tisk: Computer MCL Brno spol. s. r. o.
Vydání: první, 2022
Počet stran: 12
ISBN 978-80-87189-36-8



Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i.
Květná 8, Brno 603 00
Tel.: +420 543 422 540
E-mail: ubo@ivb.cz

www.ivb.cz