

17/2022
FUNKČNÍ
VZOREK

DIAGNOSTICKÁ SOUPRAVA
RT-qPCR TETRACAPSident
na detekci a kvantifikaci
Tetracapsuloides bryosalmonae
ve vzorcích vody, tkání
a kožních stěrů

Mgr. Radek Šindelka, Ph.D.

Mgr. Jan Mendel, Ph.D.

Funkční vzorek 17/2022

**DIAGNOSTICKÁ SOUPRAVA
RT-qPCR TETRACAPSident
na detekci a kvantifikaci
Tetracapsuloides bryosalmonae
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

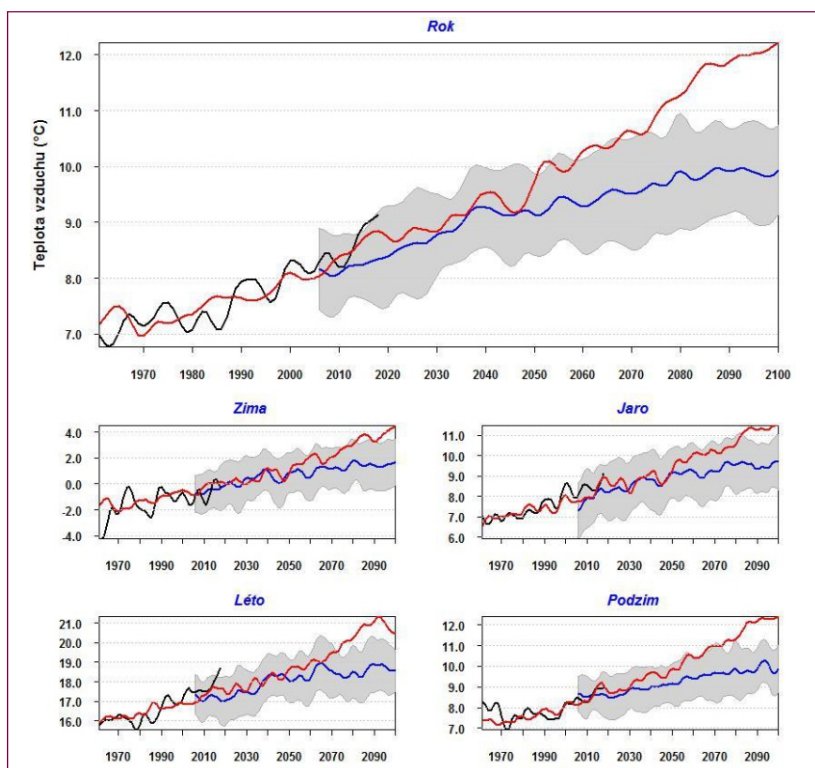
Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 8, Brno 603 00

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	8
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 rybnářství/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, flavobakterioza) a parazitům (kožovec, ryboborka). V rybářství se využívají při léčbě onemocnění způsobených rozličnými druhy parazitů různé chemikálie. Jejich časté a dlouhodobější používání může mít negativní dopady na rybičtvo i biofiltr a jejich zbytkové množství může zatěžovat i životní prostředí. Nesprávná aplikace chemikálií (nedodržení bezpečného množství, doby

působení a ochranné lhůty) má negativní dopad i na kvalitu masa a na lidské zdraví (Benbrook, 2002). Proto v případě managementu chovného prostředí je nezbytné navrhovat nová nebo vylepšená opatření vzhledem k eliminaci nebo snížení nežádoucích faktorů zatěžující 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 TETRACAPSident 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 *Tetracapsuloides bryosalmonae* původce proliferativního onemocnění ledvin (PKD) 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 *T. bryosalmonae* v různých typech vzorků. Pro detekci jsme navrhli nové sekvence oligonukleotidů navazující na 18S 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. Vzorky vody byly transportovány do laboratoře v zamraženém stavu a uchovávány při -20°C. Po rozpuštění v pokojové teplotě byl odebrán alikvot,

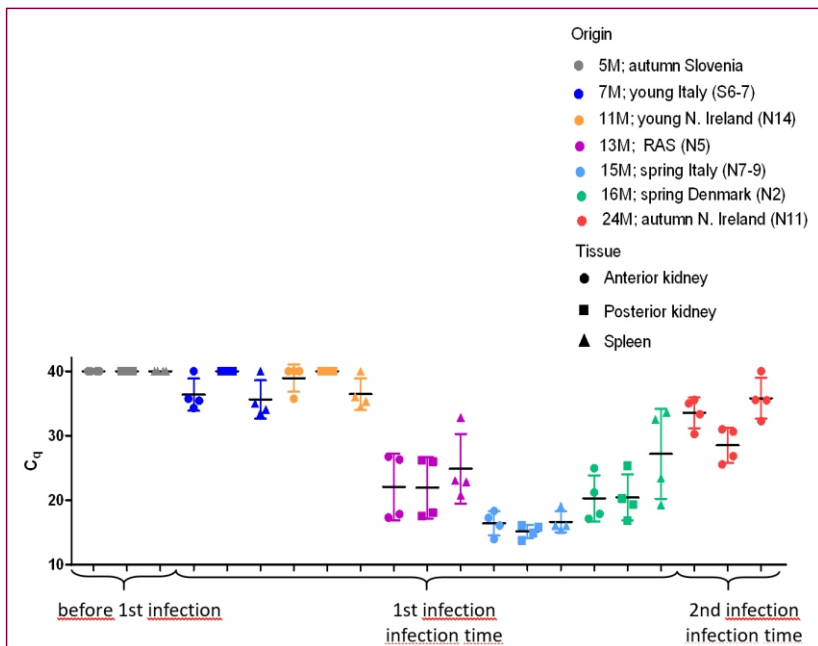
ke kterému byla přidána směs pro reverzní transkripci. Z připravené cDNA byla použita 1/15 vzorku pro qPCR. Vodní nanofiltr byl transportován a uchováván stejně. Pro přípravu vzorku byl vystřížen 1 cm² ze středu a biologický materiál byl eluován do vody bez nukleáz. Roztok byl dále analyzován shodným 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 byly použity vzorky ryb vyskytujících se v povrchových zdrojích vody s prokázaným výskytem dvou druhů mechovek (*Plumatella emarginata* a *Cristella mucedo*), které jsou v mnoha studiích potvrzeny jako hostitelské druhy *T. bryosalmonae*. Vzorky těchto ryb byly podrobeny patoanatomickému a histologickému vyšetření (VETUNI, Brno) a byly shledány tyto příznaky a změny: zvětšená dutina tělní, exoftalmus, přítomnost kožních hemoragií, zvětšená slezina a v ledvinách byly přítomny šedavé granulomatózní útvary, masivní proliferace intersticia, atrofie ledvinových tubulů a tvorba trombů.

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 2018–2022.

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 *T. bryosalmonae* ve vzorcích vod byla v letech 2021 a 2022 velmi vzácná (i v červnu až srpnu). Detekce nebyla zjištěna ani ve vzorcích vod s nanofiltry kromě června 2022. Bylo nalezeno vysoké množství v ledvině tkáni u malého množství ryb, což naznačuje minimální vliv na rybochovná zařízení v posledních dvou letech. V předchozích letech jsme spolehlivě detekovali *T. bryosalmonae* ve vzorcích ledvin a sleziny u více chovaných linií různého stáří a původu (Obr. 2).



Obr. 2.:
 Detekce *T. bryosalmonae* v přední i zadní ledvině a slezině u 7 linií pstruha duhového různého stáří a původu (Slovinsko, Itálie, Severní Irsko, JAR, Dánsko).

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 patologického posouzení nemocných ryb a komerčně dostupné monoklonární protilátky s histologickými řezy obarvenými imunohistochemicky (Palíková a kol., 2019). Na molekulární úrovni se využívá buď detekce přítomnosti patogenní DNA sekvenční technikou nebo izolace RNA,

kteřá 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 *T. bryosalmonae* 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, specifitu 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

Proliferativní onemocnění ledvin často v chovech způsobuje vysokou úmrtnost ryb a velké ekonomické ztráty. 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 dílky 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>.

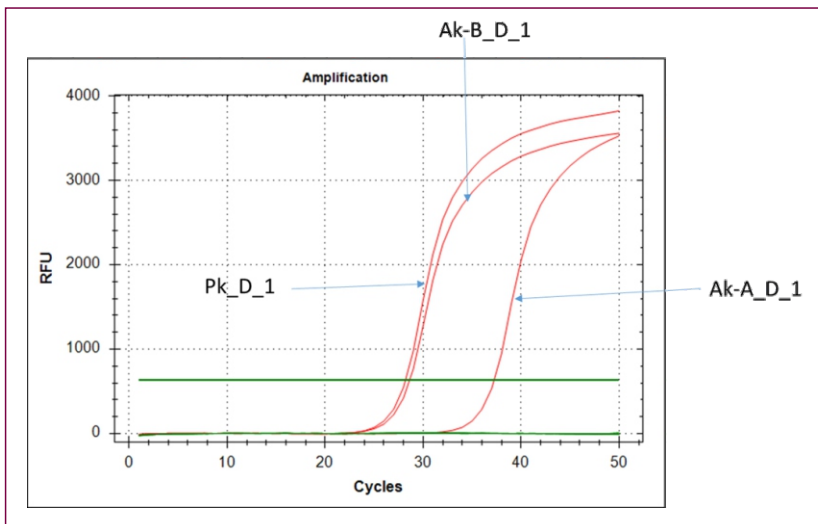
Palíková M, Piačková V, Navrátil S, Zusková E, Papežiková I, Kolářová J, Pojezdal L, Dyková I, Scholz T, Gelnar M, Svobodová Z, Řehulková E, Mareš J, Modrá H, Blažek R, Veselý T. 2019: Nemoci a chorobné stavy ryb. Vodňany, 462 s, ISBN 978-80-7514-085-2.

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 TETRACAPSiDent na detekci a kvantifikaci
Tetracapsuloides bryosalmonae ve vzorcích vody, tkání a kožních stěrů
Funkční vzorek 17/2022

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 978-80-87189-38-2



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