

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Bc. Kristýna Haltufová

Dospělci včely medonosné (*Apis mellifera*) jako přenašeči a reservoár moru včelího plodu (*Paenibacillus larvae*)

Honey bee (*Apis mellifera*) workers as transmitters and reservoirs of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*)

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. Jan Hubert, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 10. 8. 2020

Podpis

Výzkum byl podpořen Ministerstvem zemědělství (identifikační kód QK1710228).

Poděkování

Chtěla bych zde poděkovat svému školiteli doc. Janu Hubertovi, Ph.D. za možnost pracovat pod jeho vedením na této diplomové práci. Mé velké díky patří Ing. Martě Nesvorné za poskytnuté rady a pomoc. Také chci poděkovat MVDr. Martinu Kamlerovi a Mgr. Veronice Jeřábkové z Výzkumného ústavu včelařského v Dole a Ing. Janu Tylovi za odborné rady v řešené problematice. Děkuji, že mi poskytl konzultaci prof. Lukáš Kratochvíl, Ph.D., prof. RNDr. Adam Petrušek, Ph.D., Michail Rovatsos, Ph.D. a prof. David Storch, Ph.D. Obrovský dík patří mým rodičům a bratrovi, kteří mě vždy podporovali. Chtěla bych poděkovat také svým přátelům Veronice, Barboře, Jakubovi, Haně, Danielovi a všem ostatním, kteří mě podporovali... A včelám i včelařům.

Abstrakt

Paenibacillus larvae je grampozitivní sporulující bakterie, která napadá a zabíjí larvy včely medonosné (*Apis mellifera*) a způsobuje onemocnění mor včelího plodu. Dospělci se nakazit nemohou, ale přenáší odolné spory v rámci úlu i mezi včelstvy a při péči o larvy je mohou nakazit. Mor včelího plodu je v ČR ze zákona zakázáno léčit, ale doporučovanou preventivní metodou pro snížení počtu spor, které se ve včelstvu nachází, je přemetení na mezistěny (včely se přesunou do nového čistého úlu a starý úl je zlikvidován spolu s plodem a zásobami). Cílem této práce bylo detekovat a kvantifikovat bakterii *P. larvae* ve včelích dělnicích pomocí metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR). Byly zpracovány vzorky včel před provedením metody přemetení na mezistěny a po něm, kdy se však očekávaný pokles spor ve vzorcích odebraných po přemetení nepotvrdil, a naopak došlo navíc k amplifikaci nescifických produktů. Dále byla porovnáována přítomnost spor *P. larvae* ve vzorcích ze silně nakažených včelstev (s klinickými příznaky moru včelího plodu) a ze včelstev s téměř nulovými nálezy spor *P. larvae* pocházejících ze stejného stanoviště. Zde byly rozdíly jasně viditelné. Pro plánované nalezení limitů či hranic detekce *P. larvae* pomocí qPCR nebyl dostatek vhodných dat. Detekce a kvantifikace *P. larvae* byla u silně nakažených včelstev úspěšná a příčiny nescifické amplifikace byly diskutovány.

Klíčová slova:

Paenibacillus larvae, mor včelího plodu, *Apis mellifera*, včela medonosná, interakce, přemetení, qPCR

Abstract

Paenibacillus larvae is a gram-positive spore-forming bacterium that affects and kills the larvae of the honey bee (*Apis mellifera*) and causes the American foulbrood disease. Adult bees do not become infected, but they transmit tenacious spores within the hive and between hives and can infect larvae while caring for them. It is not allowed by law to treat bees in the Czech Republic, but the recommended preventive method for reducing the amount of spores in the hive is the shook swarm method (bees are moved to a new clean hive and the old hive is destroyed with all brood and supplies). The aim of this work was to detect and quantify *P. larvae* in bee workers using the quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). In the first experiment, the two sets of samples were taken – bees before and after the shook swarm method, but the expected decrease in spores in the samples taken after shook swarm was not confirmed, and conversely, non-specific products were amplified. In the second experiment, the presence of *P. larvae* spores in samples from heavily infected hives (with clinical symptoms of American foulbrood) and from hives with almost no findings of *P. larvae* spores, both originating from the same habitat, were compared. In this case, the differences were clearly visible. There were not enough suitable data for the planned finding of limits of detection of *P. larvae* by qPCR. Finally, detection and quantification of *P. larvae* were successful in heavily infected hives and the causes of non-specific amplification were discussed.

Key words:

Paenibacillus larvae, American foulbrood, *Apis mellifera*, European honey bee, interaction, shook swarm method, qPCR

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Cíle práce.....	2
1.2. <i>Apis mellifera</i>	2
1.2.1. Patologie a choroby včel	3
1.3. <i>Paenibacillus larvae</i>	4
1.3.1. Životního formy	4
1.3.2. Genotypy	5
1.4. Mor včelího plodu	6
1.4.1. Výskyt	6
1.4.2. Průběh nákazy	7
1.4.3. Šíření	8
1.4.4. Příznaky.....	9
1.4.5. Nařízení a postup při nákaze MVP	10
1.4.6. Detekce <i>P. larvae</i>	10
1.4.6.1. Kultivační vyšetření	11
1.4.6.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	12
1.4.6.3. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)	12
1.4.7. Léčba	14
1.4.8. Prevence	14
1.4.8.1. Přemetení včel na mezistěny	15
2. Materiál a metodika.....	18
2.1. Lokality.....	18
2.1.1. Úhonice – 1. odběr	18
2.1.2. Úhonice – 2. odběr	19
2.1.3. Lidečko.....	19
2.1.4. Útěšenovice	19
2.1.5. Zdeslavice.....	19
2.1.6. Přehled odebraných vzorků	19
2.2. Sběr vzorků včelích dělnic	20
2.3. Fenol-chloroformová extrakce DNA	20
2.3.1. Sterilizace včel	21
2.3.2. Homogenizace včel	21
2.3.3. Extrakce.....	22
2.3.4. Purifikace	23
2.4. Polymerázová řetězová reakce a elektroforéza.....	23

2.4.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
2.4.2.	Gelová elektroforéza a vizualizace výsledků.....	25
2.4.3.	Zahnížděná polymerázová řetězová reakce (nested PCR).....	26
2.4.4.	Pozitivní kontrola.....	26
2.5.	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR).....	27
2.5.1.	Příprava.....	27
2.5.2.	Ředění standardů.....	27
2.5.3.	Pipetování.....	28
2.5.4.	Přístroj StepOnePlus™.....	28
2.5.5.	Zpracování kvantitativních hodnot.....	29
2.6.	Sangerovské sekvenování.....	29
2.7.	Kultivační vyšetření.....	29
3.	Výsledky.....	30
3.1.	Úspěšnost přemetení na mezistěny.....	30
3.1.1.	Polymerázová řetězová reakce.....	30
3.1.2.	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	32
3.1.3.	Sekvenování.....	35
3.1.4.	Kultivační vyšetření.....	36
3.1.5.	Porovnání se vzorky z lokality Lidečko.....	36
3.2.	Porovnání vzorků včel s klinickými příznaky a bez nich odebraných z jednoho stanoviště.....	38
3.2.1.	Polymerázová řetězová reakce.....	39
3.2.2.	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	39
3.2.3.	Sekvenování.....	41
3.2.4.	Kultivační vyšetření.....	41
3.2.5.	Porovnání vzorků ze všech lokalit.....	41
3.3.	Limity a hranice detekce <i>P. larvae</i> pomocí qPCR.....	43
4.	Diskuze.....	44
5.	Závěr.....	49
	Seznam zkratk.....	50
	Definice použitých výrazů.....	51
	Seznam použité literatury.....	52
	Zákony.....	60
	Webové stránky.....	60

1. Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) se řadí mezi blanokřídly eusociální hmyz a plní roli dominantního a důležitého opylovače. Zdravotní stav včel je tedy aktuální téma a nemoci včel jsou velmi studovány. Jednou ze závažnějších včelích chorob je mor včelího plodu (Prýmas et al., 2017). Způsobuje ho gram-pozitivní sporulující bakterie *Paenibacillus larvae* (White, 1906), která dokáže napadnout pouze včelí larvu a vyklíčit v ní. Postupně larvu rozloží na kašovitou hmotu, která později vyschne na tvrdý příškvár přichycený ke stěně buňky, který obsahuje miliardy nových spor. Při čištění buněk na sebe dělnice přenesou spory, které pak roznáší v úlu a včely krmičky zase mohou při péči o plod nakazit mladé larvy (Titěra, 2009). Nemoc je v ČR ze zákona zakázáno léčit a nakažená včelstva s klinickými příznaky moru včelího plodu jsou pálena (Vyhláška č. 18/2018 Sb.). Preventivní doporučovanou ozdravnou metodou je přemetení na mezistěny. Spočívá v tom, že včely se z původního úlu přemístí do nového úlu s novými mezistěnami a plodové a zásobní pláсты z původního úlu včetně všech pomůcek jsou spáleny nebo desinfikovány. Touto změnou by se měl snížit počet spor *P. larvae* nacházející se ve včelstvu, jelikož z původního úlu zůstanou pouze včely samotné (Kamler et al., 2017; Solčanský, 2016). Výzkumy o přemetení jsou prováděny po celém světě (Hansen & Brødsgaard, 2003; Munawar et al., 2010) a potvrzují jeho funkčnost. K prokázání poklesu spor ve včelstvu po provedení přemetení je nutné využít detekčních metod, kterými jsou například kultivační vyšetření, polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR) (de Graaf et al., 2013). Pomocí metody qPCR lze kvantifikovat *P. larvae* ve vzorku a tyto výsledky by mohly být využity např. pro lepší vyhodnocení nakažové situace ve včelstvu nebo k případnému rozeznávání různě nakažených včelstev. Tato práce se zaměřuje na využití metody qPCR pro detekci a kvantifikaci *P. larvae* ve vzorcích včelích dělnic. Výsledky by mohly pomoci s detekcí *P. larvae* ve včelstvech bez klinických příznaků nemoci včelího plodu.

1.1. Cíle práce

Cíle této práce:

- ve vzorcích dospělých včel, odebraných před a po provedení včelařské metody přemetení na mezistěny (viz podkapitola 1.4.8.), detekovat a kvantifikovat bakterii *Paenibacillus larvae* pomocí metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR) a zjistit rozdíly v počtu spor – očekávaný je pokles počtu spor ve vzorcích odebraných po přemetení včelstev oproti vzorkům před přemetením včelstev
- pomocí metody qPCR kvantifikovat a porovnat přítomnost bakterie *Paenibacillus larvae* ve včelstvech s klinickými příznaky moru včelího plodu a ve včelstvech bez klinických příznaků moru včelího plodu odebraných z jednoho stanoviště – očekávaný je odlišný nález počtu spor *P. larvae* v porovnávaných vzorcích
- popsat případné nalezené limity či hranice pro detekci *P. larvae* pomocí qPCR

1.2. *Apis mellifera*

Včela medonosná přísluší do čeledi Apidae, řádu Hymenoptera (podřádu Apocrita), třídy Insecta (kohorty Holometabola), kmene Arthropoda, říše Ophisthokonta, domény Eukaryota (Prýmas et al., 2017; Encyclopedia of Life [online]). Řadíme ji mezi odvozený eusociální hmyz díky specifickým životním podmínkám – ve společném hnízdě s mnoha jedinci je překryv generací, kooperativní péče o potomstvo a reprodukční dělba práce (kasty). Nejdůležitějším jedincem je matka kladoucí vajíčka, ze kterých se líhnou larvy, ty se zakuklí a vylíhnou se z nich dělnice, případně trubci (z neoplozených vajíček) či nová matka (stejně jako dělnice z oplozených vajíček, ale jsou krmeny pouze speciální potravou – mateří kašičkou – pro popis tohoto a dalších včelařských pojmů viz Definice použitých výrazů na str. 51) (Prýmas et al., 2017). Jednou z pro člověka nejvýznamnějších přirozených činností včel je sbírání potravy - pylu a nektaru z rostlin, čímž zároveň opylují rostliny (Macek et al., 2010; Prýmas et al., 2017). Potravu létají hledat v závislosti na okolním reliéfu a aktuálně kvetoucích rostlinách nejčastěji do vzdálenosti 3 km od úlu, při nedostatku potravy však až okolo 10 km od úlu (Beekman & Lew, 2008; Beekman & Ratnieks, 2000; Couvillon et al., 2015; Prýmas et al., 2017; Visscher & Seeley, 1982). Nespecializují se na jeden rostlinný druh, ale naopak jsou generalisté (polylekti) a létají v průběhu života na mnoho druhů rostlin. Květy těchto rostlin však mají jisté podobné rysy, tzv. melittofilní květy často mívají místo k přistání, nektarová vodítka (značky vedoucí k nektaru), bývají souměrné, sladce voní, mají velké množství odměn pro opylovače a jejich barvy jsou od bílé, žluté po růžovou, fialovou,

modrou a barvy v UV spektru (Jersáková & Tropek, 2018). Zároveň jsou ale také florokonstantní, tedy v určitou chvíli létá včela pouze na rostliny jednoho nejvýhodnějšího druhu (Prýmas et al., 2017). A díky poměrně dalekým letům mohou zprostředkovat opylení navzájem vzdálených rostlin. Vzhledem k množství včel v jednom včelím společenství (cca 50-60 tisíc dle Prýmas et al., 2017) a k množství včelích stanovišť v České republice (670 548 včelstev v roce 2017 dle Ministerstvo zemědělství České republiky, 2019) je zřejmé, že se počet jedinců včely medonosné pohybuje v desítkách miliard, díky čemuž jsou včely medonosné důležitými opylovači.

Na území ČR se uvádí výskyt 5 plemen včely medonosné (seřazeno dle nejčastějšího výskytu) – *A. m. carnica* (v. m. kraňská), *A. m. 'buckfast'* (kulturní vyšlechtěné plemeno z šesti poddruhů v. m.), *A. m. ligustica* (v. m. vlašská/italská), *A. m. mellifera* (v. m. tmavá) a *A. m. caucasica* (v. m. kavkazská) (Kašpar et al., 2017; Prýmas et al., 2017). *A. m. mellifera* je na většině území ČR původním poddruhem v. m., avšak v současné době až 80 % včelí populace ČR tvoří dlouhodobě dovážená *A. m. carnica* (původní ve státech jihovýchodně od ČR a na části jižní Moravy), která je také zákonem jediným povoleným poddruhem k plemenitbě včel (Kašpar et al., 2017; Prýmas et al., 2017; Zákon č. 154/2000 Sb.; § 20). Domestikace včel a využívání jejich produktů (jimiž jsou med, vosk, jed, propolis, pyl a mateří kašička) se stalo nepostradatelnou součástí našich životů, a i z těchto důvodů byla včela medonosná zařazená mezi hospodářská zvířata (Zákon č. 166/1999 Sb., § 3).

1.2.1. Patologie a choroby včel

Včely medonosné trpí mnoha nemocemi. Pravděpodobnost, že se ve včelstvu objeví závažnější forma onemocnění se zvýšila spolu s domestikací včel. Kumulace včelstev, resp. úlů na jednom místě umožňuje jednodušší přenos nemocí, než když jsou včelstva rozmístěna například v dutinách stromů či dalších skrýších v přírodě. Mezi nejznámější choroby patří varoáza (přemnožení převážně roztoče *Varroa destructor*) a mor včelího plodu (přemnožení bakterie *Paenibacillus larvae*). Dále pak přemnožení jiných roztočů, virus deformovaných křídel a další virové nákazy, hniloba včelího plodu a ostatní bakteriální choroby, nosemová nákaza a jiné nemoci způsobené mikroskopickými houbami. Problémem jsou i škůdci jako zavíječi, lesknáček úlový, včelomorka úlová nebo přirození nepřátelé jako ptáci, medvědi, hlodavci, sršni a další. Nemluvě o poruchách způsobených nesprávnou teplotou při vývoji, genetických poruchách či otravách (Rytina et al., 2016; vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

Před přibližně 14 lety byl v Severní Americe poprvé pozorován neobvyklý úbytek včel a tento jev se nazývá syndrom zhroucení včelstev (CCD – pro popis tohoto a dalších zkratk a výrazů viz Seznam zkratk na str. 50). V úlech chybí většina dospělých dělnic, které nejsou k nalezení, ale matka, plod i zásoby jsou přítomny. Příčina není zcela jasná, ale pravděpodobně to bude způsobeno souhrou více negativních skutečností – například vliv pesticidů, virová onemocnění, varoáza a další choroby, nedostatek živin v potravě či hladovění, změny počasí a srážek a další. Přestože nejvíce studií pochází právě ze Severní Ameriky, je CCD pozorováno i v Evropě (Johnson, 2010; Rytina et al., 2016; vanEngelsdorp et al., 2009).

Nemoci včel jsou řešeny spolu s nemocemi ostatních hospodářských zvířat a jsou ošetřeny zákony a vyhláškami (Vyhláška č. 18/2018 Sb.; Vyhláška č. 299/2003 Sb.; Zákon č. 166/1999 Sb., § 64c).

1.3. *Paenibacillus larvae*

Paenibacillus larvae je gram-pozitivní obligatorní patogenní bakterie patřící do čeledi Paenibacillaceae, řádu Bacillales, třídy Bacilli, kmenu Firmicutes, domény Bacteria (Genersch, 2008; Encyclopedia of Life [online]). Způsobuje závažnou chorobu a smrt včelích larev zvanou mor včelího plodu (anglicky American foulbrood, AFB) (Titěra, 2009). Názvem „foul brood“ (v překladu znečištěný/odporný plod/potomstvo), byla nemoc pojmenována v roce 1769 (Schirach, 1769), přičemž důvod onemocnění nebyl zřejmý, dotyčná bakterie byla prvně popsána v roce 1906 jako *Bacillus larvae* (White, 1906). Později byla jako odlišný druh popsána bakterie *Bacillus pulvifaciens* (Katznelson, 1950). Se stále se vyvíjejícími molekulárními metodami byly bakterie zařazeny do nového druhu a přejmenovány na *Paenibacillus larvae* a *Paenibacillus pulvifaciens* (Ash et al., 1993), poté byly zařazeny do jednoho druhu jako dva poddruhy nazývané *P. larvae larvae* a *P. larvae pulvifaciens* (Heyndrickx et al., 1996) a v roce 2006 došlo k zatím poslední změně, a to sjednocení obou poddruhů do jednoho druhu *Paenibacillus larvae* (Genersch et al., 2006).

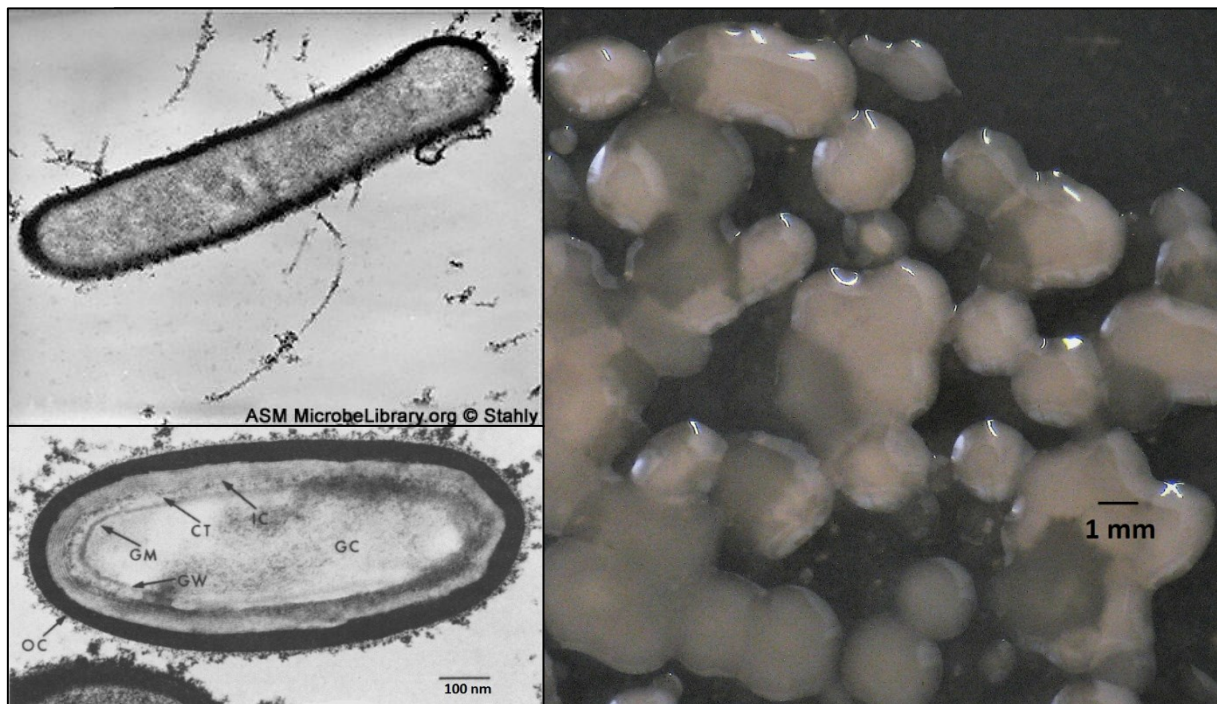
1.3.1. Životního formy

P. larvae má dvě životní stádia – tyčinkovité vegetativní a elipsovité sporující. Ve vegetativní formě se *P. larvae* nachází pouze uvnitř střeva včelí larvy, kdežto v ostatním nehostinném prostředí se vyskytuje v podobě velmi odolných endospor (Titěra, 2009). Tyto endospory, zjednodušeně nazývány pouze spory, jsou velmi odolné, podobně jako spory mnoha dalších zástupců kmenu Firmicutes. Mohou vyklíčit i po mnoha desetiletích a mají několik vrstev obalů s různými vlastnostmi, díky nimž vydrží spory vyschnutí, větší působení

vyšších teplot, chladu, tlaku, mechanického poškození, chemikálií apod. (Galperin, 2013; Genersch, 2010; Setlow, 2007).

1.3.2. Genotypy

P. larvae byl pomocí metody rep-PCR s použitím ERIC primerů (ERIC-PCR) rozdělen na 5 genotypů nazývaných ERIC I, ERIC II, ERIC III, ERIC IV a nový letos objevený ERIC V, které se navzájem liší, například ve virulenci, morfologii spor, v rychlosti klíčení a barvě kolonií na živném médiu, produkci neribozomálních peptidů atd. Nejrozšířenějším genotypem je ERIC I, což je způsobeno jeho pomalejší virulencí – 100 % včelích larev (LT₁₀₀) zabije až po 12 dnech od nakažení, ale zavíčkování plodu probíhá u matek 5. den, u dělnic 6. den a u trubců 7. den, takže nakažené larvy nemusí být včas odhaleny. Genotyp ERIC II je již méně častý a smrt larev způsobí cca 7. den. Nejméně časté jsou zbývající genotypy ERIC III a ERIC IV, které usmrtí larvu za cca 3-7 dnů a zatím jednou pozorovaný ERIC V, který způsobí smrt larev za cca 3 dny (Ashiralieva & Genersch, 2006; Beims et al., 2020; Dingman, 2015; Forsgren et al., 2008; Genersch et al., 2005, 2006; Genersch & Otten, 2003; Morrissey et al., 2015; Prýmas et al., 2017).



Obr. 1: Vegetativní buňka *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, zdroj: ASM MicrobeLibrary.org, autor Donald Stahly, rok 2002 (nahore vlevo). Spora *Bacillus larvae*, upraveno dle (Bakhiet & Stahly, 1985); šipky směřují na jednotlivé obaly spory, které nejsou pojmenovány dle současného standardu, tedy nepřidávám popis (dole vlevo). Kolonie *Paenibacillus larvae*, rok 2015, foceno na Petriho misce, autor Bronislava Hortová (vpravo).

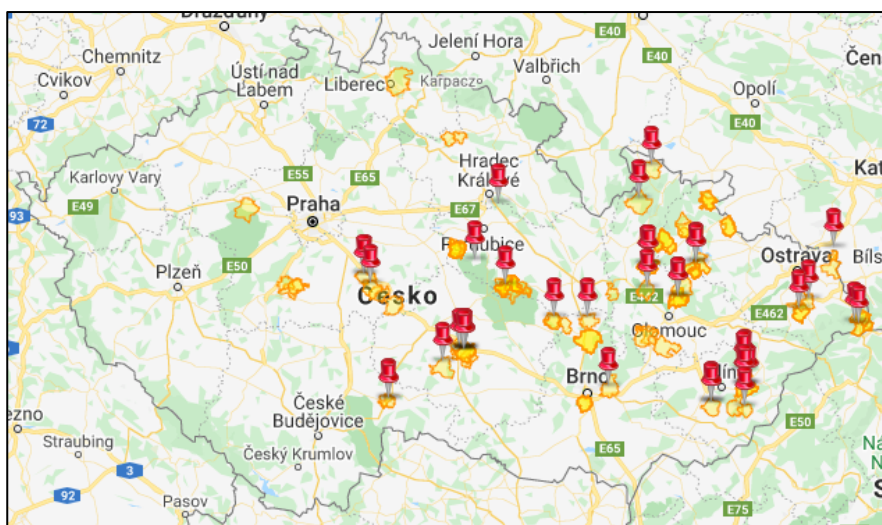
Důvodem, proč je *P. larvae* nejvíce studován jako patogen včely medonosné, je zcela jistě nepostradatelný celosvětový hospodářský význam včel medonosných, ale možná i vyšší odolnost, menší hospodářský význam či menší areál výskytu dalších zástupců rodu *Apis* (Chen et al., 2000; OIE - World Organisation for Animal Health, 2018; Prýmas et al., 2017).

1.4. Mor včelího plodu

Mor včelího plodu (MVP) je jedna z nejvýznamnějších a celosvětově nejzávažnějších bakteriálních infekcí včel medonosných. *P. larvae* dokáže napadnout pouze mladé larvy, nejlépe do 24 hodin života, okolo 48 hodin života již bývají larvy resistantní (Bamrick, 1967; Brødsgaard et al., 1998; Hoage & Rothenbuhler, 1966; Titěra, 2009). Mladší larvy ještě nemají kompletně vyvinuté všechny vnitřní struktury, včetně peritrofické matrix (PM), která u starších larev a dospělých včel zabraňuje v nákaze (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013). PM vytváří bariéru mezi střevním epitelem a požitou potravou, tedy chrání mimo jiné před mechanickým poškozením od potravy, trávicími enzymy i nečistotami a patogeny, kteří se spolu s potravou dostanou do trávicího traktu (Hegedus et al., 2009).

Dospělé včely se při kontaktu se spory již nenakazí, ale mohou spory přenášet napříč včelstvem, případně i mezi včelstvy, viz obr. 5. (Fries et al., 2006; Lindström et al., 2008). Larvy jsou krmeny mladými včelami, které ve včelstvu zastávají roli kojiček a krmiček díky plně funkčním hltanovým žlázám, kterými vytváří mateří kašičku (Prýmas et al., 2017). Pokud se tyto včely setkají se spory *P. larvae*, mohou při krmení nakazit larvu, jelikož spory se nacházejí v trávicím traktu včel po dobu minimálně týdne, ale také až 2 měsíců, a i po projití trávicím traktem jsou životaschopné (Lindström, 2008; Wilson, 1971, 1972).

1.4.1. Výskyt

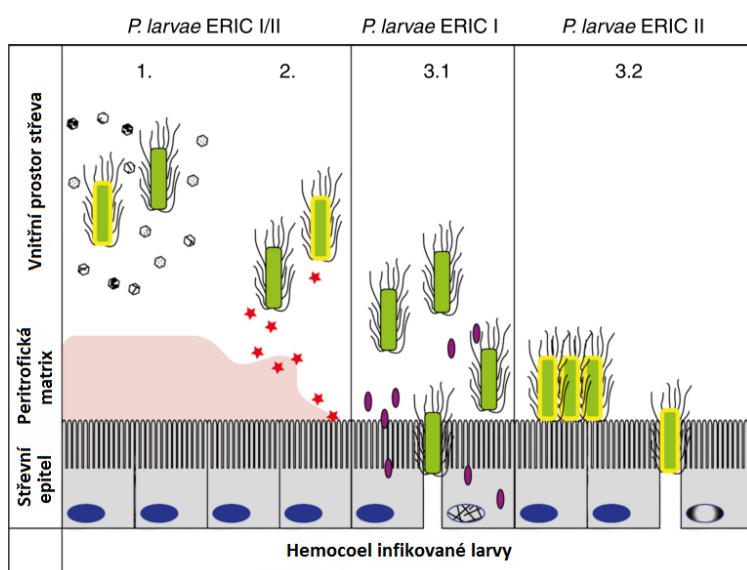


Obr. 2.: Ukázka mapy s ohnisky MVP (červené špendlíky) a ochrannými pásmy (žluté plochy), stav k 20. 5. 2020 (nejvíce záchytů). Zdroj: Státní veterinární správa: Mapové výstupy ohnisek nálezů včel a ochranných pásem [online].

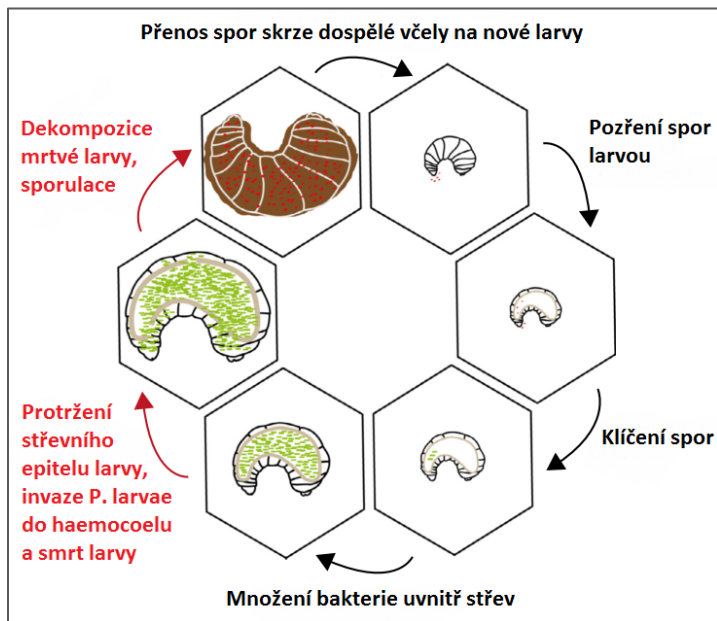
Mor včelího plodu, resp. *P. larvae* je rozšířen celosvětově, tedy i jeho výzkum probíhá po celém světě (Morrissey et al., 2015). Významně je zkoumán i v ČR. Státní veterinární správa pravidelně aktualizuje na svých webových stránkách mapu, kam jsou zaznamenávána vyhlášená ohniska moru včelího plodu a ochranná pásma. V roce 2019 bylo v ČR potvrzeno celkem 134 ohnisek, 133 v roce 2018, 152 v roce 2017 a 242 v roce 2016. Nejvíce je téměř každoročně morem postižena Morava (SVS, Mor včelího plodu [online]).

1.4.2. Průběh nákazy

Spory *P. larvae* v mladé larvě vyklíčí, vegetativní stádia se začnou množit, bakterie se zatím živí potravou přijímanou larvou a začíná produkovat sekundární metabolity pro potlačení mikroflóry střeva a proteázy proti růstu PM, např. PICBP49 (Djukic et al., 2014; Garcia-Gonzalez et al., 2014; Müller et al., 2015; Yue et al., 2008). V závislosti na virulenci bakterie (viz podkapitola 1.3.2.) začíná *P. larvae* různými způsoby (viz obr. 3.) pronikat mezibuněčnými spoji skrze střevní epitel až do hoemocelu, na larvě začínají být viditelné změny, jelikož s využitím mnoha proteáz začne bakterie rozkládat tělo larvy, postupně ji usmrtí a promění na kašovitou hnědou hmotu (viz obr. 4.), která následně vysychá, ztmavne, pevně ulpí na stěnách včelí buňky a díky sporulaci vegetativních stádií obsahuje miliony či miliardy spor *P. larvae* – nazývá se příškvár (Djukic et al., 2014; Poppinga & Genersch, 2015; Titěra, 2009; Yue et al., 2008). Detailnější popis nákazy je uvedený v mé bakalářské práci (Haltufová, 2015).



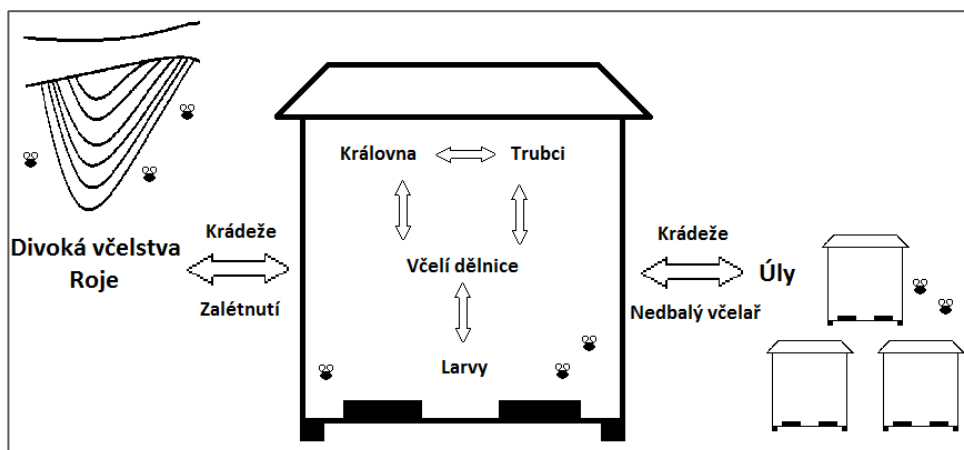
Obr. 3.: **Průnik *P. larvae* střevním epitelem** pomocí mezibuněčných spojů. Zdroj: Upraveno od (Poppinga & Genersch, 2015). 1. Sekundární metabolity působící uvnitř střeva (šestihrany). 2. Chitin degradující protein PICBP49 (červené hvězdy). 3.1 Genotyp ERIC I vylučuje toxiny pro průnik střevním epitelem (fialové ovály). 3.2 Genotyp ERIC II se váže na střevní epitel pomocí proteinu SplA v S-vrstvě (žlutý okraj).



Obr. 4.: Průběh nákazy včelí larvy bakterií *Paenibacillus larvae*. Červené tečky reprezentují bakteriální spory a zeleně jsou vegetativní stádia. Černé písmo odděluje neinvazivní fázi nákazy od invazivní fáze, ta je červeným písmem. Upraveno dle (Poppinga & Genersch, 2015)

1.4.3. Šíření

Jako přenašeči bakterie slouží ve včelstvu dospělci včely medonosné. Bakterie se šíří jak vertikálním přenosem (rojením či z matky na potomstvo), tak horizontálním přenosem (krádežemi mezi včelstvy, navzájem mezi včelími dospělci a také mezi dělnicemi a plodem) (Fries & Camazine, 2001; Lindström, 2008). Pokud se nakažené včelstvo neodhalí včas nebo se jedná o divoká včelstva, může postupně ubývat dospělých včel natolik, až nakonec celé včelstvo zkolabuje. Jejich zásoby mohou být rozkradeny včelami z okolí, čímž se nemalé množství spor rozšíří na větší vzdálenost a do zdravých včelstev. K nákaze může dojít při zalétnutí včel z nakaženého včelstva do zdravého včelstva, např. na jednom stanovišti včel (Rytina et al., 2016).



Obr. 5: Schéma přenosu a šíření moru včelího plodu uvnitř včelstva a v přírodě. Zdroj: (Haltufová, 2015)

K šíření nákazy mohou přispět i nedbalí či neznaří včelaři. Pokud třeba naleznou či koupí starší včelařské vybavení s neznámou historií, použijí ho a v tomto vybavení se vyskytují dlouho žijící spory, včelař si je zanesou do jinak zdravého včelstva. Nebo v případě, kdy se

nesprávně určí příčina úmrtí včelstev, využije včelař zásoby a vybavení po tomto včelstvu a opět může mor přenést do zdravých včelstev. Při vyměňování a prodeji pomůcek v takových případech se pak MVP může šířit na dlouhé vzdálenosti a do míst, kde by se jinak nevyskytl. K šíření může dojít i v situaci, kdy včelař přemísťuje včelstva (Rytina et al., 2016; Titěra, 2009). Nicméně v případě přemístění včelstev mimo katastrální území obce je nutné vyšetření včel na přítomnost původce moru včelího plodu (Zákon č. 166/1999 Sb., § 6; Opatření obecné povahy č. 49935/2019-MZE-18142).

1.4.4. Příznaky

Jedním z příznaků nakaženého včelstva může být mezerovitost plodu. Matka klade vajíčka spirálovitě od středu plástu ke krajům a dělnice odstraňují přirozeně špatně se geneticky vyvíjející plod, čímž vzniká cca 5% mezerovitost. Pokud je mezerovitost jasně viditelná, značí to něco nepřírozeného, např. špatně kladoucí matku nebo vysokou úmrtnost včelích larev, která může být právě důsledkem onemocnění (Rytina et al., 2016; Titěra, 2009).

U těžce nakaženého včelstva můžeme pozorovat na plástech výrazné změny oproti plástům zdravých včel, tzv. klinické příznaky – mimo mezerovitosti plodu také rozkládající se larvy měnící barvu a tvar v kašovitou hmotu, která později vyschne v příškvár přichycený v buňce a obsahující miliardy spor. Dále také nález proděravělých víček buněk – dospělé včely kontrolují larvy uvnitř a nestíhají odklízet ty nakažené. V některých případech funguje dříve užívaný zápalkový test – sirka se vloží do buňky s rozkládající se larvou a pokud se při jejím vyjmutí za sirkou táhne vlákno kašovité hmoty, mělo by se jednat o MVP (Titěra, 2009).



Obr. 6.: **Porovnání včelích plástů:** vlevo zdravé včelstvo (autor: K. Haltufová), uprostřed nález rozkládajících se larev napadených *P. larvae* označených špejlemi (autor: MVDr. Martin Kamler), vpravo plást silně nakaženého včelstva (nález proděravělých a propadlých víček, mezerovitosti a nakažených rozkládajících se larev (zdroj: The Bee Informed Partnership, American foulbrood; autor: Rob Snyder; beeinformed.org).

1.4.5. Nařízení a postup při nákaze MVP

Je zákonem stanoveno, že při podezření na MVP přijede na stanoviště veterinární inspektor a provede klinické vyšetření všech včelstev na stanovišti s rozebráním včelího díla a odebere k laboratornímu vyšetření vzorky, jimiž jsou plásty s klinickými příznaky nebo s příškvarou, případně vzorky měli či medných zásob. Také provede šetření o možném původu nákazy a jejím šíření. Včelaři je nařízen zákaz přemísťování včelstev a veškerého příslušenství a zákaz používání produktů z podezřelého stanoviště. Taktéž musí vyhotovit soupis včelstev a všech používaných pomůcek na stanovišti. Pokud jsou u včelstva pozorovány klinické příznaky s příškvarou a v laboratoři je potvrzena přítomnost *P. larvae* (viz podkapitola 1.4.6.), včely jsou považovány za nakažené, krajská veterinární správa (KVS) vymezí stanoviště jako ohnisko nákazy a v okolí nejméně 3 km je zřízeno ochranné pásmo (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 8-12). V případě více než 15 % nakažených včelstev na stanovišti je nařízeno utratit a spálit všechna včelstva na stanovišti a zlikvidovat či vydesinfikovat pomůcky používané u těchto včelstev. V případě méně než 15 % nakažených včelstev na stanovišti je nařízeno utratit a spálit nakažená včelstva (není však vyloučena ani možnost spálení celého stanoviště) a zlikvidovat či vydesinfikovat pomůcky používané u těchto včelstev. Následně provede včelař u zbylých nespálených včelstev přeměti na mezistěny do nových či desinfikovaných úlů, odstraní a zlikviduje staré včelí dílo, plásty a plod a odstraní či ošetří včelí produkty z tohoto ohniska. Pokud u těchto včel během následujícího roku opětovně propukne MVP, jsou utraceny a spáleny veškeré včely (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 11).

Včelařům v ochranném pásmu KVS nařídí odebrat vzorek včel nebo měli k bakteriologickému vyšetření na MVP a zakáže přemísťování včelstev. Pokud jsou tato nařízení dodržena a laboratorní výsledky na MVP negativní, nejdříve za 6 měsíců lze ukončit opatření v ochranném pásmu. Pokud nebyla tato opatření dodržena, ukončit opatření lze nejdříve za 12 měsíců (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 11). KVS včelstva dále monitoruje.

V případě nutnosti utracení včel je včelaři po podání žádosti poskytnuta náhrada nákladů a ztrát za utracení včel, včelařského vybavení, desinfekci nástrojů nebo dodržení opatření v ochranných pásmech (Zákon č. 166/1999 Sb., § 67; Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 13).

1.4.6. Detekce *P. larvae*

Laboratorní vyšetření na přítomnost či absenci bakterie v odebraném vzorku je nutnou součástí každého vyšetřování včel s podezřením na mor včelího plodu. Včelaři jej však využívají i při preventivních, pravidelných kontrolách. Vyšetření je možné provést z

dospělých včel i larev, také z různých včelích produktů, ale nejčastěji se provádí z voskové měli, která je tvořena materiálem spadáním na dno úlu, nejčastěji však voskem. Vzorky jsou předány akreditované laboratoři (OIE - World Organisation for Animal Health, 2018; Titěra et al., 2018). U nás je lze dohledat na stránkách Českého institutu pro akreditaci, patří mezi ně například Výzkumný ústav včelařský v Dole (VÚVč), Státní veterinární ústav Praha, SVÚ Olomouc, SVÚ Jihlava atd. (ČIA [online]).

Nejběžnější detekční metodou *P. larvae* je kultivační vyšetření na živném médiu. Molekulární metody pak nabízí třeba konvenční polymerázovou řetězcovou reakci – PCR nebo kvantitativní polymerázovou řetězcovou reakci v reálném čase – qPCR (OIE - World Organisation for Animal Health, 2018).

1.4.6.1. Kultivační vyšetření

Vzorky určené k detekci bakterie (měl, včely apod.) se homogenizují do podoby roztoku a zahřívají při teplotě 80-95 °C po dobu 3-10 minut v závislosti na použité metodě, díky čemuž je zahubena většina nežádoucích nesporelujících mikroorganismů (*P. larvae* není zničen díky velmi odolným sporám, viz podkapitola 1.3.). Takto připravené vzorky se naočkují na Petriho misky s živným médiem a kultivují za definovaných podmínek (aerobně při 36 °C, 6-9 dní). Narostlé kolonie se poté spočítají a identifikují. Vzorky se ředí tak, aby bylo možné spočítat kolonie a stanovit množství patogenu v 1 gramu vyšetřované matrice či na počet včel v původním vzorku. Počet kolonií odpovídá množství spor v původním vzorku. Detailnější popis metody lze nalézt v knize Mor včelího plodu – Diagnostika, prevence a tlumení vydané VÚVč (Titěra et al., 2018) a doporučený postup je přístupný také v Manuálu diagnostických testů a vakcín pro suchozemská zvířata (OIE - World Organisation for Animal Health, 2018) a Standardních metodách pro výzkum moru včelího plodu od Mezinárodní společnosti pro výzkum včel (de Graaf et al., 2013).

Údaj na protokolu	Značí číslo	Znamená nález	Klinické příznaky
negativní	0	žádný, případně méně než sto	nejsou
10 ²	100	stovky	nejsou
10 ³	1 000	tisíce	mohou se objevit v budoucnu
10 ⁴	10 000	desetitisíce	zpravidla bývají
10 ⁵	100 000	statisíce	zpravidla bývají
10 ⁶	1 000 000	miliony	zpravidla bývají

Tab. 1.: **Interpretace výsledků kultivačního vyšetření.** Mocniny deseti v prvním sloupci označují počet kolonií v logaritmickém tvaru (CFU – z anglického Colony-forming units).

Nález vyššího počtu spor znamená více nemocné včelstvo. Převzato z Mor včelího plodu – Diagnostika, prevence a tlumení (Titěra et al., 2018).

1.4.6.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Cílem této metody je amplifikace požadovaného úseku DNA. Ta probíhá v přístroji zvaném termocykler, který dokáže během krátké chvíle změnit teplotu, ve které reakce probíhá, o desítky stupňů. To ovlivňuje stabilitu dsDNA, která při vysokých teplotách denaturuje, při snížení teploty nasedají na cílenou sekvenci specifické krátké oligonukleotidy (primery), které tento úsek DNA označí, díky čemuž ho lze pomocí DNA polymerázy amplifikovat. Množení probíhá desítky cyklů a výsledný produkt je následně rozpoznán pomocí elektroforézy. To je separační metoda, při níž se různou rychlostí pohybují částice v médiu díky působení stejnosměrného proudu. Nejčastěji používaná gelová elektroforéza dovoluje rychlou separaci nukleových kyselin, je to levná metoda, vhodná pro určení přítomnosti či absence požadovaného úseku DNA (Rudge & Monnig, 2000; Saiki et al., 1985; Šmarda et al., 2008). Konkrétní doporučený postup je přístupný v Manuálu diagnostických testů a vakcín pro suchozemská zvířata (OIE - World Organisation for Animal Health, 2018) nebo detailněji ve Standardních metodách pro molekulární výzkum *Apis mellifera* (Evans et al., 2013).

1.4.6.3. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)

Touto metodou je možné sledovat amplifikaci DNA v reálném čase, resp. na konci každého cyklu, a to díky využití klasické PCR metody amplifikace cílové sekvence za použití specifických primerů probíhající v termocykleru, který ale zároveň disponuje zařízením pro detekci fluorescence, jež zaznamenává fluorescenční signál, který je během reakce emitován díky fluoroforu vázajícímu se na amplifikované úseky DNA. Přístroj poté dokáže přeměnit vložené úvodní informace a průběžně měřenou míru fluorescence v numerickou hodnotu pro každý vzorek (Heid et al., 1996). Existují fluorofory nespecifické (např. SYBR® Green) nebo specifické (tzv. próby). Nespecifické fluorofory jsou levnější, ale váží se obecně na dvoušroubovici DNA, nikoli pouze na požadovaný úsek, což je nevýhodné v případě amplifikace nespecifických produktů kvůli méně specifickým primerům či malému obsahu námi hledané DNA v původním vzorku (Dorak & et al., 2006; Ruiz-Villalba et al., 2017; Šmarda et al., 2008). Dále je popsán postup využívaný v této práci, tedy absolutní kvantifikace pomocí standardní křivky za použití nespecifického fluoroforu SYBR®Green. V momentě, kdy se produkt naamplifikuje do takové míry, že intenzita fluorescence vzorku přesáhne intenzitu fluorescence jeho původního pozadí (baseline), přechází reakce do geometrické, resp. exponenciální fáze. V ní dochází k exponenciální amplifikaci produktu, kde čím více fluorescenčního signálu je zaznamenáno, tím více fluoroforu je navázáno na dsDNA, a tím větší množství DNA je naamplifikováno. Pak nastává lineární fáze, kdy

dochází k mírnému poklesu nárůstu, která přechází do plató fáze, kdy již nárůst produktu ani fluorescenčního signálu nepokračuje, z důvodu vyčerpání složek reakce (Applied Biosystems, 2007; Dorak & et al., 2006).

Do reakce byly přidány kromě vzorků s neznámou koncentrací genetické informace, kterou chceme zjistit a kvantifikovat, také vzorky se známou koncentrací DNA, které obsahují sekvence hledaného produktu – standardy. Ty se nejčastěji ředí desítkovou řadou. Tyto určité koncentrace standardů pak získají danou hodnotu kvantifikačního cyklu C_q , také nazývanou C_t , C_p či TOP (Bustin et al., 2009). C_q označuje číslo cyklus, při kterém fluorescenční signál vzorku překročí fluorescenční signál pozadí, resp. cyklus, ve kterém se naamplifikuje dostatečné množství produktu vydávající jasnější signál než emituje pozadí. Čím dříve dosáhne vzorek růstu amplifikační křivky, tím nižší bude jeho výsledná hodnota C_q , která je určena proložením amplifikačních křivek thresholdem v exponenciální fázi. Nižší C_q se tedy vyhodnotí u vzorků, které mají vyšší počáteční množství DNA (Dorak & et al., 2006). Hodnotám C_q odpovídají jednotlivé body standardů, jimiž je vedena přímka – standardní křivka (standard curve), která je v programu spočtena za využití metody nejmenších čtverců lineární regrese. Díky známé koncentraci standardů lze tedy stejným způsobem stanovit množství DNA v neznámých vzorcích (Dorak & et al., 2006).

Účinnost (efficiency) by měla být ideálně 100 %, akceptovaný rozsah je většinou 90-110 %. Výsledky účinnosti různé od 100 % mohou být způsobeny například nenamnožením dvojnásobku produktu v každém cyklu, nepřesným pipetováním, přítomností inhibitorů atd. Ideální sklon křivky by byl -3,32 (indikuje 100% úspěšnost), hodnota R^2 rovna 1,00 (indikuje perfektní míru vzájemné shody regresní linie standardní křivky a hodnot C_q standardu) a y-intercept mezi 33-37 cyklem (umístění mimo rozsah indikuje odlišné určení množství templátu). Parametry standardní křivky se mění například v závislosti se přesnosti pipetování, proto je doporučeno pipetovat v tripletech (Applied Biosystems, 2006, 2007; Dorak & et al., 2006).

Po dokončení amplifikace produktu následuje snížení teploty a její postupné rovnoměrné zvyšování, při kterém je zaznamenáván fluorescenční signál. V určitém momentě a při určité teplotě nastává denaturace dsDNA namnoženého produktu a následné vyvázání fluoroforu, které se projeví rychlým poklesem fluorescenčního signálu. Výsledkem je křivka tání (melt curve), na které je teplota poklesu zaznamenána a pro každý produkt je tak získána specifická teplota tání (T_m). Díky analýze křivky tání lze ověřit specifitu produktů, teploty tání se liší pro různé produkty. Specifitu produktů je možné ověřit také pomocí gelové elektroforézy

(Dorak & et al., 2006). Doporučený postup je přístupný také v Manuálu diagnostických testů a vakcín pro suchozemská zvířata (OIE - World Organisation for Animal Health, 2018) nebo detailněji ve Standardních metodách pro molekulární výzkum *Apis mellifera* (Evans et al., 2013).

1.4.7. Léčba

V některých zemích (Spojené státy americké, Kanada, ...) se pro léčbu moru včelího plodu využívají antibiotika (např. oxytetracyklin), ta však působí pouze na vegetativní stádia, nikoli na spory, tudíž nedokážou včelstvo zbavit nemoci. Navíc si *P. larvae* proti nim vytvořil za desítky let používání rezistenci a rezidua antibiotik také zůstávají ve včelstvu, tedy i v zásobách a mohou se vyskytnout i v medu (Evans, 2003; Kochansky et al., 2001; Pernal & Melathopoulos, 2006). V České republice je zakázáno včely takto léčit (Zákon č. 166/1999 Sb., § 5).

V návaznosti na rezistenci bakterie se v posledních letech zaměřuje výzkum více na možnost využít přirozené nepřátele *P. larvae* – bakteriofágy, tedy viry infikující bakterie. Vážou se specificky, např. různí fágové pouze na určité kmeny jednotlivých genotypů ERIC, nelze je tedy používat univerzálně. Budoucí výzkumy jistě přinesou další upřesnění současných informací a objevení nových bakteriofágů, kteří mohou pomoci v boji proti bakterii *Paenibacillus larvae* (Ribeiro et al., 2019; Santos et al., 2019; Stamereilers et al., 2018).

1.4.8. Prevence

Důležitá jsou preventivní opatření, která pomáhají snižovat riziko nakažení či přímo množství spor nakažených včelstev. Základním předpokladem pro úspěch jsou silná včelstva – ta se většinou dokážou vypořádat s nemocemi sama. Včelař také může pomoci například výběrem matky, jejíž potomci budou mít dobrý čistící pud nebo nevytáčí včelám přílišné množství medu. Včely by měly mít v okolí stanoviště dostatek potravy a při jejím nedostatku, například v déletrvajícím deštivém období či při tuhé zimě, kontroluje včelař zásoby a nenechá včely hladovět. Dále může pomoci tím, že pravidelně kontroluje svá včelstva a odesílá vzorky měli na vyšetření, případně preventivně desinfikuje a obměňuje starší dílo. Tlumí ostatní nemoci, které lze léčit. Nepoužívá materiály a krmění s neověřenou nakažovou situací, dodržuje ochranná pásma a další nařízení. Průběžně se vzdělává ve včelařských tématech a také se informuje o současné situaci v okolí, např. ohledně chorob, postřiků, nových včelstev atd., v čemž včelařům pomáhají třeba včelařské spolky (Rytina et al., 2016; Titěra, 2009).

K zamezení šíření mohou napomoci i zákonná opatření, včetně těch již zmíněných. Veterinární požadavky na včelaře ve vyhlášce 18/2018 Sb., § 3 stanovují příznivé podmínky pro život včel a patří mezi ně například dodržování čistoty a nezávadnosti úlů a včelařských pomůcek, provádění opatření proti zavlečení nákazy do včelstev, pravidelné provádění kontrol zdravotního stavu a odesílání vzorků na kontrolu do akreditované laboratoře, pečlivé zpracování vosku pro další potřebu apod. Také je dovoleno prodávat med, mateří kašičku nebo včelí vosk pouze zdravotně nezávadné a od klinicky zdravých včelstev (Zákon č. 166/1999 Sb., § 20). Pokud včelař zjistí úhyn včel nad limit stanovený prováděcím právním předpisem (více než 25 % včelstev z počtu včelstev evidovaných v ústřední evidenci k 1. září předcházejícího roku na daném stanovišti včelstev), je povinen jej neprodleně ohlásit KVS (Zákon č. 166/1999 Sb., § 5; Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 5). Při nakažení MVP je většinou nařízeno provést přemetení u včel, které nemusely být spáleny spolu s nakaženými včelstvy, a to do nových či desinfikovaných úlů na stavební rámy nebo úlů ošetřených v horké parafinové lázni při minimální teplotě 160 °C po dobu 10 minut. Dále je nutné odstranit včelí dílo ze včelstev a vytvořit podmínky pro stavbu nového díla, odstranit plásty z původního včelstva a zlikvidovat veškerý včelí plod a plodové plásty a platí také zákaz spojování včelstev (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 11). Světová organizace pro zdraví zvířat vydala a průběžně aktualizuje obecné pokyny pro kontrolu včelích chorob (OIE - World Organisation for Animal Health, 2019a, 2019b).

1.4.8.1. Přemetení včel na mezistěny

Funkční aplikovatelné opatření pro prevenci před propuknutím klinických příznaků je již zmiňované přemetení včel na mezistěny. Metoda je dlouhodobě využívána a dříve byla nazývána severské, finské, norské či švédské zimování, lze nalézt i termín přemetání. V anglicky psané literatuře můžete metodu najít pod názvem „shook swarm (method)“ či méně často jako „shaking method“. Tato technika se nevyužívá pouze jako preventivní opatření před chorobami, jako jsou mor a hniloba včelího plodu či při léčení varroázy, nosematózy, zvápenatění plodu a dalších chorob, ale včelaři ji využívají třeba při změně velikosti rámků, výměně matky, vyšší výtěžnosti vosku, při obměně včelího díla ze staršího na nové atd. (Kamler et al., 2017; Solčanský, 2016). Přemetení simuluje vyrojení se včelstva a je známo, že u rojů z nakažených včelstev byl počet *P. larvae* snížen (Fries et al., 2006).

Základem úspěchu je zvolit správné období pro provedení přemetení. Za nejvhodnější dobu k provádění této metody je takové období, kdy mají včely dostatek zdrojů potravy, důležitý je dostatek pylu. Při výběru musí včelaři přihlídnout i k místním podmínkám, kterými jsou třeba

aktuální počasí, okolní prostředí i nadmořská výška. S ohledem na tato doporučení vychází období od dubna do července. Přemetení v dřívějších měsících znemožňuje příliš chladné počasí a mohou se vyskytnout problémy s přechodem na letní generaci včel. V opačném případě hrozí, že by v plodových plástech již mohla být zimní generace včel a včely by mohly mít problém nasbírat dostatek potravy na zimu (Animal & Plant Health Agency, 2019; Kamler et al., 2017; Solčanský, 2016).

Jednotlivé kroky přemetení se mohou v závislosti na primárním účelu mírně lišit. Následující postup lze použít pro preventivní ošetření včelstva s cílem snížit infekční tlak patogenu, tedy snížit jeho množství ve včelstvu a tím zamezit propuknutí klinických příznaků moru včelího plodu (lze využít např. při pozitivním záchytu bakterie v kontrolovaných vzorcích, kdy zároveň ve včelstvu nebyly nalezeny klinické příznaky, pro ošetření včelstev v ochranném pásmu atd.). Před samotným přemetením je vhodné mít vše dopředu připravené, tedy opatřit si dezinfekční prostředky, smetáček, potravu pro přikrmování včel a další potřeby, ale především zcela nový úl s novými rámků s mezistěnami, který by měl být o třetinu menší. Nalezneme a zaklíckujeme matku, nový úl postavíme na místo původního úlu a přemístíme do něho matku. Vezmeme plásty z původního úlu a do vytvořeného menšího prostoru uprostřed nástavku (předchozím vyndáním několika rámků) sklepáváme včely přímo z plástu, a to rychlým pohybem s náhlým zastavením plástu nad novým nástavkem. Případně můžeme shora udeřit do nástavku nebo do ruky, kterou nástavek držíme.



Obr. 7.: Přemetení na mezistěny. Včelaři přemísťují včely do nového úlu. Zdroj: smugmug.com [online]

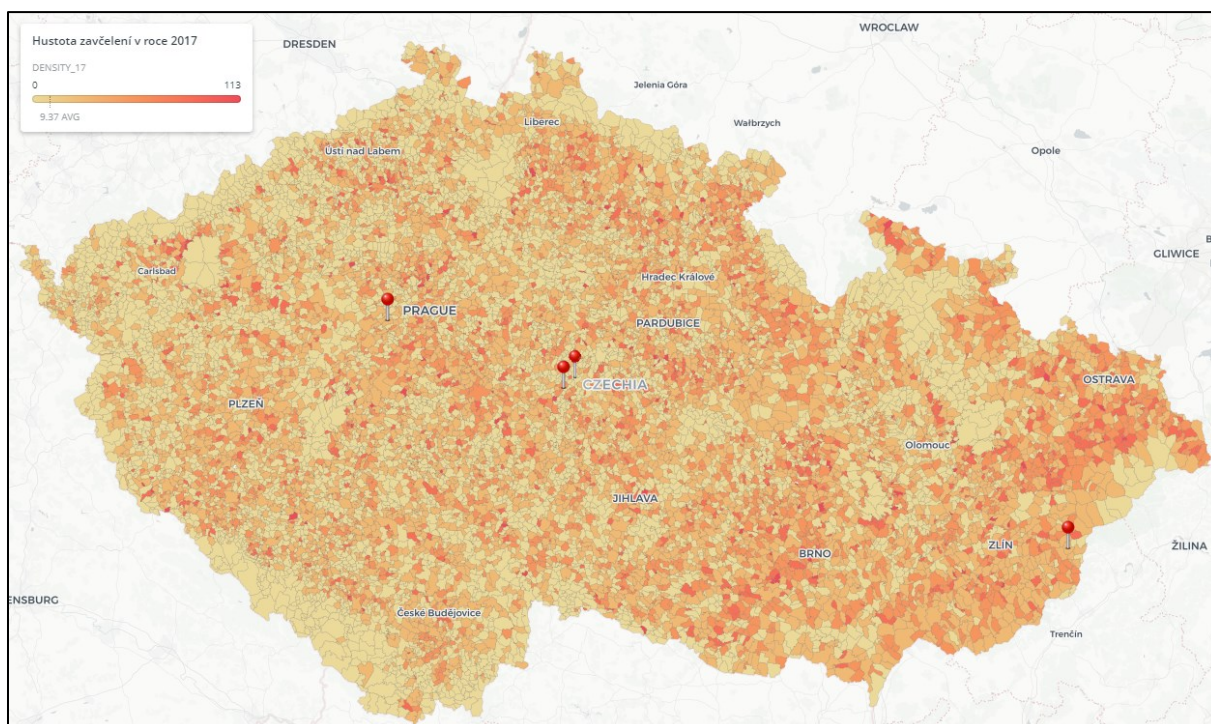
Tento postup aplikujeme na všechny plásty a jednotlivé včely smetáváme z plástu smetáčkem. Na závěr opět vrátíme vyndané rámký na původní místo. Smetené včely si však spory *P. larvae* mohou nést ve svém trávicím traktu, proto se včelaři uchylují k mezikroku, kdy včely ponechají v izolaci do doby, než stráví svou potravu (Animal & Plant Health Agency, 2019; Solčanský, 2016). Po přemetení je vhodné včely přikrmit medocukrovým těstem nebo cukerným roztokem, ve kterém mohou být přidáné imunostimulační látky, což je také součástí certifikované metodiky VÚVč o přemetení včelstev (Kamler et al., 2017). Veškeré součásti starého úlu a další užívané pomůcky mohou obsahovat spory *P. larvae*, proto je nutná jejich likvidace, kterou provedeme spálením hořlavého materiálu a důkladnou dezinfekcí nehořlavého materiálu.

Vědecké studie prováděné v nejrůznějších zemí (ČR, Dánsko, Pákistán, Turecko a další) potvrzují úspěšnost této metody u včelstev nakažených morem. Bylo dokázáno, že ačkoliv je i po přemetení *P. larvae* stále přítomen, tak v menším množství a již nejsou pozorovány klinické příznaky. Při správné následné péči mohou být včely uchráněny od spálení (Guler, 2008; Hansen & Brødsgaard, 2003; Munawar et al., 2010; Pernal et al., 2008).

2. Materiál a metodika

Jelikož patří mor včelího plodu mezi nebezpečné nákazy, nelze se vzorky zacházet bez povolení pověřených osob (Zákon č. 166/1999 Sb., § 10). Díky spolupráci naší laboratoře s Výzkumným ústavem včelařským v Dole (VÚVč) a po dohodě se SVS nám bylo umožněno si spolu s odborníky z VÚVč odebrat pro účely výzkumu vzorky včel, u nichž byl potvrzen výskyt *P. larvae*.

2.1. Lokality



Obr. 8.: Mapa s hustotou zavčelení s vyznačenými lokalitami (červené špendlíky), ze kterých byly odebrány vzorky – zleva doprava: Úhonicе, Útěšenovice, Zdeslavice, Lidečko. Zdroj CARTO [online].

2.1.1. Úhonicе – 1. odběr

Při pravidelných kontrolách zimní měli byla v testovaných vzorcích detekována kultivační metodou přítomnost bakterie *P. larvae*. Následný postup nařizuje prohlídku dotyčného včelího stanoviště a včelího díla. Klinické příznaky nebyly nalezeny. V rámci ozdravení bylo naplánováno u vybraných včelstev provést metodu přemetení na mezistěny.

2.1.2. Úhonice – 2. odběr

Po provedení přemetení na mezistěny (metoda vysvětlena v podkapitole 1.4.8.) byla odebrána druhá sada vzorků. Přemetení bylo provedeno 11.5.2015 a byla přemetena 4 včelstva (označená U1, U4, U18 a U19).

2.1.3. Lidečko

Při pravidelných kontrolách zimní měli byla v testovaných vzorcích detekována kultivační metodou přítomnost bakterie *P. larvae*. Při následné prohlídce byly u 3 včelstev nalezeny klinické příznaky, tato včelstva byla spálena.

2.1.4. Útěšenovice

Při pravidelných kontrolách zimní měli byla v testovaných vzorcích detekována kultivační metodou přítomnost bakterie *P. larvae*. U většiny včelstev byly nalezeny klinické příznaky a celé stanoviště muselo být spáleno.

2.1.5. Zdeslavice

Při pravidelných kontrolách zimní měli byla v testovaných vzorcích detekována kultivační metodou přítomnost bakterie *P. larvae*. U většiny včelstev byly nalezeny klinické příznaky a celé stanoviště muselo být spáleno.

2.1.6. Přehled odebraných vzorků

Datum sběru	28. 4. 2015	1. 7. 2015	14. 7. 2015	14. 5. 2015	14. 5. 2015	
Stanoviště	Úhonice 1	Úhonice 2	Lidečko	Útěšenovice	Zdeslavice	Součet:
Počty: včelstva	13	10	18	4	3	48
extrakce	104	80	59	13	14	270
PCR AFB	88	17	16	13	14	148
nested PCR	48	0	0	3	6	57
qPCR	41	52	31	13	15	152

Tab. 2.: **Informace o odběrech a zpracování vzorků.** Počty včelstev, z nichž byly odebrány vzorky, počet vzorků, u nichž byla provedena extrakce DNA a další metody. Jednotlivé metody jsou popsány a vysvětleny v textu.

2.2. Sběr vzorků včelích dělnic

Před odjezdem na lokalitu byly připraveny všechny potřebné pomůcky – velké průhledné plastové sáčky, lihové popisovače, deník a tužky, termobox s ledem. Ochranné včelařské pomůcky a smetáček nám byly půjčeny u včelaře. Po otevření úlu byla včelařem hlídána matka (matka bývá označena barevným kolečkem na dorzální části hrudi, barva je určena dle ročníku narození matky), aby bylo jisté, že nebude omylem smetena s ostatními včelami do vzorku. Cílem sběru byly včely, které ve včelstvu ošetřují plod, což je většinou úkol mladších včel. Sběr včel tedy probíhal z plodových plástů (Prýmas et al., 2017). Vybraný plást byl vyndán z úlu, pod něj byl vložen sáček s číslem úlu. Do nástavku bylo shora udeřeno rukou, čímž bylo do sáčku sklepnuto větší množství včel najednou, případně byl použit smetáček a jím včely z plástu do sáčku jemně ometeny. Sáček s včelami byl vložen do termoboxu s ledem, včely se chladem postupně zklidnily a ztuhly. Po odebrání všech vzorků byly včely převezeny do laboratoře, kde byly umístěny do mrazáku (-40 °C). Již zmrzlé včely byly postupně roztrženy do papírových krabiček, které byly popsány místem sběru, datem sběru, číslem úlu, případně počtem včel uvnitř krabičky a znovu umístěny ve větším sáčku do mrazáku (Evans et al., 2013).



Obr. 9.: Sběr vzorků včel na stanovišti, rok 2015; foto Kristýna Haltufová.

2.3. Fenol-chloroformová extrakce DNA

Opakovatelně používaný materiál byl pravidelně myt v ruce, pokud to bylo možné následně v myčce a poté prošel sterilizačním cyklem v autoklávu. Práce s nebezpečnými látkami byla

prováděna s obličejovým štítem a v laboratorní digestoři s odsáváním pracovního prostoru shora, aby se bylo zabráněno vdechování vzniklých výparů.

2.3.1. Sterilizace včel

Včely byly vyndány z mrazáku a rozděleny do sterilních skleněných kádinek, předem popsaných číslem úlu. Do nádoby byl nalit 96% ethanol tak, aby byly včely ponořeny. Poté byly v nádobě promíchány pinzetou a ethanol byl z nádoby slit. Tímto způsobem byly včely pročištěny celkem 1x ethanolem, 1x ethanolem 1:1 s čističem Savo (= voda, 5% chlornan sodný, sekundární komponenta chlorid sodný, hydroxid sodný) a nakonec 2x fosfátovým pufrem s Tweenem (PBST: 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl; 135 mM NaCl s 0,05% Tween® 20, No. 9127, Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo; ostatní Sigma-Aldrich Inc./MilliporeSigma).

2.3.2. Homogenizace včel

Homogenizace probíhala ve zkumavkách PP se šroubovacím uzávěrem (7 ml, Cat. No. 3205, BioSpec Products, Inc., USA). Do zkumavky bylo přidáno cca 0,5 g ostrých částic průměr 0,1 mm, cca 0,5 g ostrých částic průměr 0,3 mm (obojí Garnet beads, Cat. No. 11079110gar, resp. Cat. No. 11079103gar, BioSpec Products, Inc., USA) a 2 skleněné kuličky (Glasperlen, průměr 2,85-3,45 mm, Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo). Naplněné zkumavky byly vloženy do větší skleněné nádoby a poté prošly sterilizačním cyklem v autoklávu. Sterilizované včely byly vloženy po 10 (jeden vzorek byl tedy tvořen 10 včelami) do předem připravených a popsaných homogenizačních zkumavek. Popsány byly vždy zkumavky i víčka. Od každého vzorku bylo uděláno celkem 8 opakování (pro lokalitu Úhonic, zbylé lokality měly různé počty opakování). Každá zkumavka byla pomocí sterilní Pasteurovy pipety 1 ml, PE? doplněna 5 ml fenolu (Roti®-Phenol zur Extraktion von Nukleinsäuren; Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo; 500 ml). Včely byly tedy zcela zality roztokem, ale zároveň zbyl ve zkumavce dostatek vzduchu pro úspěšnou homogenizaci. Zkumavky byly pevně zavřeny, zalepeny pruhem Parafilm® M krycí pásky a vloženy na 2 minuty do homogenizačního přístroje MiniBeadBeater-16 (model 607EUR; firma BioSpec Products, Inc., USA). Veškerý obsah homogenizačních zkumavek byl poté přelit do předem popsaných a připravených centrifugačních zkumavek (15 ml, šroubovací uzávěr, PP; Cat No. D1003; firma KRD Praha). Poté bylo Pasteurovou pipetou přidáno 5 ml roztoku PBST a vzorky protřepány. Zkumavky byly rovnoměrně rozmístěny do centrifugy (model CL31R

Multispeed; Thermo Fisher Scientific Inc., USA) a ta puštěna na 6000 otáček po dobu 5 minut.

2.3.3. Extrakce

Zcentrifugované vzorky byly přeneseny do digestoře, kde byla pomocí automatické pipety do nových centrifugačních zkumavek odpipetována horní vrstva s H₂O, ve které byla genetická informace. Spodní vrstva s fenolem a zbytky pevných částic včel byla vyhozena do nebezpečného odpadu. K vodnému roztoku bylo Pasteurovou pipetou přidáno 5 ml roztoku chloroformu 24:1 s izo-amil-alkoholem (Chloroform p.a.; CHCl₃; Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o.; 2500 ml a 3-Methylbutan-1-ol g.r. / Izo-amil-alkohol g.r.; C₅H₁₂O; Lach-Ner, s.r.o.; 1000 ml). Zkumavky byly protřepány a opět vloženy do centrifugy na 6000 otáček po dobu 5 minut. Pročistění chloroformem a izo-amil-alkoholem bylo znovu opakováno. Po druhém přečistění byla ze vzorků odpipetována horní vrstva po 1000 µl do předem připravených a popsaných mikrozkušavek Eppendorf Tubes® 3810X 1,5 ml. Ke vzorku bylo přidáno 100 µl octanu sodného (Sodium acetate buffer solution, No. S7899-100ML, Sigma-Aldrich Inc./MilliporeSigma) a doplněno 450 µl Propan-2-ol ((CH₃)₂CHOH; Labscan Analytical Sciences; 2500 ml). Protřepané vzorky byly vloženy na 20 minut do mrazáku o -40 °C a následně pak umístěny do centrifugy na 12000 otáček po dobu 15 minut. Po tomto procesu byly na dně mikrozkušavky odstředěny veškeré mikročástice včetně genetické informace, tzv. pelet. Tekutina byla slita a pelet hlídán, aby zůstal v mikrozkušavce, která se pak nechala 1-2 minuty vyschnout. Poté bylo do mikrozkušavek jednoho vzorku rozpipetováno rovnoměrně 1000 µl 70% ethanolu (100% ethanol se zředí poměrem 70:30 s dvakrát autoklávovanou ddH₂O; uchovává se v mrazáku při -40 °C), díky kterému byly pelety pipetou jednodušeji přendány do jedné mikrozkušavky (s konečným objemem 1000 µl a všemi pelety jednoho vzorku). Mikrozkušavky pak byly znovu umístěny do centrifugy na 12000 otáček po dobu 15 minut. V mezičase byla dvakrát autoklávovaná ddH₂O vložena do suché lázně Block Heater (model HB-1; Wealtec Corp.) nastavené na 60 °C, aby byla připravena na později. Z mikrozkušavek byl slit ethanol, pelet znovu hlídán a mikrozkušavky, otočeny otevřeným víčkem dolů, byly nechány 5 minut vyschnout. Dále byly mikrozkušavky naskládány do přístroje Digital SpeedVac Concentrator (model SPD111V-230; Thermo Fisher Scientific Inc.) nastaveného na 45 °C a 10 minut, aby byl odstraněn zbylý ethanol. Mikrozkušavky s vysušenými pelety byly umístěny do suché lázně Block Heater (teplota 60 °C zachována) do každého vzorku bylo přidáno 200 µl zahřáté dvakrát autoklávované ddH₂O a pelet byl

postupně rozpouštěn (proces byl zrychlen při využití pipetových špiček na promíchávání – jedna pro každou mikrozkušavku).

2.3.4. Purifikace

Po úplném rozpuštění peletu bylo nutné vzorky přečistit na přístroji WOB-L Pres/Vac Dry Pump 2 (model 2522Z-02; Welch – Gardner Denver Thomas, Inc.). K tomu byl používán kit GeneAll® Expin™ Combo GP (GeneAll Biotechnology Co., South Korea), který obsahoval speciální kolonky typu D (zavíčkovaná mikrozkušavka s průtočnou sběrnou trubicí místo dna, která byla vložena do zkumavky bez víčka), pufr PB, pufr NW, pufr EB a příručku. Také byly připraveny nové mikrozkušavky Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml a dvakrát autoklávaná ddH₂O. Zavíčkované mikrozkušavky byly nasazeny na zavřené vývody přístroje WOB-L a popsány stejně jako vzorky, zkumavky bez víčka zůstaly ve stojánku. Přístroj byl zapnut a postupně byly otevírány vývody, které byly použity. Do vzorku bylo napipetováno 700 µl pufru PB a propipetováno, aby se vzorek s pufrem smísily. Roztok byl následně napipetován do příslušné filtrované mikrozkušavky. Po protečení bylo napipetováno 700 µl pufru NW a vpraveno přímo do filtrované mikrozkušavky. Po protečení byl přístroj vypnut, mikrozkušavka vložena zpět do zkumavky bez víčka a celá kolonka vložena do centrifugy na 12000 otáček po dobu 3 minut pro odstředění zbytků pufru. Zavíčkované zkumavky byly opatrně vloženy do předem připravených a popsáných mikrozkušavek Eppendorf, otevřeny a dovnitř na filtr bylo opatrně napipetováno 200 µl dvakrát autoklávaného ddH₂O. Po cca 3 minutách byly vzorky opět vloženy do centrifugy na 12000 otáček po dobu 3 minut. H₂O, spolu s navázanou DNA, protékla do nové mikrozkušavky, čímž byla purifikace DNA dokončena.

2.4. Polymerázová řetězová reakce a elektroforéza

2.4.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Vybrané vzorky byly připraveny do stojánku a spočítány (konečný počet vzorků byl navýšen o pozitivní kontrolu (PK), negativní kontrolu (NK) a přiměřené množství rezervních vzorků – cca 10 %). Bylo dopočítáno konkrétní množství pro všechny vzorky, které bylo potřeba namíchat do předem popsáné mikro zkumavky Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml z jednotlivých složek mastermixu – většinou ve dvou variantách: s eubakteriálními primery a specifickými primery pro AFB.

Taxon	Lokus	Název	Primer (5'-3')	Délka (bp)	Zdroj
Bakterie	16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465	(Weisburg et al., 1991)
		1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT		
		AFBF	CTTGTGTTTCTTTCTGGGAGACGCCA	1106	(Dobbelaere et al., 2001)
		AFBR	TCTTAGAGTGCCACCTCTGCG		

Tab. 3.: **Primery použité při PCR.** Pozn.: AFBF a ABFR primery jsou doporučeny i v Manuálu diagnostických testů a vakcín pro suchozemská zvířata (OIE - World Organisation for Animal Health, 2018) a ve Standardních metodách pro výzkum moru včelího plodu od Mezinárodní společnosti pro výzkum včel (de Graaf et al., 2013).

Následující údaje pro jeden vzorek (12 µl roztoku + 1 µl DNA) byly tedy vynásobeny konkrétním počtem vzorků:

- 9,1875 µl ddH₂O (2x destilovaná, 2x autoklávovaná voda)
- 1,25 µl DreamTaq™ pufr (Cat. No. B65, Thermo Scientific™)
- 0,25 µl dNTPs (Promega, USA)
- 0,5 µl F 10 µM (primer, F = forward)
- 0,5 µl R 10 µM (primer, R = reverse)
- 0,0625 µl DreamTaq DNA polymeráza (5 U/µL, No. EP0705, Thermo Scientific)
- 0,25 µl DMSO (Promega, USA)
- 1 µl DNA (vzorek, u PK vzorek *P. larvae*, u NK ddH₂O)

Mastermix byl po přidání všech složek promíchán na vortexu a jednotlivé složky byly vráceny do mrazáku. Mastermix roztoky byly uchovávány v nadrceném ledu v termoboxu a začalo se s jejich rozpipetováním do předem popsanych mikrozkuvek Eppendorf PCR Tubes 0,5 ml. Mezi každým pipetováním byly znovu promíchány. Když byly mikrozkuvky pro bakteriální a AFB primery rozpipetované, začal se do každé mikrozkuvky 0,5 ml přidávat 1 µl konkrétního vzorku. Do PK byl přidán místo vzorku záměrně vytvořený vzorek *P. larvae* (viz podkapitola 2.4.4.). Do NK byla místo vzorku přidána dvakrát autoklávovaná ddH₂O. Připravené vzorky byly vloženy do držáku přístroje Thermal Cycler C1000 a průběh reakce nastaven takto:

- 1. cyklus = 95 °C; 3 minuty
- 2. cyklus = 95 °C; 0,5 minuty
- 3. cyklus = 55 °C; 0,5 minuty
- 4. cyklus = 72 °C; 1 minuta
- 5. cyklus = postupně 34x opakovat cykly 2, 3, 4
- 6. cyklus = 72 °C, 5 minut

2.4.2. Gelová elektroforéza a vizualizace výsledků

Po skončení PCR byly vzorky zamrazeny či rovnou použity pro zkontrolování gelovou elektroforézou. Podle množství vzorků byla připravena velikost elektroforézy. Bylo potřeba připravit jednotlivé složky pro vytvoření gelu, ve kterém probíhá celá reakce (množství jednotlivých složek bylo měněno dle potřeby velikosti gelu, ale poměr zůstal zachován):

- 1 g = agaróza SeaKem® LE Agarose, Lonza, USA (1% agarózový gel)
- 100 ml = pufr (Rotiphorese® 50x TAE Puffer, No. CL86.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo; ředěný 50x s ddH₂O)
- 6 µl = fluorescenční barvivo SYBR Green (DMSO v poměru 10:1 s barvivem SYBR®Safe DNA Gel Stain, Cat. No. S33102, Invitrogen, USA)

Do skleněné kádinky bylo přidáno požadované množství agarózy, přilít pufr, vloženo magnetické míchátko a kádinka byla vložena do mikrovlnné trouby na 2-3 minuty (dokud nezačal pufr vřít, aby se agaróza dostatečně rozpustila). V této mezidobě byla připravena nádoba, ve které později gel tuhl, a hřebeny, které vytvořily otvory v gelu pro následné umístění vzorků. Vroucí gel byl přemístěn na magnetickou podložku a magnetické míchátko postupně ochlazovalo roztok cca 5 minut na teplotu okolo 50 °C. Poté bylo pipetou přidáno barvivo a roztok byl promíchán na nejvyšší možnou rychlost, aby se barvivo dobře rozmístilo v roztoku. Poté byl gel nalit do předem připravené ze stran utěsněné nádoby a nechal se 15-30 minut tuhnout. Ztuhlý gel byl přendán do nádoby pro elektroforézu s připraveným dostatečným množstvím pufru, aby byl gel celý ponořený. Z ponořeného gelu byly vyndány hřebeny. Na sterilní Parafilm® M krycí pásku byly nanесeny jednotlivě malé kapky oranžového vkladacího pufru (PCR Loading Buffer Yellow, Lot. No PO64082019, Top-Bio) na obarvení vzorků. Nyní byly vzaty vzorky po PCR z Thermal Cycleru či z mrazáku a z každého vzorku bylo pipetou odebráno 5 µl, smícháno s kapkou vkladacího pufru a vpipetováno do otvoru v tuhém gelu v elektroforéze. První otvory v každé řadě zůstávaly prázdné a po vpipetování všech vzorků do nich byl napipetován hmotnostní marker DNA Ladder 1 nebo 2 (ZipRuler™ Express DNA Ladder Set, ready-to-use, Cat. No. SM1373, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), který zde představuje vzor k určení velikosti našich ampliconů. V případě 2% agarózového gelu pro identifikaci produktů z qPCR (viz obr. 16., str. 40) byl použit 50 bp GeneRuler™ DNA Ladder (Cat. No. SM0373, Thermo Scientific). DNA Ladder obsahuje směs fragmentů o známém počtu bp – v gelu viditelné díky barvivu SYBR Green jako proužky odstupňované ve směru proudu, které lze porovnat s naším vzorkem. Jakmile byly všechny vzorky napipetovány, elektroforetická soustava

(ENDURO™ 300 V Power Supplies, E0303, Labnet International) byla zpuštěna na 100 V a 350 mA a nechala se 20-30 minut pracovat za občasných kontrol. Do sešitu byly přesně zapsány umístění vzorků v gelu. Po skončení elektroforézy byl gel vyňat a přenesen do transiluminátoru InGenius LHR (SYIGLHR/1049, SYNGENE, USA), který díky kameře a UV světlu ve spojení s počítačem a programem GeneSnap (Syngene) vizualizoval výsledky elektroforézy a prokázal přítomnost či nepřítomnost v našem případě bakterií. Pokud se nacházel proužek u pozitivní kontroly (reakce funguje správně) a také se proužek nenacházel u negativní kontroly (reakce nebyla kontaminována), pravděpodobně nevznikla v dosavadní reakci chyba. Pokud se zároveň u našich vzorků nacházely proužky o správné velikosti, výsledky byly zapsány jako pozitivní, pokud se i navzdory pozitivní PK u našich vzorků proužky nenacházely, výsledky byly zapsány jako negativní.

2.4.3. Zahnížděná polymerázová řetězová reakce (nested PCR)

Pokud při vizualizaci výsledků PCR nevykazovaly vzorky s AFB primery přítomnost *P. larve*, ale PK byla jasně viditelná, byla u vzorků provedena nested PCR. Vzorky, které prošly PCR s eubakteriálními primery, byly použity jako DNA templát pro nový běh PCR se specifickými AFB primery, prošly tedy podruhé PCR (stejně nastavení) a s dvěma sadami primerů (Thompson et al., 2013; van Pelt-Verkuil et al., 2008).

2.4.4. Pozitivní kontrola

Vzorek pozitivní kontroly (PK) v tomto případě vždy obsahoval extrahovanou DNA bakterie *Paenibacillus larvae* a byl vytvořený za účelem ověření, zda reakce fungovala správně pro detekci této bakterie – PK tedy měla při vizualizaci vždy pozitivně potvrdit přítomnost bakterie. Pro výrobu PK byla využita Petriho miska se záměrně narostlými koloniemi bakterie *P. larvae* (získaná z VÚVč). Manipulace byla velmi opatrná, aby se předešlo jakékoliv kontaminaci. Sterilním párátkem byla odebrána kolonie (do vzorku PL1 kolonie o průměru 2 mm, do PL2 kolonie o průměru 4 mm a do PL3 3 kolonie o průměru 2 mm), které byly vloženy do předem připravených a popsaných mikrozkušavek Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml, ve kterých se nacházela dvakrát autoklávaná ddH₂O, do níž byl přidán Chelex®100 (C7901-25G, Sigma-Aldrich Inc./MilliporeSigma), který tvořil 5 % výsledného roztoku. Následně byly mikrozkušavky vloženy do suché lázně Block Heater (model HB-1; Wealtec Corp.), kde se zahřívaly 15 minut při teplotě 95 °C. Nakonec se nechaly 1 minutu stáčet na centrifuze při rychlosti 7500 otáček. Uchovávány byly v mrazáku s ostatními vzorky.

2.5. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)

2.5.1. Příprava

Veškerý materiál byl připraven v laminárním boxu (firma ESCO) pro zabránění kontaminace vzorků a s ošetřením prostoru UV světlem po dokončení práce v digestoři. Pipety, centrifuga, vortex a další konkrétní potřebné předměty byly používány pouze v této digestoři na procedury, při kterých nesmělo dojít ke kontaminaci.

Vybrané vzorky spolu s PN a NK byly připraveny do stojanu pro mikrozkušavky, spočítány a tento počet zdvojnásoben, pipetováno bylo v duplikátech (konečný počet byl navýšen o přiměřené množství sloužící jako rezerva roztoku – cca 5-10 %). V PC v programu Step One™ Software (Reaction Setup), skrze který budou později zobrazovány výsledky, bylo dopočítáno konkrétní množství všech přísad budoucího premixu. Následující údaje pro jeden vzorek (18 µl roztoku + 2 µl DNA) byly tedy vynásobeny konečným počtem vzorků a bylo potřeba je namíchat do předem popsání mikro zkumavky Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml nebo 2 ml z jednotlivých složek:

- 10 µl GoTaq® qPCR Master Mix (BRYT Green®; kat. č. A6001, Promega)
- 0,8 µl dvakrát autoklávaná ddH₂O
- 3,6 µl F 10 µM = PL2-Fw (ředěn 10:90 s ddH₂O)
- 3,6 µl R 10 µM = PL2-Rev (ředěn 10:90 s ddH₂O)
- 2 µl DNA (vzorek, u PK vzorek *P. larvae*, u NK ddH₂O)

Lokus	Název	Primer (5'-3')	Délka (bp)	Zdroj
16S rRNA	PL2-Fw	CGGGAGACGCCAGGTTAG	380 bp	(Forsgren & Laugen, 2013; Martínez et al., 2010)
	PL2-Rev	TTCTTCCTTGGCAACAGAGC		

Tab. 4.: Primery použité při qPCR (Metabion International AG, Německo).

2.5.2. Ředění standardů

Pro výrobu standardů byl použit kolegyní Ing. Martou Nesvornou v laboratoři vyrobený roztok linearizovaného rekombinantního plazmidu v TE pufru, který zahrnoval vektor – plasmid (pGEM®-T Vector, Promega A1360) a cizorodý fragment DNA, který tvořila jedna kopie PCR produktu amplifikovaného primery PL2-Fw a PL2-Rev. Tento koncentrovaný zásobní roztok byl uchováván v mrazáku při -40 °C a před reakcí zředěn s ddH₂O a to desítkovým měřením. K 10 µl roztoku bylo přidáno 90 µl ddH₂O a pečlivě promíseno, z takto

zředěného roztoku bylo odebráno 50 μl , napipetováno do předem připravené a popsané mikrozkušavky Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml a následně bylo přidáno 450 μl ddH₂O. Během ředění bylo nejdůležitější neustálé promíchávání všech vzorků na vortexu i pipetou při přidávání vody. Tímto způsobem bylo naředěno 9 nových roztoků, budoucích standardů:

- ST 1 = 10 μl zásobního roztoku + 90 μl ddH₂O (koncentrace DNA 5,4 ng/ μl)
- ST 2 = 50 μl ST 1 + 450 μl ddH₂O (koncentrace DNA 0,54 ng/ μl)
- ST 3 = 50 μl ST 2 + 450 μl ddH₂O (koncentrace DNA 0,054 ng/ μl)
- ST 4 = 50 μl ST 3 + 450 μl ddH₂O (koncentrace DNA 0,0054 ng/ μl)
- ST 5 = 50 μl ST 4 + 450 μl ddH₂O (koncentrace DNA 5,4⁻⁴ ng/ μl)
- ST 6 = 50 μl ST 5 + 450 μl ddH₂O (koncentrace DNA 5,4⁻⁵ ng/ μl)
- ST 7 = 50 μl ST 6 + 450 μl ddH₂O (koncentrace DNA 5,4⁻⁶ ng/ μl)
- ST 8 = 50 μl ST 7 + 450 μl ddH₂O (koncentrace DNA 5,4⁻⁷ ng/ μl)
- ST 9 = 50 μl ST 8 + 450 μl ddH₂O (koncentrace DNA 5,4⁻⁸ ng/ μl)

2.5.3. Pipetování

Všechny pipetované standardy a vzorky byly před použitím řádně promíseny na vortexu. Podle konečného počtu vzorků byly do destiček (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, Applied Biosystems) nejprve vpipetovány po 20 μl standardy ST2 – ST9 (ST1 byl kvůli vysoké koncentraci vynechán). Všechny vzorky byly napipetovány duplicitně. Následně byly pipetovány konkrétní vzorky (nejprve 2 μl DNA a poté 18 μl premixu) a nakonec stejným způsobem PK a NK. Po celou dobu byly všechny mikrozkušavky stále promíchávány. Po napipetování jednotlivých sloupců byla nasazena víčka a případně na okrajích popsána. Konkrétní umístění vzorků bylo pečlivě zapsáno do sešitu. Připravené vzorky byly stočeny na centrifuze.

2.5.4. Přístroj StepOnePlus™

Zcentrifugované vzorky byly vloženy do držáku přístroje StepOnePlus™ (Real-Time PCR System, Part No. 4376592, Applied Biosystems™) a v propojeném PC v programu StepOne™ Software nastaven typ experimentu na získání kvantitativních dat pomocí standardní křivky, jako reagens SYBR® Green, další konkrétní údaje (názvy vzorků, ...) a jednotlivé cykly takto:

- 1. cyklus = 95 °C; 2 minuty
- 2. cyklus = 95 °C; 15 sekund
- 3. cyklus = 58 °C; 1 minuta

- postupně 40x opakovat cykly 2 a 3
- 4. cyklus = 95 °C, 15 sekund
- 5. cyklus = 55 °C, 1 minuta
- 6. cyklus = postupně po 0,5 °C dosáhnout 95 °C a v nich setrvat 15 sekund

Po skončení procesu byly vzorky uchovávány v mrazáku -40 °C.

2.5.5. Zpracování kvantitativních hodnot

Po dokončení qPCR experimentu byly programem StepOne™ Software vyhodnoceny výsledky, mimo jiné také množství cílové molekuly ve vzorcích v ng/μl (Quantity) určené na základě standardní křivky (viz podkapitola 1.4.6.3.). S touto hodnotou bylo dále pracováno a naším cílem bylo získat díky ní počet kopií *P. larvae* v původním vzorku před amplifikací přepočtený na jednu včelu. K tomu bylo potřeba získat počet kopií na 1 ng standardu. Tato hodnota byla získána pomocí vzorce (využit např. ve člancích Ogier et al., 2019; Ramkissoon et al., 2020):

$$\text{Počet kopií} = (\text{množství DNA v ng} \cdot 6.022 \times 10^{23}) / (\text{délka DNA fragmentu v bp} \cdot 1 \times 10^9 \cdot 650)$$

6.022×10²³ – Avogadrova konstanta; 1×10⁹ převod na ng; 650 Daltonů – průměrná váha DNA bp

Poté byl dopočítán počet kopií *P. larvae* na včelu pomocí vzorce obdrženého v laboratoři:

$$\text{Počet kopií} = \text{počet kopií na 1 ng standardu} \cdot \text{hodnota Quantity} \cdot \text{objem}$$

preparátu · ředění / objem DNA, který byl dán do reakce / počet včel v jednom vzorku

Získané hodnoty byly navzájem porovnávány pomocí grafů vytvořených v programu Microsoft Excel, pomocí programu RStudio 4.0.0 (Zvára, 2008) v jednotlivých podkapitolách ve Výsledcích a konkrétní hodnoty je možné najít v tabulce 5. v podkapitole 3.1.2.

2.6. Sangerovské sekvenování

Vybrané vzorky z qPCR byly v laboratoři naklonovány Ing. Martou Nesvornou a odeslány společnosti Macrogen (Soul, Korejská republika) na osekvenování. Následné sekvence byly zpracovány v programu SnapGene, verze 5.1.4.1. (GSL Biotech LLC) a porovnány skrze NCBI se sekvencemi v GenBank pomocí Standard Nucleotide BLAST (NCBI [online]).

2.7. Kultivační vyšetření

Vzorky včel ze stejných stanovišť ve stejné dny byly odebrány kolegy z VÚVč a testovány na přítomnost bakterie *P. larvae* pomocí kultivační metody, jejíž postup je uveden v podkapitole 1.4.6.1. Tato metoda nebyla zpracovávána mnou, ale její výsledky budou porovnávány s mými výsledky.

3. Výsledky

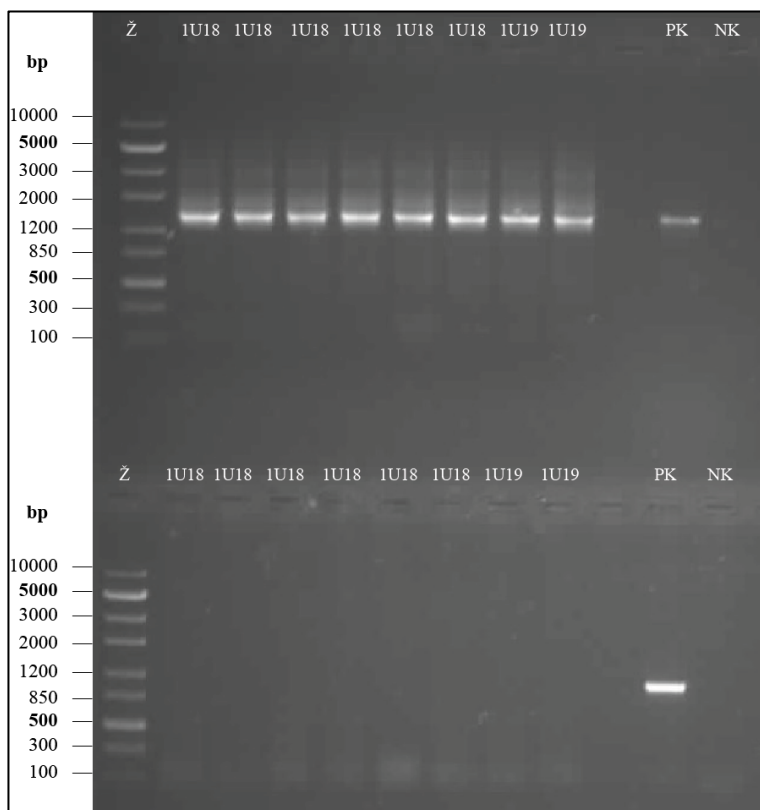
Správnost extrakce DNA byla ověřena provedením PCR ze všech extrahovaných vzorků za použití primerů kódujících gen 16S rRNA (27F a 1492R). Za pozitivní potvrzení přítomnosti bakteriální DNA byl při vizualizaci výsledků elektroforézy považován amplikon o velikosti 1465 bp – všechny výsledky byly pozitivní. Vzorky byly dále testovány na přítomnost bakterie *Paenibacillus larvae* pomocí specifických primerů AFBF a AFBR. Při vizualizaci byl za pozitivní považován amplikon o velikosti 1106 bp.

U všech experimentů qPCR vyhodnocených programem StepOne™ bylo zkontrolováno správné automatické umístění prahu (threshold), případné zobrazené chybové vlajky, správné umístění počátečního a konečného cyklu pozadí (baseline), přítomnost odlehlých vzorků a v případě nutnosti byly parametry ručně upraveny. Výsledné hodnoty standardních křivek byly pro efektivitu v doporučeném rozmezí 90-110 % (většinou okolo 100 %), sklon křivky v rozmezí -3,2 až -3,35 (s jednou výjimkou -3,5), korelační koeficient R^2 byl vždy vyšší než 0,99 (s mediánem 0,997). Automaticky nastavený práh se v jednotlivých qPCR experimentech pohyboval v podobné hladině a při kontrole prahových, resp. kvantifikačních cyklů (C_q) standardů bylo zjištěno, že všechny qPCR experimenty mají u standardů vždy stejný C_q ($\pm 0,5$ cyklu případně ± 1 cyklus). Porovnávány jsou také teploty tání (T_m). Výsledky pro pozitivní kontroly vykazovaly v porovnání se standardy, u nichž známe počáteční koncentraci DNA, vyšší obsah *P. larvae* – např. C_q mezi 15 až 18, v závislosti na konkrétním vzorku PK. Negativní kontroly pak nevykazovaly žádnou amplifikaci (s výjimkou jednoho opakování, C_q 36, T_m 79 °C – duplicitní NK byla bez amplifikace).

3.1. Úspěšnost přemetení na mezistěny

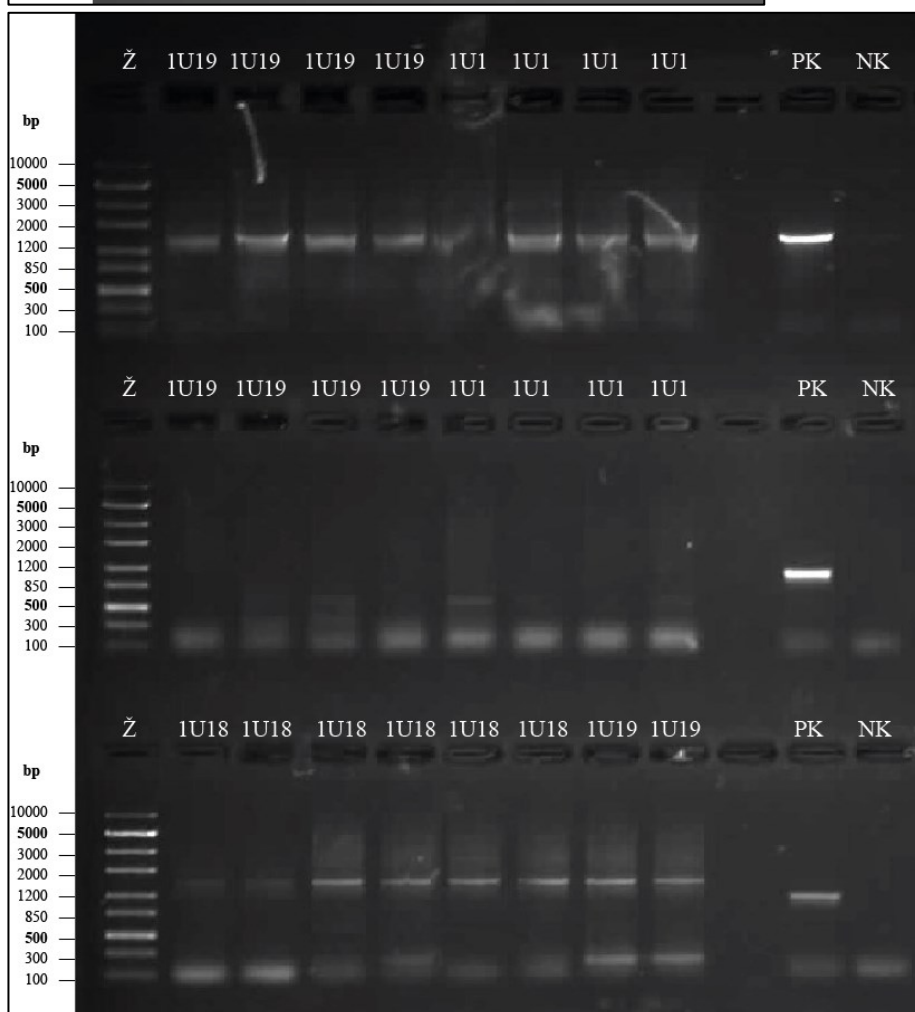
3.1.1. Polymerázová řetězová reakce

Vizualizace gelů z elektroforézy a výsledky PCR se specifickými primery pro *P. larvae* (AFBF a AFBR, viz podkapitola 2.4.1.) pro lokalitu Úhonice byly ve většině případů negativní, tedy neukazovaly přítomnost *P. larvae*. U části vzorků byla provedena nested PCR, kde u všech výsledků byl viditelný amplikon, ale o jiné velikosti než hledaných 1106 bp. Zobrazená velikost se pohybovala okolo 1465 bp, což by odpovídalo zobrazení bakteriálního amplikonu, který byl hledán v původním PCR (viz obr. 10.-13.). Takové výsledky byly tedy považovány za negativní.

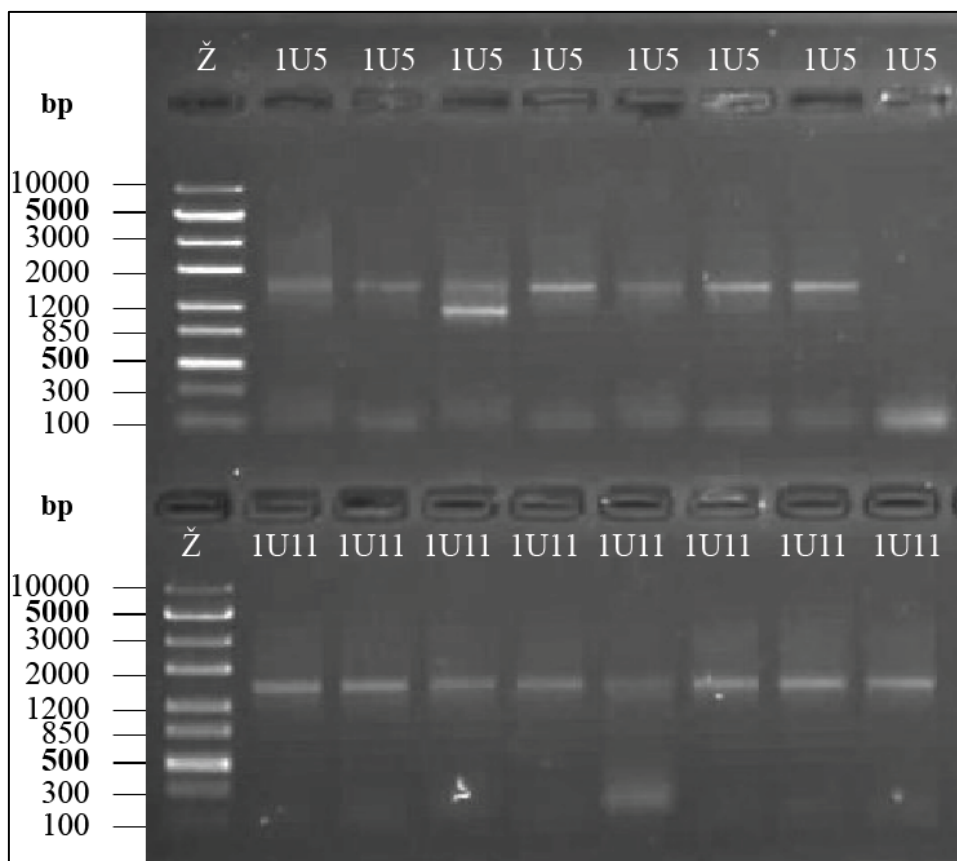


Obr. 10.: **Výsledky PCR.** Takto vypadaly téměř všechny provedené PCR – horní řada vzorků s primery 27F a 1492R s pozitivními výsledky, spodní řada vzorků se specifickými primery AFBF a AFBR s negativními výsledky a pouze pozitivní PK.

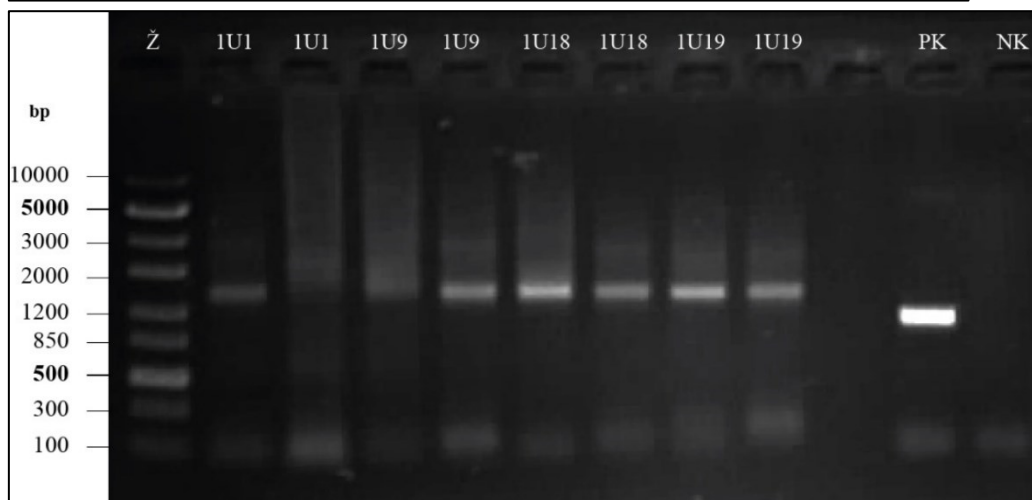
Obrázky č 10. až 13. byly upraveny v programu Adobe Illustrator.



Obr. 11.: **Výsledky PCR.** Horní řada vzorků s primery 27F a 1492R pozitivní (vzorek z 5. jamky „vytekl“ a není tedy čitelný). Prostřední řada vzorků s primery AFBF a AFBR, pozitivní pouze PK. Spodní řada vzorků je vizualizace nested PCR (primery AFBF a AFBR) ze vzorků, které můžeme vidět na obrázku 10. (primery 27F a 1492R). Při porovnání proužků PK s ostatními pozorujeme rozdíl.



Obr. 12.: Výsledek nested PCR (s primery AFBF a AFBR). Zobrazené amplikony se nenachází v úrovni 1106 bp, ale spíše odpovídají opět hodnotě 1465 bp. V horní řadě u vzorku s dvojitým proužkem odpovídá spodní proužek očekávané velikosti 1106 bp. PK zde chybí.

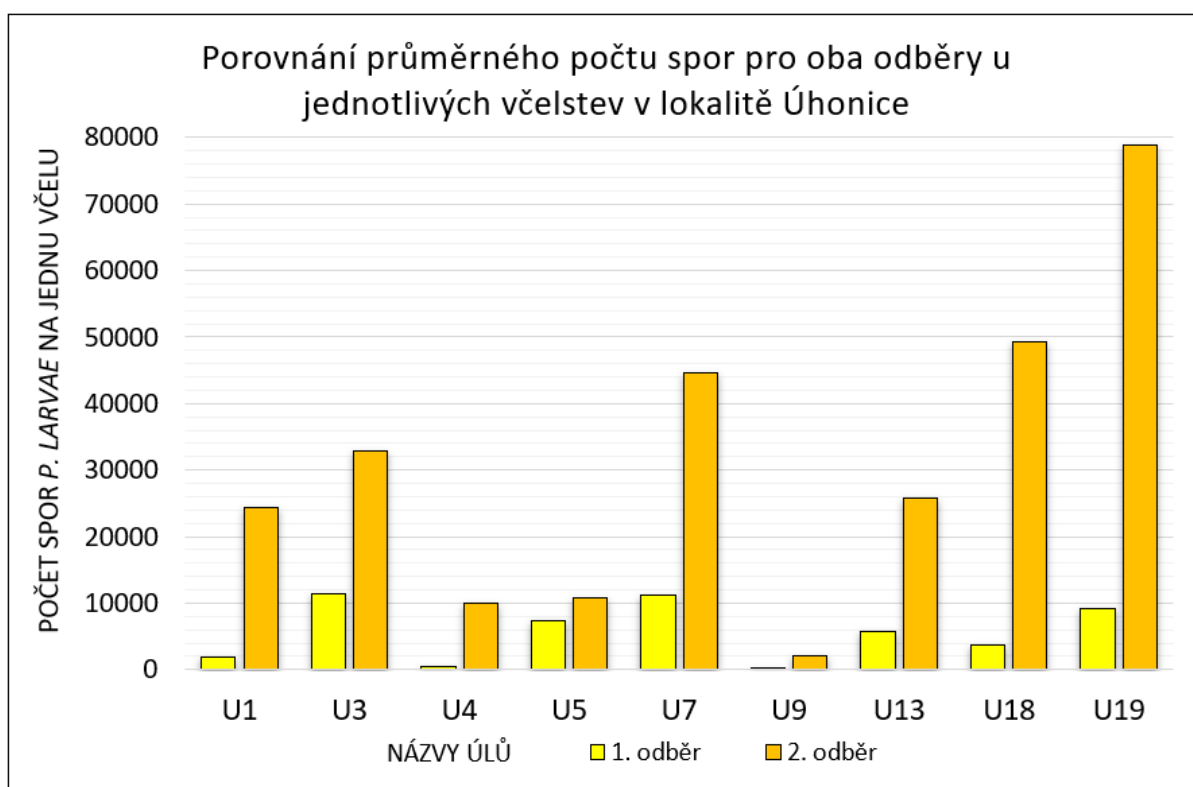


Obr. 13.: Výsledek nested PCR (s primery AFBF a AFBR). Zobrazené amplikony se liší při porovnání s PK a nenachází se v úrovni 1106 bp, ale spíše odpovídají opět hodnotě 1465 bp.

3.1.2. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Vzorky testovaných včel vykazovaly v porovnání se standardy obecně nižší koncentrace *P. larvae* – z 1. odběru bylo Cq jednotlivých vzorků mezi 22-31, kdy nejvíce vzorků mělo Cq 24 a z 2. odběru pak bylo Cq mezi 21 až 30, kdy nejvíce vzorků mělo Cq 22 (pro výsledky průměrných hodnot Cq vzorků viz tabulka 5). Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.4.6.3., čím nižší je Cq, tím větší je obsah hledané DNA ve vzorku.

V podkapitole 1.4.6.3. bylo také vysvětleno, jak byla díky standardní křivce získána pro každý vzorek hodnota absolutní množství cílové sekvence ve vzorcích (quantity) a v podkapitole 2.5.5., jak byla tato hodnota přepočítána na počet kopií *P. larvae* v původním vzorku před amplifikací na jednu včelu. Při porovnání obou odběrů (viz graf 1.) byl viditelný vyšší počet amplifikovaných kopií při druhém odběru, což nepotvrzuje teorii přemetení (viz podkapitola 1.4.8.1.).



Graf 1.: **Porovnání průměrné hodnoty počtu spor *P. larvae* na jednu včelu u konkrétních vzorků před přemetěním (žluté sloupce) a po přemetěním (oranžové sloupce) u jednotlivých včelstev z lokality Úhonice.** Vytvořeno v programu Microsoft Excel.

Při kontrole křivek tání a porovnávání bodů tání (T_m) bylo zjištěno, že T_m pro standardy a pozitivní kontroly v obou odběrech se pohybuje v rozmezí 87 až 87,5 °C. Testované vzorky měly T_m v rozmezí 84 až 86,5 °C a nejvíce vzorků pak T_m okolo 85 °C (viz graf 2., str. 35).

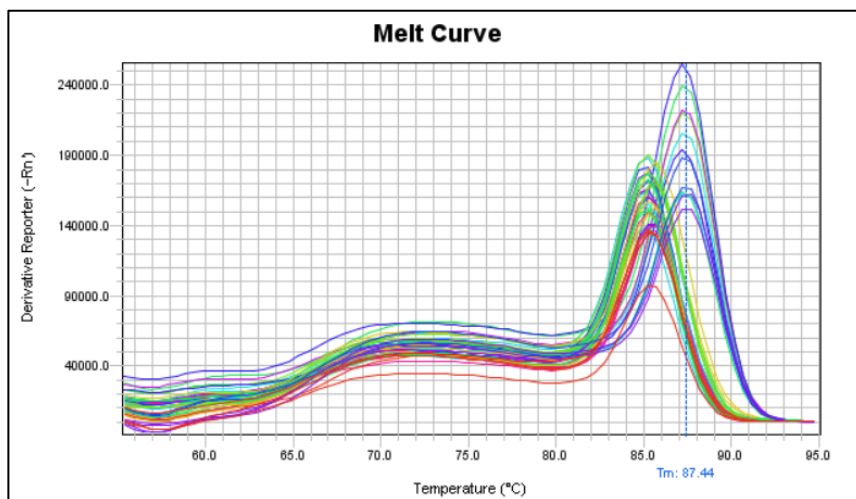
Při kontrole naamplifikovaných qPCR produktů pomocí gelové elektroforézy bylo zjištěno, že amplikony emitují signál o jiné velikosti bp než PK a vzorky z lokalit s nálezem klinických příznaků MVP (viz obr. 16., str. 40)

Data z lokality Úhonice měla normální rozdělení (Shapiro-Wilkova test normality – 1. odběr p-hodnota = 0.3665 a 2. odběr p-hodnota = 0.5529). Předpokladem testované (nulové) hypotézy bylo normální rozdělení testovaných dat, hypotézu mohla či nemusela být

zamítnuta, a to na základě výsledné p-hodnoty (ta odpovídá stupni důvěry v platnost této nulové hypotézy). Hypotézu je zamítána většinou na 5% hladině, tedy pokud je p-hodnota nižší než 5 % (resp. 0,05). Zde vyšlo 36 % a 55 %, v tomto případě tedy zamítnuta nebyla. To nám říká, že výsledné průměrné počty spor např. neobsahují velké extrémní hodnoty, což je patrné z grafu 1. Výsledky 1. a 2. odběru nebyly stejné, navzájem se lišily (párový t-test, p-hodnota = 0.008176). Nulovou hypotézou bylo, že rozdíl průměrů byly nulové, tedy že výběry byly stejné, ale na základě p-hodnoty nižší než 0,05 byla zamítnuta. Z grafu 1. také vyplývá, že 2. odběr měl u všech vzorků vyšší průměrné počty spor.

Vzorek	Cq	Tm	Spor/včela	Vzorek	Cq	Tm	Spor/včela
1U1	26,54	85,3	1913	L1	22,83	86,2	22884
1U3	22,97	85,02	11417	L3	25,45	84,7	3481
1U4	28,49	85,5	432	L4	23,3	84,7	16423
1U5	23,65	85,51	7442	L5	25,97	85,09	3007
1U7	22,78	85,18	11290	L6	29,56	85,7	180
1U9	29,75	84,26	132	L7	24,18	84,85	10178
1U13	23,85	85,01	5691	L8	23,8	84,7	11406
1U18	25,1	85,12	3707	L9	24,26	84,59	11875
1U19	23,55	85,07	9098	L10	21,04	86,95	82947
2U1	23,93	86,03	24388	L12	25,5	85,22	4022
2U3	22,49	85,07	32974	L13	24,24	84,96	8288
2U4	24,45	85,32	10005	L14	28,03	86,2	549
2U5	24,86	85,43	10755	L15	17,72	87,19	906158
2U7	21,88	84,98	44706	L17	26,07	86,2	2229
2U9	28,09	85,87	2089	L18	24,56	84,66	8562
2U13	23,12	85,53	25816	L20	25,34	84,32	3790
2U18	22,23	85,2	49324	L21	23,57	84,82	13317
2U19	21,6	85,23	78912	L22	16,46	87,02	3721155
UT4	15,66	87,15	5633790	Z1	16,2	86,87	6256936
UT15	22,25	86,9	307495	Z2	17,58	86,25	2899625
UT8	26,2	85,89	6769	Z4	21,72	85,45	64292
UT11	22,43	85,2	40538				

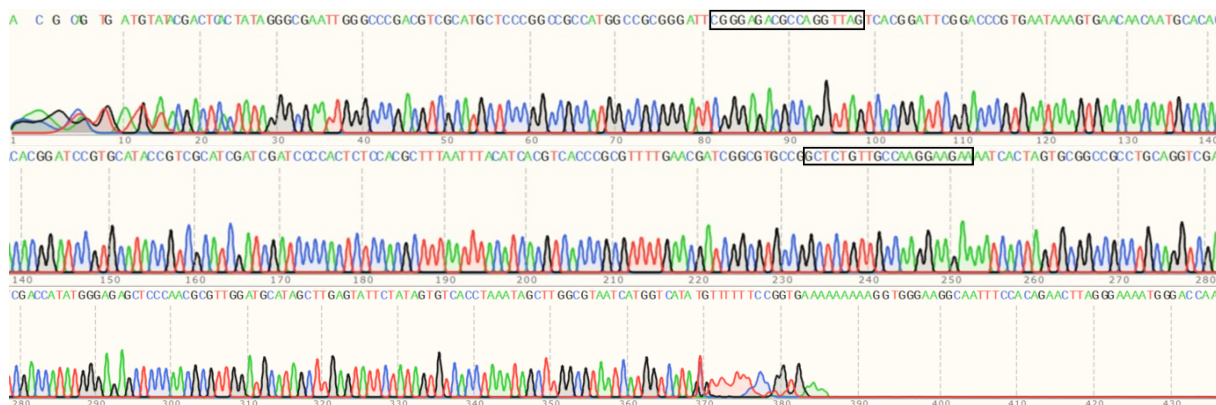
Tab. 5.: **Přehled průměrných hodnot z qPCR experimentů** pro jednotlivé vzorky (Cq – kvantifikační/prahový cyklus, Tm – teplota tání) a přepočtené zaokrouhlené hodnoty množství (quantity) na počet spor na jednu včelu (výpočet viz 2.5.5.).



Graf 2.: Porovnání teploty tání (T_m) standardů, PK a vzorku L22 (vrcholy vpravo s nejvyšší T_m 87,44 °C) se vzorky z lokality Úhonice (1U1, 1U4, 1U18, 1U19), vrcholy vlevo, které mají průměrnou T_m okolo 85 °C. Zdroj: StepOne™ Software.

3.1.3. Sekvenování

Z těchto vzorků byly osekvenovány vzorky 1U9 a 2U9. Při vyhledávání získaných a zpracovaných 12 sekvencí ve Standard Nucleotide BLAST s vybraným programem megablast pro najetí vysoce podobných sekvencí, program nevyhledal shodu. Při využití programu blastn pro najetí méně podobné sekvence, byly najity shody se zástupcem askomycet *Colletotrichum fruticola* (MT067626.1 – 33% shoda sekvence a 81% identifikace), dále s bakterií *Salmonella enterica* (např. CP053409.1 – 81% shoda sekvence a 87% identifikace), s mravencem *Odontomachus brunneus* (XM_032809668.1 – 30% shoda sekvence a 80% identifikace) a pro *Escherichia coli* (např. CP057849.1 – 91% shoda sekvence a 100% identifikace). Pro identifikaci jsou tyto výsledky nedostatečné, ale je zřejmé, že *P. larvae* v těchto vzorcích naamplifikovaný nebyl.



Obr. 14.: Podoba sekvence, pro kterou byla nalezena shoda v programu blastn s výsledkem – zástupce askomycet *Colletotrichum fruticola* (MT067626.1 – 33% shoda sekvence a 81% identifikace). Vyznačené úseky jsou primery s naamplifikovaným produktem mezi nimi. Vizualizace sekvence byla provedena v programu SnapGene. Čísla označují počet bází.

3.1.4. Kultivační vyšetření

Výsledky z kultivačního vyšetření ze včel ve VÚVč byly v 1. odběru 0 narostlých kolonií na vzorek (30 včel), s výjimkou vzorku 1U1 s nálezem 10^1 CFU (jednotka Colony-forming units, viz podkapitola 1.4.6.1.). V 2. odběru byly nálezy nulové, s výjimkou vzorku 2U7 s nálezem 10^1 CFU. Dle tabulky 1. v podkapitole 1.4.6.1. obsahovaly včely 0-99 spor, jelikož za detekční limit se považuje 100 spor, většina vzorků však vůbec nemusela obsahovat *P. larvae*.

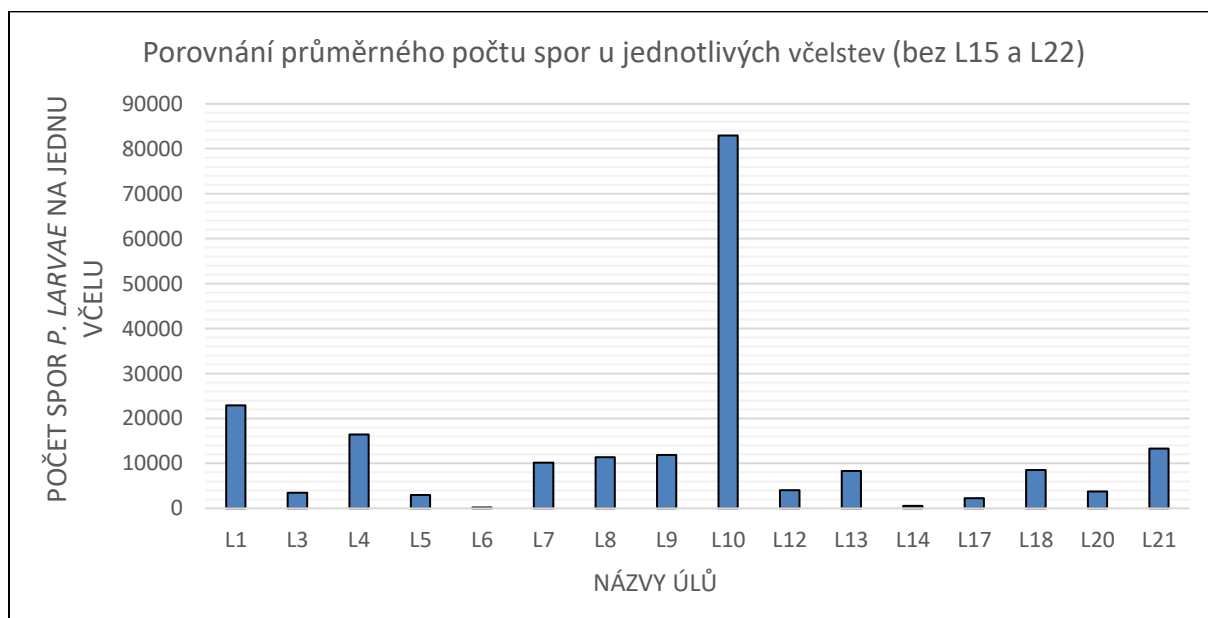
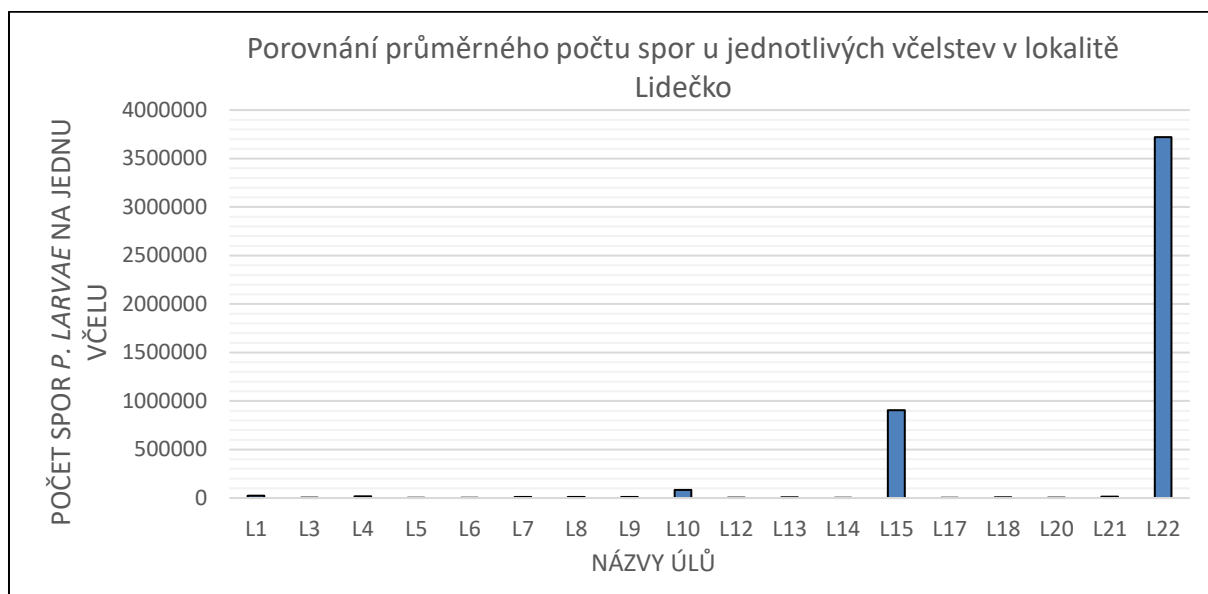
Vzorek	Spor/30včel	Vzorek	Spor/30včel	Vzorek	Spor/30včel
1U1	0, 10	L1	100, 3, 3	UT4	10 000, 3800
1U3	0	L3	0, 6, 6, 6	UT15	3 x 10 000
1U4	0	L4	10 000, 16, 56	UT8	0, 0
1U5	0	L5	53, 0, 3	UT11	13, 6
1U7	0, 0	L6	0, 0, 0, 6	Z1	10 000, 1020
1U9	0	L7	0, 0, 26, 23	Z2	10 000, 46
1U13	0	L8	3, 0, 3	Z4	3, 3, 33
1U18	0, 0	L9	3400, 26, 36		
1U19	0, 0	L10	600, 350, 920		
2U1	0, 0, 0	L12	13, 0, 10, 3		
2U3	0, 0	L13	33, 16, 40, 3		
2U4	0, 0, 0	L14	30, 233, 43, 56		
2U5	0, 0	L15	4070, 10 000, 10 000		
2U7	0, 0, 3	L17	70, 13, 83		
2U9	0, 0	L18	2400, 10 000, 10 000		
2U13	0, 0, 0	L20	6, 13, 3		
2U18	0, 0	L21	0, 0, 0, 1		
2U19	0, 0, 0	L22	4 x 10 000		

Tab. 6.: Výsledky kultivačního vyšetření z VÚVč. Každé číslo odpovídá výslednému počtu spor, resp. počtu narostlých kolonií, nalezenému na vzorek 30 včel. U většiny vzorků jsou výsledky v opakováních. Výsledky s vyšším počtem spor jsou zaokrouhleny (např. 10^4 CFU). Výsledky mají sloužit k obecnému porovnání, nikoli konkrétnímu. Popis kultivační metody v podkapitole 1.4.6.1.

3.1.5. Porovnání se vzorky z lokality Lidečko

U vzorků včel z lokality Lidečko byla při vizualizaci PCR se specifickými primery potvrzena přítomnost *P. larvae* u vzorku L22, ostatní byly negativní. Při qPCR měly vzorky L22 (Cq 16), L15 (Cq 18) a L10 (Cq 21) Tm 87 °C. Tm zbývajících vzorků bylo v rozmezí 83,7 až 86,5 °C, kdy nejvíce vzorků mělo Tm okolo 85 °C. Cq zbývajících vzorků bylo v rozmezí 23

až 30, kdy nejvíce vzorků mělo Cq 25. Při kontrole vybraných naamplifikovaných produktů pomocí gelové elektroforézy bylo zjištěno, že amplikony emitují signál o jiné velikosti bp než PK a vzorky z lokalit s nálezem klinických příznaků MVP (viz obr. 16., str. 40). Porovnání průměrného počtu spor na jednu včelu bylo zaneseno do grafů 3. a 4. Data neměla normální rozdělení (Shapirův-Wilkův test normality, p-hodnota = 4.513e-08, tedy nižší než 0,05 – nulová hypotéza normálního rozdělení byla zamítnuta). Oproti výsledkům z lokality Úhonic (str. 33) to znamenalo, že výsledné průměrné počty spor byly rozdílné, např. obsahovaly extrémní hodnoty. Jak je patrné z grafů 3 a 4, byly to vzorky L10, L15 a L22.



Graf 3. a 4.: **Porovnání průměrné hodnoty počtu spor *P. larvae* na jednu včelu u konkrétních vzorků z lokality Lidečko.** Výpočet vysvětlen v podkapitole 2.5.5. Ve spodním grafu jsou odstraněny vzorky L15 a L22 pro lepší porovnání zbývajících vzorků (zároveň je možné ho porovnat s grafem 1.)

Osekvenován byl směsný vzorek složený ze vzorků L7, L8, L12, L13, L14 a L15. Při vyhledávání ve Standard Nucleotide BLAST s vybraným programem megablast pro najetí vysoce podobných sekvencí, program vyhledal shodu u 4 sekvencí s bakterií *Paenibacillus larvae* (CP019717.1 a další viz obr 14. – 100% shoda sekvence a 100% identifikace). U 6 sekvencí nebyla nalezena shoda při použití programu megablast, ale výsledky nalezené za využití programu blastn pro najetí méně podobné sekvence, ukazovaly opět shodu s *Colletotrichum fructicola* (MT067626.1 – 33% shoda sekvence a 81% identifikace). Sekvence *P. larvae* zde byla přítomna pravděpodobně ze vzorku L15.

Dle kultivačního vyšetření z VÚVč bylo 10 včelstev s nálezem v úrovni 10^1 CFU, 2 včelstva s nálezem v úrovni 10^2 CFU, jedno s nálezem v úrovni 10^3 CFU a 4 včelstva s nálezy 10^4 CFU (viz tabulka 6., str. 36). Včelstva tedy vykazovala přítomnost *P. larvae*.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_V chromosome, complete genome	628	5004	100%	4e-176	100.00%	CP019717.1
Paenibacillus larvae subsp. larvae strain BMR-43-81 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MK618560.1
Paenibacillus larvae strain KBD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MH000690.1
Paenibacillus larvae strain KBB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MH000689.1
Paenibacillus larvae strain KB79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MH000688.1
Paenibacillus larvae strain KB12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MH000687.1
Paenibacillus larvae strain KB11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MH000686.1
Paenibacillus larvae strain KB10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MH000685.1
Paenibacillus larvae strain TEM35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	KY807656.1
Paenibacillus larvae subsp. larvae DSM 25430 chromosome, complete genome	628	5004	100%	4e-176	100.00%	CP019652.1
Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_IV chromosome, complete genome	628	5009	100%	4e-176	100.00%	CP019659.1
Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_III chromosome, complete genome	628	5009	100%	4e-176	100.00%	CP019655.1
Paenibacillus larvae subsp. larvae strain ERIC_I chromosome, complete genome	628	5015	100%	4e-176	100.00%	CP019651.1
Paenibacillus larvae strain SAN 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MG650056.1
Paenibacillus larvae strain Sp28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MG650047.1
Paenibacillus larvae strain Sp19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	MG650037.1
Paenibacillus larvae subsp. pulvificiens strain SAG 10367, complete genome	628	4993	100%	4e-176	100.00%	CP020557.1
Paenibacillus larvae subsp. pulvificiens strain CCM 38, complete genome	628	5009	100%	4e-176	100.00%	CP020327.1
Paenibacillus larvae subsp. pulvificiens strain ATCC 13537, complete genome	628	5009	100%	4e-176	100.00%	CP019794.1
Paenibacillus larvae subsp. larvae strain ATCC 9545 chromosome, complete genome	628	5009	100%	4e-176	100.00%	CP019687.1
Paenibacillus larvae strain PL96 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	KU682835.1
Paenibacillus larvae strain PL91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	4e-176	100.00%	KU682832.1

Obr. 15.: Výstup shodných organismů se sekvencí nalezenou ve směsném vzorku z lokality Lidečko a ze vzorků Z1 z Lokality Zdeslavice. Zdroj: NCBI BLAST [online].

3.2. Porovnání vzorků včel s klinickými příznaky a bez nich odebraných z jednoho stanoviště

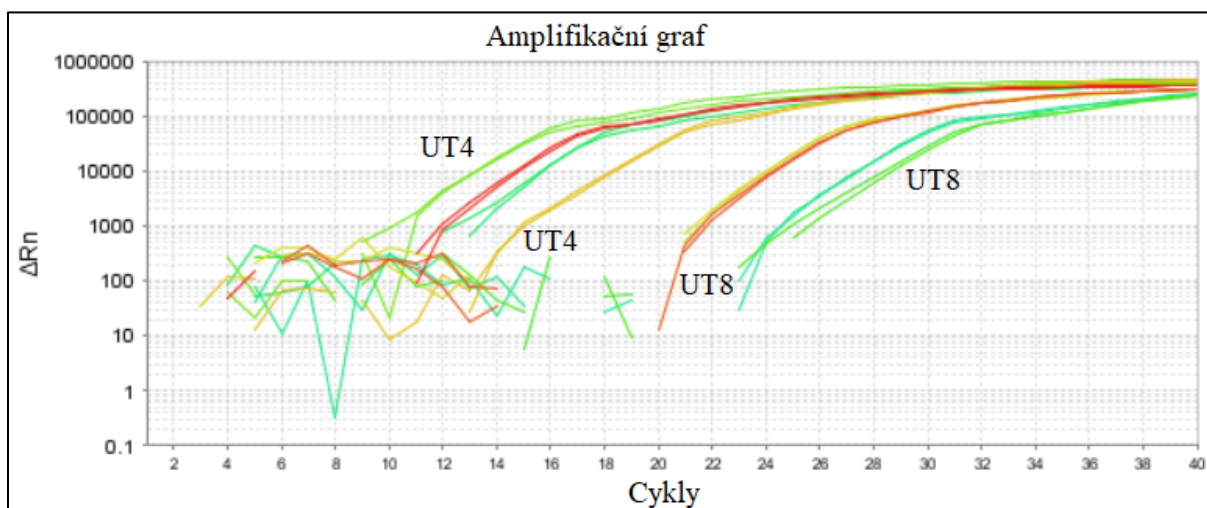
Vzorky z Útěšenovic a Zdeslavice byly vybrány za účelem porovnání jednoho stanoviště a dvou opačných záchytů přítomnosti *P. larvae*.

3.2.1. Polymerázová řetězová reakce

Vizualizace gelové elektroforézy a výsledky PCR se specifickými primery pro *P. larvae* (AFBF a AFBR, viz podkapitola 2.4.1.) vycházely ve vzorcích UT4, UT15, Z1 a Z2 pozitivně, tedy pro specifické primery při vizualizaci ukazovaly přítomnost *P. larvae*. U některých opakování byly výsledky na přítomnost *P. larvae* negativní, u těchto vzorků byla provedena nested PCR a její výsledky vycházely pozitivní. Naopak u vzorků UT8, UT11 a Z4 vycházely výsledky vždy negativní, tedy neukazovaly přítomnost *P. larvae*.

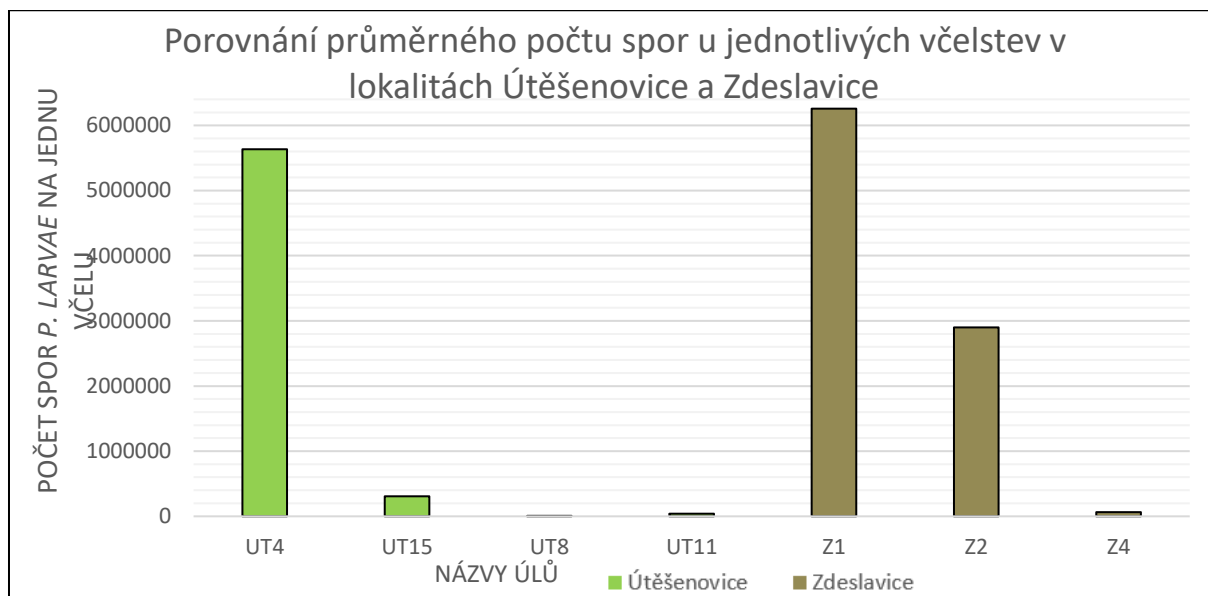
3.2.2. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Pozitivní nález *P. larvae* v lokalitě Útěšenovice měly vzorky UT4 (Cq v rozmezí 14-19 a Tm 87 °C) a U15 (Cq v rozmezí 17-27 a Tm v průměru 87 °C). Negativní nález *P. larvae* v lokalitě Útěšenovice měly vzorky U8 (Cq v rozmezí 24-29 a Tm v průměru 86 °C) a U11 (Cq 22 a Tm 85 °C). Viz graf 5. Pozitivní nález *P. larvae* v lokalitě Zdeslavice měly vzorky Z1 (Cq v rozmezí 13-19 a Tm v průměru 87 °C) a Z2 (Cq v rozmezí 14-19 a Tm v průměru 86,5 °C). Negativní nález *P. larvae* v lokalitě Zdeslavice měl vzorek Z4 s Cq v hodnotě 22 a Tm v průměru 85,5 °C. Porovnání průměrného počtu spor na jednu včelu zobrazuje graf 6. Data pro lokalitu Útěšenovice neměla normální rozdělení (Shapirův-Wilkův test normality, p-hodnota = 0.004759). To bylo dáno porovnáváním extrémních hodnot, viz graf 6. U dat z lokality Zdeslavice bylo výsledkem normální rozdělení dat (p-hodnota = 0.9071), což bylo navzdory porovnávání extrémních hodnot dáno rovnoměrnými rozestupy a také malým počtem porovnávaných hodnot, viz graf 6.

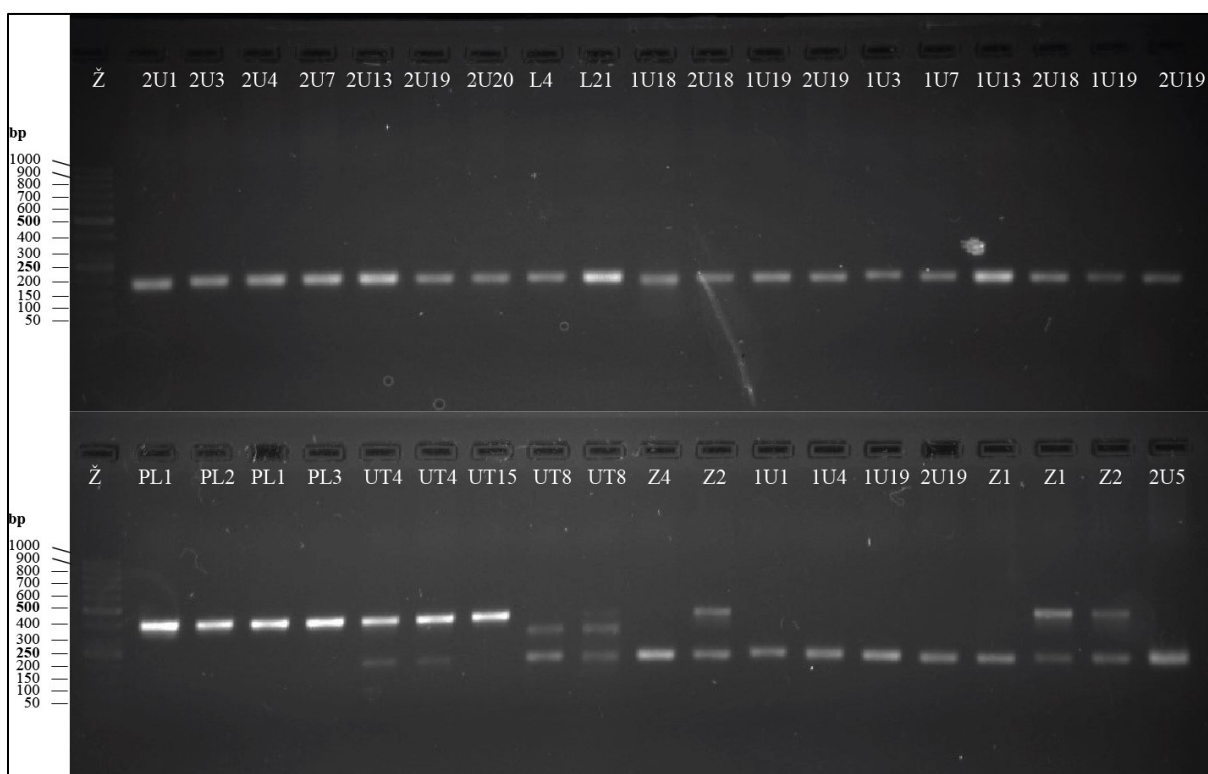


Graf 5.: Porovnání výsledků amplifikačního grafu pro silně nakažené včelstvo (4 páry amp. křivek vlevo pro vzorky UT4) a slabě nakažené včelstvo (4 páry amp. křivek vpravo pro vzorky UT8). Osa X zobrazuje počet cyklů qPCR experimentu, osa Y zobrazuje velikost normalizovaného fluorescenčního

signálu generovaného reportérovým barvivem (SYBR Green) v každém cyklu. Vypočteno StepOne™ Softwarem dle $\Delta R_n(\text{cyklu}) = R_n(\text{cyklu}) - \text{pozadí (baseline)}$. Upraveno.



Graf 6.: Porovnání průměrné hodnoty počtu spor *P. larvae* na jednu včelu u konkrétních vzorků z lokalit Útěšenovice a Zdeslavice. Vzorky UT4, UT15, Z1 a Z2 reprezentují nejvíce nakažená včelstva na lokalitách a vzorky UT8, UT11 a Z4 reprezentují nejméně nakažená včelstva na lokalitách. S výjimkou vzorku UT15 jsou rozdíly zcela jasné. Výpočet vysvětlen v podkapitole 2.5.5.



Obr. 16.: Produkty qPCR na agarózovém gelu (2% gel, 50 bp DNA Ladder), vzorky: 1U a 2U – Úhonice (1. a 2. odběr), L – Lidečko, UT – Útěšenovice, Z – Zdeslavice. PL – pozitivní kontroly a Ž – žebřík. Na levé straně popis žebříku v bp (base pair). Upraveno v programu Adobe Illustrator.

Při kontrole vybraných naamplifikovaných produktů pomocí gelové elektroforézy bylo zjištěno, že amplikony U4, U15, Z1 a Z2 (velmi slabý signál byl zachycen i u vzorku UT8) emitují signál o velikosti 380 bp, což bylo považováno za důkaz pozitivního záchytu *P. larvae*, ale zároveň byly u většiny vzorků pozorovány i druhé slabší signály okolo 200 bp, které byly také u všech ostatních vzorků (viz obr. 16., str. 40).

3.2.3. Sekvenování

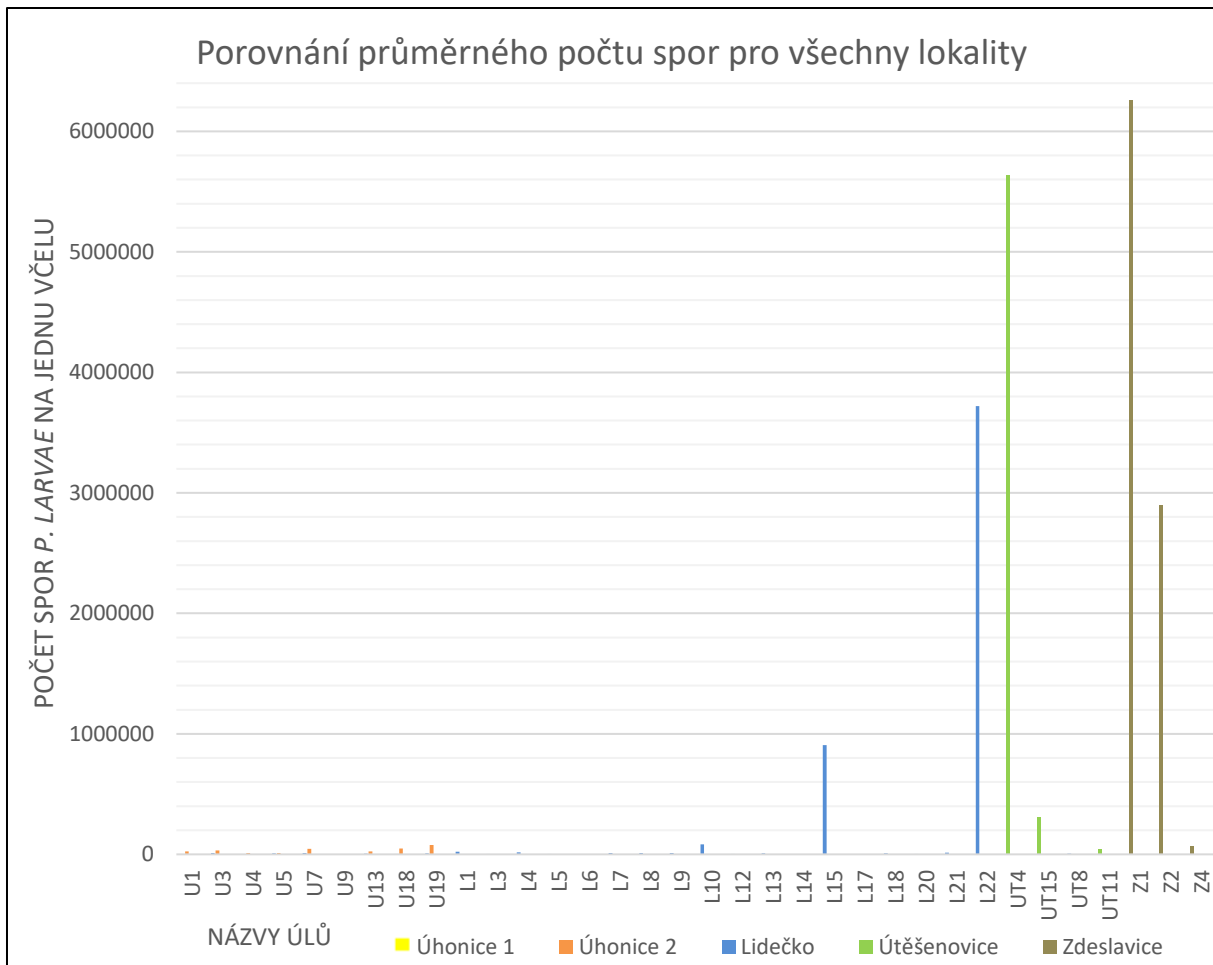
Osekvenován byl směsný vzorek složený z opakování vzorku Z1. Při vyhledávání ve Standard Nucleotide BLAST s vybraným programem megablast pro najetí vysoce podobných sekvencí, program vyhledal shodu u všech 6 sekvencí s bakterií *Paenibacillus larvae* (CP019717.1 a další viz obr 14. – 100% shoda sekvence a 100% identifikace). Také byl osekvenován směsný vzorek složený z opakování vzorku UT8, kde byla v megablastu (navzdory nulovému nálezu v kultivačním vyšetření a nejvyšší T_m vzorku 86,45 °C) nalezena shoda pro 1 sekvenci s bakterií *Paenibacillus larvae* (CP019717.1 a další viz obr 14. – 100% shoda sekvence a 100% identifikace) a v ostatních 6 sekvencích byla nalezena částečná shoda při použití programu blastn s *Colletotrichum fructicola* (MT067626.1 – 33% shoda sekvence a 81% identifikace), pro *Escherichia coli* (např. CP057849.1 – 91% shoda sekvence a 100% identifikace) a pro rod *Bifidobacterium* (např. *B. bifidum* CP002220.1 – 54% shoda sekvence a 82,5% identifikace).

3.2.4. Kultivační vyšetření

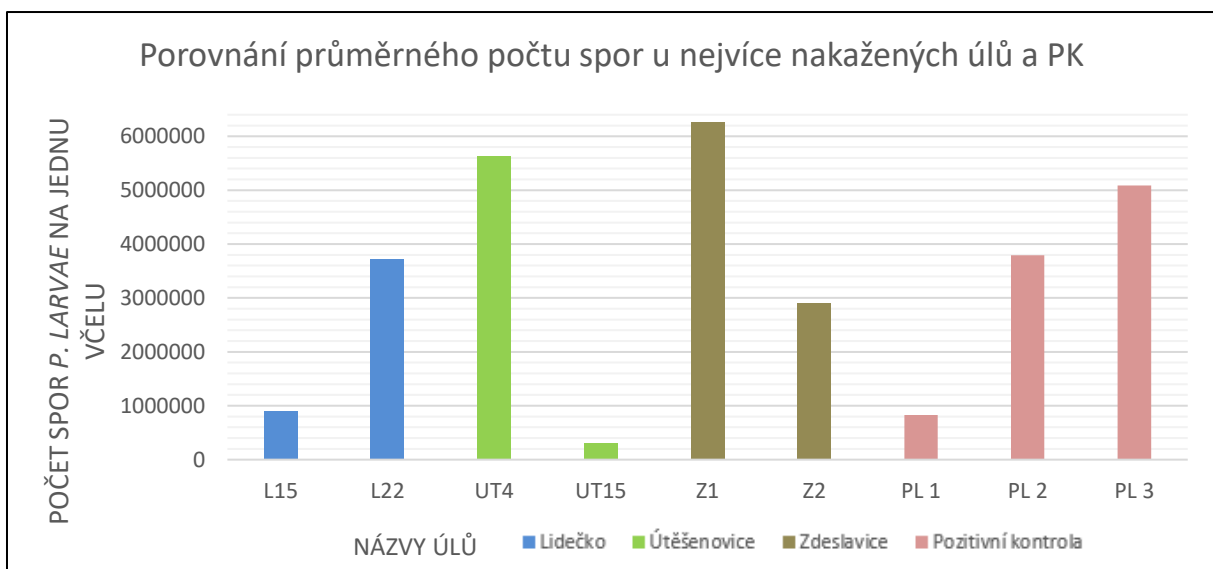
Z lokality Útěšenovice byly vzorky U8 s nulovým záchytem, vzorky U11 se záchytem 10^1 CFU a vzorky U4 a U15 se záchytem 10^4 CFU. Z lokality Zdeslavice byly vzorky Z4 se záchytem 10^1 CFU a vzorky Z1 a Z2 se záchytem 10^4 CFU (viz tabulka 6., str. 36).

3.2.5. Porovnání vzorků ze všech lokalit

Při porovnání průměrného počtu spor *P. larvae* na jednu včelu u všech včelstev na všech sledovaných lokalitách bylo zjištěno, že vypočtené hodnoty pro lokalitu Úhonice a pro lokalitu Lidečko (s výjimkou vzorků L15 a L22) byly v porovnání s včelstvy s výskytem klinických příznaků moru včelího plodu v lokalitách Útěšenovice a Zdeslavice (UT4, Z1 a Z2) velmi nízké (viz graf 7.). Výsledný počet spor na jednu včelu byl vypočten pro zajímavost i pro PK – byly tak získány uměle vytvořené hodnoty, které lze porovnávat s ostatními vzorky (viz graf 8.). Na základě různých kolonií použitých při výrobě PK (viz podkapitola 2.4.4.), jsou patrně zvyšující se počty. Dohledání hodnot obsahu DNA ve vzorcích nebylo úspěšné.



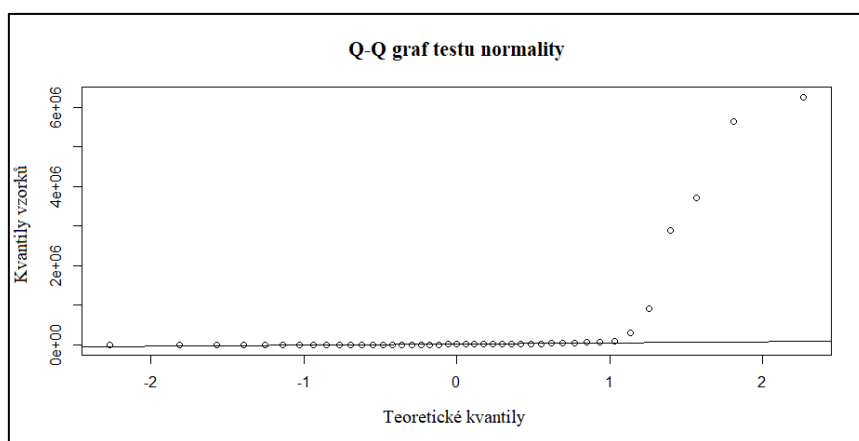
Graf 7.: **Porovnání průměrné hodnoty počtu spor *P. larvae* na jednu včelu u vzorků ze všech lokalit.** Výpočet vysvětlen v podkapitole 2.5.5.



Graf 8.: **Porovnání nejvyšších průměrných hodnot počtu spor *P. larvae* na jednu včelu ze všech lokalit s přidáním uměle vytvořených hodnot ze vzorků PK (z kvantitativní hodnoty PK pomocí stejného vzorečku jako u ostatních vzorků, výpočet vysvětlen v podkapitole 2.5.5).**

3.3. Limity a hranice detekce *P. larvae* pomocí qPCR

Na základě získaných dat nebylo vhodné určovat konkrétní hranici počtu spor na včelu, která by stanovila potřebnou míru nakažení včelstva pro úspěšnou detekci nebo hodnotu, která by prokazovala či vyvracela nákazu včelstva nebo přítomnost klinických příznaků ve včelstvu. Výsledky sekvenování prokázaly amplifikaci nespecifických produktů, takže výsledky by nebyly důvěryhodné (viz podkapitola 3.1.4.). Společná data ze všech stanovišť neměla normální rozdělení (Shapirův-Wilkův test normality, p -hodnota = $2.809e-12$). To bylo potvrzeno i grafem 9. a vyplývá to i z grafu 7. Důvodem bylo dostatečné množství dat, resp. chyběly vzorky „středně“ nakažených včel a další vzorky silně nakažených včel. Určení detekční hranice tedy nebylo možné ani proto, že nedošlo k pokrytí více různých úrovní nákazy.



Graf. 9.: Q-Q graf testující normalitu rozložení dat. Na ose X se nachází kvantily hypotetického normálního rozdělení a ose Y kvantily zkoumaného souboru. V případě normálního rozdělení leží body grafu na přímce či v jejím okolí, což zde neplatí.

4. Diskuze

Ozdravná metoda včel přemetení na mezistěny je funkční metodou, která se využívá v různých zemích světa (Hansen & Brødsgaard, 2003; Munawar et al., 2010; Pernal et al., 2008). V určitých případech je také zákonem nařízenou preventivní metodou při podezření z nákazy včelstev morem včelího plodu (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 11). Z jakého důvodu tedy tato ověřená metoda nefungovala v tomto případě?

Při pohledu na výsledky detekce z lokality Úhonice, tedy na téměř nulové záchyty spor při kultivačním vyšetření, na nepřítomnost amplikonů při PCR se specifickými primery, na negativní amplifikaci při nested PCR, na nízké hodnoty amplikovaného množství produktu a jeho přepočítání na počet spor na jednu včelu, který je následně také nízký, spolu s odlišnými teplotami tání (T_m) a konečným nálezem nespecifických produktů při sekvenaci, se nabízí úvaha, že včely byly téměř zdravé a qPCR primery nebyly dostatečně specifické pro takto malé množství templátové DNA, případně tam žádná DNA *P. larvae* být nemusela.

Jelikož je mor včelího plodu (MVP) považován za nebezpečnou nákazu s jasně stanovenými podmínkami, jak postupovat při detekování bakterie *P. larvae* ve včelstvu, není možné pracovat s nakaženými včelami bez dovolení. Proto je velmi těžké ovlivnit, kdy a které vzorky bude možné z kterého stanoviště odebrat. Každé odebrané vzorky mohou být odlišné také kvůli specifickým terénním podmínkám, péči včelaře atd.

Navíc přemetení na mezistěny jako ozdravná metoda při záchytu *P. larvae* v zimní měli, se provádí v případě, že ve včelstvech nebyly nalezeny klinické příznaky (pokud by byly, vyhláší se ohnisko a provádí další opatření, včetně přemetení, ale to není tento případ, detailněji viz podkapitola 1.4.5.). Dle zkušeností mají tyto včely 10^3 CFU nebo méně na příslušný vzorek (více viz podkapitola 1.4.6.1.), včely mohou tedy být často poměrně zdravé. Zajímavější výsledky by mohly být při zkoumání vzorků včelstev, u kterých bylo vyhlášeno ohnisko, některá včelstva spálena a u zbylých včelstev provedeno přemetení, které by mohlo mít větší efekt, jelikož i množství patogenu ve včelstvech může být vyšší.

Velkým nedostatkem této práce jsou chybějící kontrolní vzorky v podobě zdravých včel, které se nikdy neseťkaly s morem včelího plodu. Tato kontrola byla v designu diplomové práce zahrnuta, ale z materiálních i dalších důvodů nebyl odběr zdravých včel uskutečněn. Výsledky zdravých včelstev by bylo zajímavé porovnat hlavně se včelstvy z lokality Úhonice, kde většina včelstev mohla být také zdravá. Např. cílem certifikované metodiky (Hubert et al., 2016) bylo pomocí sekvenování nové generace diagnostikovat *P. larvae* na různých

stanovištích o různém stupni nákazy MVP. Zkoumán byl mikrobiom dělnic včely medonosné a v kontrolních včelstvech (mimo oblast výskytu MVP) byly nálezy *P. larvae* nulové. Předpokládejme tedy, že zdravé včely neobsahují ani jednu sporu *P. larvae*, výsledky qPCR takových včel by měly mít nulovou amplifikaci. Pokud by však výsledky vykazovaly amplifikaci, jako je tomu např. v lokalitě Úhonice, ukazovalo by to pravděpodobně na nedostatečnou specifitu použitých primerů. K ověření této hypotézy by bylo potřeba provést celý postup na zdravých včelách, což nebylo možné uskutečnit ani v současné době z materiálních a finančních důvodů.

Za alarmující mohly být považovány již výsledky nested PCR z lokality Úhonice, tyto naamplifikované vzorky se měly poslat na osekvenování, zda se v nich *P. larvae* nachází, a např. metodou nové generace sekvenování získat sekvence 16S rRNA bakteriálního společenství (Hubert et al., 2016). Další možností by bylo vyzkoušet jiné primery, nastavení či specifické fluorofory místo nespecifického SYBR Green. Tyto možnosti nebyly v původním designu zvažovány. Pokračovalo se v původním plánu detekovat bakterii ve vzorcích pomocí qPCR.

Pravděpodobnost, že specifita použitých primerů PL2-FW a PL2-Rev u vzorků, které obsahují nízké počáteční množství *P. larvae*, mohla být nedostatečná, se zvýšila na základě výsledků sekvenování. Ve vybraných osekvenovaných vzorcích byla odhalena amplifikace nespecifických produktů, resp. nepřítomnost požadovaného produktu. Tyto vzorky měly zároveň při qPCR nižší teplotu tání (T_m , a to průměrně 85 °C) než pozitivní kontroly (PK), standardy a vzorky s klinickým zachytem MVP (průměrně 87 °C). Teplota tání 87 °C souhlasí i s výsledky z jiných výzkumů (Kňazovická et al., 2011; Quintana et al., 2017). Pokud bychom srovnávali T_m pouze u čistých laboratorních vzorků (jakými jsou PK nebo standardy) a vzorků z terénu (např. včely), není vyloučeno, že T_m bude nějakým způsobem odlišná pro stejné produkty, rozdíl by mohl být do ± 1 °C. Zde jsou však i vzorky odebrané ze včel z terénu (lokality Útěšnovice a Zdeslavice), zpracované stejnými metodami a rozdíl v T_m oproti PK a standardům je minimální. Nalezený rozdíl v T_m 2-3 °C je již poměrně značný (Dorak & et al., 2006). Nicméně na základě odlišné T_m nemůžeme stoprocentně potvrdit amplifikaci jiného produktu. Aby bylo možné s jistotou říct, že ve většině vzorcích z lokality Úhonice se naamplifikoval jiný produkt než *P. larvae* nebo že v původních vzorcích se *P. larvae* nevyskytoval, bylo by potřeba osekvenovat více vzorků a nejlépe každý vzorek zvlášť, nikoli ve směsných vzorcích. Tato varianta však nebyla uskutečněna z finančních důvodů.

Přestože bylo osekvenováno pouze malé množství vzorků, když porovnáme i výsledky vizualizace gelové elektroforézy s qPCR výsledky (viz obr. 16., str. 40), pokryjeme větší část vzorků. Z lokality **Úhonice** byly osekvenovány vzorky 1U9 a 2U9 a výsledkem jsou nespecifické produkty (viz podkapitola 3.1.3.). Všechny ostatní vzorky (s výjimkou 1U5) jsou součástí gelu (viz obr. 16., str. 40) a ukazují signál okolo 200 bp, což neodpovídá *P. larvae*, tedy výsledkem budou také nespecifické produkty. V tom případě by nemělo význam data statisticky zpracovávat (a hlubší význam nepřináší ani výsledek provedeného párového t-testu). Závěrem by tedy mohlo být, že v těchto vzorcích se nevyskytoval *P. larvae*, případně ho tam bylo nepatrné množství. Tyto včely v současné době stále existují a každoročně mají nulové záchyty *P. larvae* v zimní měli. Z lokality **Lidečko** byly osekvenovány vzorky L7, L8, L12, L13, L14 a L15 ve smíšeném vzorku, kde předpokládám, že 4 sekvence odpovídající 100% *P. larvae* pochází primárně (pokud ne výhradně) ze vzorku L15, ostatních 6 nespecifických sekvencí bude pocházet ze zbývajících vzorků. Vzorky L4 a L21 byly vizualizovány na gelu (viz obr. 16., str. 40) a ukazují také signál okolo 200 bp, tedy výsledkem budou také nespecifické produkty. Vzorky L10, L15 a L22 pravděpodobně všechny obsahují *P. larvae* (záchyt při kultivačním vyšetření, pozitivní výskyt při PCR za použití specifických primerů AFBF a AFBR, při qPCR T_m okolo 87 °C a vyšší obsah produktu). Výskyt u zbylých vzorků L1, L3, L5, L6, L9, L17, L18 a L20 můžeme pouze odhadovat jako další nespecifické amplifikace, jelikož jejich T_m je nízká a kultivační vyšetření byla 10^1 CFU až nulová (s výjimkou vzorku L18 – ale jeho T_m byla pouze 84,7 °C a množství produktu malé). Závěrem by tedy mohlo být, že v těchto vzorcích se vyskytoval *P. larvae*, jeho záchyt byl potvrzen ve vzorcích ze 3 včelstev a je pravděpodobné, že to byla ta včelstva, u kterých byly na stanovišti nalezeny klinické příznaky a musela být spálena. V ostatních vzorcích se pravděpodobně vyskytoval v nízkém množství. Původní předpoklad byl, že tato včelstva budou plnit roli „středně“ nakažených včelstev. Bylo sice potvrzeno, že *P. larvae* se ve vzorcích oproti lokalitě Úhonice vyskytoval, nicméně pouze vzorek L15 měl tomu odpovídající vypočtený počet spor. V současné době již včely neexistují, mor včelího plodu u nich propukl znovu v roce 2016 a všechna včelstva byla spálena. Z lokality **Útěšnovice** byl osekvenován vzorek UT8, který měl reprezentovat nejméně nakažená včelstva na stanovišti. I přes nulové kultivační záchyty a nejvyšší naměřenou T_m 86,45 °C byla získána sekvence *P. larvae* (u dalších 6 sekvencí již shoda nebyla). Při pohledu na vizualizaci výsledků qPCR na gelu (viz obr. 16., str. 40), můžeme u vzorku UT8 vidět velmi slabý proužek nacházející se okolo 380 bp, tedy je o stejné velikosti jako *P. larvae*. Vzorek

UT15 zde má jako jediný jeden čistý proužek odpovídající *P. larvae*, vzorek UT4 má překvapivě k jasnému proužku odpovídajícímu *P. larvae* ještě slabší proužek o velikosti cca 200 bp. Vzorek UT11 zde není. Tyto vzorky jsou poměrně jasně čitelné, jelikož jde o záměrně vybrané extrémy jedné lokality. To stejné platí i pro lokalitu **Zdeslavice**. Osekvenován zde byl vzorek Z1 s jasným výsledkem všech sekvencí se 100% shodou s *P. larvae* a to navzdory tomu, že na vizualizaci výsledků qPCR na gelu (viz obr. 16., str. 40), vidíme 2 proužky (*P. larvae* a nespecifickou amplifikaci, T_m 86,7 °C) a v opakování dokonce pouze nespecifickou amplifikaci (T_m 86,44 °C). Tato dvě opakování nebyla vybrána do směsného vzorku, který byl osekvenován. K tomu bylo vybráno vzorků s T_m 87 °C. U tohoto včelstva a všech opakování/vzorků teploty tání poměrně dobře odpovídají získaným výsledkům. Vzorky Z2 a Z4 můžeme vidět na gelu (viz obr. 16., str. 40). Výsledné dopočítané nejvyšší hodnoty počtu spor *P. larvae* na jednu včelu u včelstev s klinickými příznaky, tedy vzorky UT4 a Z1, jsem konzultovala s odborníky ve VÚVč a bylo mi potvrzeno, že hodnoty 5,6 resp. 6,3 milionu spor na včelu ve včelstvu s klinickými příznaky odpovídají.

Stanovit detekční limit za současných podmínek nebylo možné, například kvůli nespecifickým amplifikacím, a nebylo by ho vhodné určovat ani v případě, pokud by ve většině vzorků byl naamplifikovaný *P. larvae*. Počet vzorků není dostatečný, resp. bylo by potřeba mít vzorky ukazující postupně výsledky dalších stádií různě nakažených včel morem včelího plodu. Bylo by vhodné mít data ze všech stanovišť s normálním rozdělením (tedy pokrytí nejlépe všechny úrovně nákazy), což tato data nesplňují.

Navzdory poměrně malému vzorku silně nakažených včel by však mohla být obecná hranice určitelná, tedy že pokud je včelstvo nakaženo a vyskytují se u něho klinické příznaky, qPCR jako detekční metoda v této podobě plní svou roli, což bylo potvrzeno vysokým zachytem *P. larvae* u vzorků L22, UT4, Z1 a Z2 a potvrzeno sekvencí vzorku Z1. Nicméně z praktického hlediska to příliš užitku nepřináší, jelikož v případě potvrzení klinických příznaků ve včelstvu je již množství *P. larvae* ve vzorku nedůležité, včelstvo bude spáleno. Metoda by tedy potřebovala další optimalizace, aby dokázala detekovat i spory *P. larvae* ve vzorcích s nižším počtem bakterie v původním vzorku. Na tyto optimalizace nejsou finanční ani materiální prostředky.

Tvůrci primerů PL2-Fw a PL2-Rev (Martínez et al., 2010) píší, že detekční limit je 10 spor ml^{-1} ve vzorku s vykultivovaným *P. larvae* či 2 spory g^{-1} v cíleně kontaminovaném medu. Detekci neprováděli na včelách, ani na vzorcích z terénu. Také používali SYBR Green. Odlišná jim ale vyšla T_m (89,7 °C). Při ověření specifičnosti primerů PL2-Fw a PL2-Rev

vložení konkrétních oligonukleotidů do NCBI databáze BLAST a vyhledáním v programu megablast, získáme nalezené výsledky pouze pro *P. larvae* se 100% shodou.

Forsgren a Laugen (2013) provedly výzkum s cílem porovnat, jak odpovídá detekce metodou kultivace a qPCR ze vzorků dospělých včel a zimní měli symptomům AFB ve včelstvu. Včely byly také odebrány v terénu z plodových plástů, pro qPCR byly použity stejné primery PL2-FW a PL2-Rev, jako reagens SYBR Green (resp. EvaGreen). Extrakce DNA včel byla provedena za použití extrakčních kitů. Tm produktu ani případný počet nespecifických amplifikací pro porovnání nejsou uvedeny. Z 58 včelstev byly při prohlídce nalezeny klinické příznaky u 11 včelstev. Pomocí qPCR bylo z těchto 11 včelstev identifikováno 8 včelstev jako pozitivních na přítomnost *P. larvae*. Z celkových 58 bylo 22 včelstev identifikováno jako pozitivních (pravděpodobně 22, toto jediné číslo není v práci zmíněno a bylo nutné je vyčíst z grafu). Oba nálezy jsou nejnižší ze všech porovnávaných kombinací metod a vzorků (např. kultivace ze vzorků včel zachytila 33 pozitivních včelstev, qPCR ze zimní měli pak 40 pozitivních včelstev) a qPCR ze vzorků včel je zde tedy nejméně efektivní metodou. Autorky zmiňují, že důvodem mohou být například PCR-inhibitory ve vzorcích dospělých včel, nepřesnosti při extrakci DNA a rozdílné výsledky na základě rozdílných způsobů extrakce DNA a s tím související možné potíže při extrakci DNA z velmi odolných spor. Zmiňují také, že dospělé včely obsahují pouze spory, se kterými se aktuálně setkaly, což je většinou menší počet v porovnání se zimní mělí, která se na dně úlu kumuluje celou zimu. Na druhou stranu díky tomu odráží vzorky včel lépe aktuální zdravotní stav včelstva.

Amplifikace nespecifických produktů může být obecně způsobena z různých důvodů. Ruiz-Villalba et al. (2017) zkoumali přesně toto a dospěli k názoru, že k nim dochází poměrně často, nezávisí na Cq nebo účinnosti reakce, ale jsou rozpoznatelné podle rozdílné teploty tání. Ovlivňuje je například i to, jak dlouho pipetujeme vzorky do destičky. Zjistili, že nespecifické amplifikace jsou ovlivněny množstvím netemplátové DNA ve vzorcích, čím více jí bylo, tím více se amplifikovalo artefaktů. DNA mých vzorků byla extrahována z celých včel a vzorky tedy obsahují zároveň kromě DNA *P. larvae* i tu včelí a genetickou informaci včelí střevní mikroflóry. Navíc ve vzorcích se *P. larvae* příliš nevyskytoval.

Využívat jako detekční materiál dospělé včely je jistě možné a v určitých případech výhodné, domnívám se však, že získání srovnatelných výsledků bude pracnější než u jiných matric, které je možné využít pro detekci *P. larvae*. Naopak pokud by se zaměřili na optimalizaci metody následné výsledky kvantifikace by byly důvěryhodné, bylo by možné z dospělých včel či včelích larev určit v preklinické fázi konkrétní včelstva s nejvyššími nálezy *P. larvae* a

včelaři například doporučit, aby tato včelstva přemetl. Výhodou je samozřejmě rychlost, se kterou je možné dát včelaři vědět – i s odběrem vzorků klidně již příští den. Čím delší doba uplyne mezi odběrem vzorků a získáním výsledků, tím více se za tu dobu mohla změnit nákazová situace a provedená opatření nemusí být dostatečně účinná.

5. Závěr

Cílem této práce bylo detekovat a kvantifikovat bakterii *Paenibacillus larvae* ve včelích dělnicích metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR). Detekovat a kvantifikovat *P. larvae* se podařilo ve vzorcích pocházejících z lokalit a ze včelstev, ve kterých byly nalezeny klinické příznaky moru včelího plodu, tedy včelstva byla silně nakažena (z lokalit Lidečko, Útěšenovice a Zdeslavice).

Výsledky porovnávaných sad vzorků odebraných v lokalitě Úhonice ze včelstev před provedením metody přemetení na mezistěny a po jejím provedení nebyly průkazné, jelikož byla odhalena amplifikace nespecifických produktů. Není vyloučeno, že získané vzorky včel neobsahovaly bakterii *P. larvae*, a tedy nebylo možné docílit úspěšné amplifikace. Nízký či nulový výskyt *P. larvae* ve vzorcích a vysoký obsah ostatní netemplátové DNA mohl způsobit nedostatečnou specifitu primerů. Pro jasné výsledky by bylo potřeba provést metodu znovu s optimalizacemi nebo na nových sadách vzorků jiných včel.

Porovnání přítomnosti spor *P. larvae* ve vzorcích ze silně nakažených včelstev a ze včelstev s minimálními nálezy spor *P. larvae* pocházejících ze stejného stanoviště (lokality Útěšenovice a Zdeslavice) prokázalo jasné rozdíly mezi takto odlišnými včelstvy. Amplifikace ve vzorcích silně nakažených včel probíhala v pořádku, resp. výsledné sekvence produktu vzorku Z1 byly určeny jako *P. larvae*, což potvrzuje funkčnost metody qPCR.

Určení limitů či hranic detekce *P. larvae*, resp. hodnot prokazující či vyvracející nákazu nebo pravděpodobnou přítomnost klinických příznaků ve včelstvu nebylo možno zjistit. Pro tento účel nebyl dostatek vhodných dat. Bylo by potřeba získat vzorky včel, které vyplní aktuální nepřítomnost vzorků včel s mírou nákazy ležící mezi našimi vzorky téměř nenakažených včel a vzorky silně nakažených včel.

Budoucí práce v oblasti detekce a kvantifikace *P. larvae* ve včelích dělnicích by mohla pomoci například při rozhodování, která včelstva na základě aktuálního zdravotního stavu včel, resp. množství *P. larvae* ve včelstvu přemést apod.

Seznam zkratek

AFB = z anglického „American foulbrood“

bp = z anglického „base pair“

BLAST = z anglického „Basic Local Alignment Search Tool“

CCD = z anglického „colony collapse disorder“ (syndrom zhroucení včelstev)

CFU = z anglického „colony-forming units“

C_p = z anglického „crossing point“ u qPCR

C_q = z anglického „quantification cycle“ u qPCR

C_t = z anglického „threshold cycle“ u qPCR

ČIA = český institut pro akreditaci

DMSO = dimethyl sulfoxide

dNTPs = deoxynucleotide triphosphates

DreamTaq DNA polymeráza = *Thermus aquaticus* DNA Polymerase

dsDNA = z anglického „double-stranded deoxyribonucleic acid“

ERIC = z anglického „enterobacterial repetitive intergenic consensus“

ERIC-PCR = metoda rep-PCR s použitím ERIC primerů

KVS = krajská veterinární správa

LT = z anglického „lethal time“

MVP = mor včelího plodu

NCBI = z anglického „The National Center for Biotechnology Information“

NK = negativní kontrola

OIE = z francouzského „Office International des Epizooties“

PCR = z anglického „polymerázová řetězová reakce v reálném čase“

PK = pozitivní kontrola

PM = peritrofická matrix (membrána)

PBST = z anglického „phosphate buffered saline with Tween 20“ (fosfátový roztok)

qPCR = z anglického „kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase“

rep-PCR = z anglického „repetitive element polymerase chain reaction fingerprinting“

S-vrstva = z anglického „surface layer“ (povrchová vrstva či vrstva na povrchu)

SVS = státní veterinární správa

SVÚ = státní veterinární ústav

TOP = z anglického „take-off point“ u qPCR

VÚVč = výzkumný ústav včelařský

Definice použitých výrazů

- čisticí pud včel = instinkt dělnic pro udržování pořádku v úlu, např. úklid dna a buněk, odstranění nemocného plodu, opouštění hnízda nemocnými včelami, vyprazdňování mimo hnízdo a další (Prýmas et al., 2017)
- hemocoel = tělní dutina členovců někdy dalších skupin bezobratlých vyplněná hemolymfou (Volf & Horák, 2007)
- hospodářská zvířata = zvířata využívaná převážně k chovu, výkrmu, práci a jiným hospodářským účelům, zejména skot, prasata, ovce, kozy, koně, osli a jejich kříženci, drůbež, běžci, králíci, kožešinová zvířata, zvěř ve farmovém chovu, ryby a jiní vodní živočichové, včely a včelstva (Zákon č. 166/1999 Sb., § 3)
- krmná (mateří a dělničí) kašička = potrava, kterou vyrábí dělnice - kojičky pomocí hltanových žláz (obsahuje mnoho proteinů) a kusadlových žláz (obsahuje mnoho tukových látek); larvy budoucích matek jsou krmeny výhradně mateří kašičkou, ostatní larvy první tři dny mateří a poté již dělničí kašičkou, medem a pylem (Prýmas et al., 2017)
- mezistěna = vyrobená vosková tabule sloužící včelám jako předloha pro stavbu včelího díla (Prýmas et al., 2017)
- měl = materiál spadající na dno úlu, nejvíce stavební vosk (Titěra, 2009)
- ochranné pásmo = ochranné pásmo v okruhu nejméně 3 km kolem ohniska nákazy s přihlédnutím k epizootologickým, zeměpisným, biologickým a ekologickým podmínkám (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 11)
- ohnisko nákazy = stanoviště včelstev, na němž byl potvrzen krajskou veterinární správou mor včelího plodu (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 11)
- patogen = (micro)organismus, který je schopen vyvolat u příslušného hostitele onemocnění (Volf & Horák, 2007)
- preklinická fáze moru včelího plodu = období, kdy se ve včelstvu dají detekovat spory *P. larvae*, ale nejsou ještě viditelné klinické příznaky na plodu
- přenos horizontální = mezi jedinci v rámci jedné generace (Fries & Camazine, 2001)
- přenos vertikální = mezi jedinci mezi jednou generací a další nadcházející (Fries & Camazine, 2001), přenos onemocnění z rodičů na potomky (Velký lékařský slovník [online])

Seznam použité literatury

- Animal & Plant Health Agency. (2019). *National Bee Unit: Shook Swarm*.
<http://www.nationalbeeunit.com/searchResults.cfm>
- Applied Biosystems. (2006). *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays*.
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms_040377.pdf
- Applied Biosystems. (2007). *Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy - Kvantifikace pomocí standardní křivky - Uživatelská příručka*.
- Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3–4), 253–260.
- Ashiralieva, A., & Genersch, E. (2006). Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus* larvae, the etiological agent of American foulbrood in honeybees – a review. *Apidologie*, 37(4), 411–420.
- Bakhiet, N., & Stahly, D. P. (1985). Ultrastructure of sporulating *Bacillus* larvae in a broth medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 690–692.
- Bamrick, J. F. (1967). Resistance to American foulbrood in honey bees VI. Spore germination in larvae of different ages. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9(1), 30–34.
- Beekman, M., & Lew, J. Bin. (2008). Foraging in honeybees—when does it pay to dance? *Behavioral Ecology*, 19(2), 255–262. <https://doi.org/10.1093/beheco/arm117>
- Beekman, M., & Ratnieks, F. L. W. (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology*, 14(4), 490–496. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00443.x>
- Beims, H., Bunk, B., Erler, S., Mohr, K. I., Spröer, C., Pradella, S., Günther, G., Rohde, M., von der Ohe, W., & Steinert, M. (2020). Discovery of *Paenibacillus* larvae ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(2), 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151394>
- Brødsgaard, C. J., Ritter, W., & Hansen, H. (1998). Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus* larvae spores. *Apidologie*, 29(6), 569–578.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The

- MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chen, Y. W., Wang, C. H., An, J., & Kai-Kuang, H. (2000). Susceptibility of the Asian honey bee, *Apis cerana*, to American foulbrood, *Paenibacillus larvae* larvae. *Journal of Apicultural Research*, 39(3–4), 169–175.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2000.11101038>
- Couvillon, M. J., Riddell Pearce, F. C., Accleton, C., Fensome, K. A., Quah, S. K. L., Taylor, E. L., & Ratnieks, F. L. W. (2015). Honey bee foraging distance depends on month and forage type. *Apidologie*, 46(1), 61–70. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0302-5>
- de Graaf, D. C., Alippi, A. M., Antúnez, K., Aronstein, K. A., Budge, G., De Koker, D., De Smet, L., Dingman, D. W., Evans, J. D., Foster, L. J., Fünfhaus, A., Garcia-Gonzalez, E., Gregorc, A., Human, H., Murray, K. D., Nguyen, B. K., Poppinga, L., Spivak, M., VanEngelsdorp, D., ... Elke, E. (2013). Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–28.
- Dingman, D. W. (2015). Comparative analysis of *Paenibacillus larvae* genotypes isolated in Connecticut. *Archives of Microbiology*, 197(6), 789–795.
<https://doi.org/10.1007/s00203-015-1113-4>
- Djukic, M., Brzuszkiewicz, E., Fünfhaus, A., Voss, J., Gollnow, K., Poppinga, L., Liesegang, H., Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E., & Daniel, R. (2014). How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PloS ONE*, 9(3), 1–14.
- Dobbelaere, W., de Graaf, D. C., Peeters, J. E., & Jacobs, F. J. (2001). Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 32(4), 363–370.
<https://doi.org/10.1051/apido:2001136>
- Dorak, M. T., & et al. (2006). *Real-time PCR*. Taylor & Francis Group.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-88633-4_15
- Evans, J. D. (2003). Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(1), 46–50.
- Evans, J. D., Schwarz, R. S., Chen, Y. P., Budge, G., Cornman, R. S., De La Rúa, P., De Miranda, J. R., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., Genersch, E., Gisder, S., Jarosch, A., Kucharski, R., Lopez, D., Lun, C. M., Moritz, R. F. A., Maleszka, R., Muñoz, I., &

- Pinto, M. A. (2013). Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 52, Issue 4, p. 53). Taylor & Francis.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.11>
- Forsgren, E., & Laugen, A. T. (2013). Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie*, 45(1), 10–20. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0225-6>
- Forsgren, E., Stevanovic, J., & Fries, I. (2008). Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus* larvae genotypes. *Veterinary Microbiology*, 129(3–4), 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.001>
- Fries, I., & Camazine, S. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, 32(3), 199–214.
- Fries, I., Lindström, A., & Korpela, S. (2006). Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus* larvae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 269–274.
- Galperin, M. Y. (2013). Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiology Spectrum*, 1(2), 15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.tbs-0015-2012>
- Garcia-Gonzalez, E., & Genersch, E. (2013). Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus* larvae, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. *Environmental Microbiology*, 15(11), 2894–2901.
- Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Hertlein, G., Hedtke, K., Jakubowska, A., & Genersch, E. (2014). *Paenibacillus* larvae chitin-degrading protein PICBP49 is a key virulence factor in American foulbrood of honey bees. *PLoS Pathogens*, 10(7), 1–12.
- Genersch, E. (2008). *Paenibacillus* larvae and American Foulbrood – long since known and still surprising. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 3(4), 429–434.
- Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent , *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(supplement), S10–S19.
- Genersch, E., Ashiralieva, A., & Fries, I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7551–7555. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7551-7555.2005>
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., & Fries,

- I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3), 501–511.
- Genersch, E., & Otten, C. (2003). The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie*, 34(3), 195–206. <https://doi.org/10.1051/apido:2003025>
- Guler, A. (2008). The effects of the shook swarm technique on honey bee (*Apis mellifera* L.) colony productivity and honey quality. *Journal of Apicultural Research*, 47(1), 27–34. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101420>
- Haltufová, K. (2015). *Paenibacillus larvae* jako patogen ničící populace včely medonosné (*Apis mellifera*). Univerzita Karlova v Praze.
- Hansen, H., & Brødsgaard, C. J. (2003). Control of American Foulbrood By the Shaking Method. *Group*, 38, 140–145.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology*, 54(1), 285–302.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., de Vos, P., Logan, N. A., Ali, N., & Berkeley, R. C. W. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended description. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 270–279.
- Hoage, T. R., & Rothenbuhler, W. C. (1966). Larval Honey Bee Response to Various Doses of *Bacillus larvae* Spores. *Journal of Economic Entomology*, 59(1), 42–45. <https://doi.org/10.1093/jee/59.1.42>
- Hubert, J., Hortová, B., Nesvorná, M., Haltufová, K., Kamler, M., Titěra, D., & Erban, T. (2016). *Využití nové generace sekvenování pro diagnostiku původce moru včeliho plodu Paenibacillus larvae*. VÚVČ, VURV.
- Jersáková, J., & Tropek, R. (2018). Polinační syndromy. *Živa*, 6, 169–172.
- Johnson, R. (2010). *Honey Bee Colony Collapse Disorder*. <http://curusa.ihmc.us/rid=1JJM69DXL-27XB9CC-12CF/bees.pdf>

- Kamler, M., Tyl, J., & Titěra, D. (2017). *Očista včelstev přemetením na mezistěny s aplikací podpůrných imunostimulačních látek*. Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.
<https://www.beedol.cz/wp-content/uploads/2019/05/Methodika-ocista-vcelstev-2018-na-web.pdf>
- Kašpar, F., Titěra, D., & Langrová, I. (2017). *Methodika stanovení plemenné příslušnosti včely medonosné metodou geometrické morfometrie křídel*. (1.). Technická agentura České republiky. <https://www.beedol.cz/wp-content/uploads/2019/05/Methodika-stanoveni-plemenné-přislušnosti-vcel.pdf>
- Katznelson, H. (1950). *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *Journal of Bacteriology*, 59(2), 153–155.
- Kňazovická, V., Miluchová, M., Kačániová, M., Melich, M., Kročko, M., & Trakovická, A. (2011). Using Real-time PCR for Identification of *Paenibacillus* larvae. In *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* (Vol. 44, Issue 1, pp. 424–431).
<http://www.spasb.ro/index.php/spasb/article/view/529>
- Kochansky, J., Knox, D. A., Feldlaufer, M. F., & Pettis, J. S. (2001). Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus* larvae. *Apidologie*, 32(3), 215–222.
- Lindström, A. (2008). Distribution of *Paenibacillus* larvae spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of American foulbrood. *Microbial Ecology*, 56(2), 253–259.
- Lindström, A., Korpela, S., & Fries, I. (2008). Horizontal transmission of *Paenibacillus* larvae spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie*, 39(5), 515–522.
- Macek, J., Straka, J., Bogusch, P., Dvořák, L., Bezděčka, P., & Tyrner, P. (2010). *Blanokřídli České Republiky*. Academia.
- Martínez, J., Simon, V., Gonzalez, B., & Conget, P. (2010). A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus* larvae vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), 603–610. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02840.x>
- Ministerstvo zemědělství České republiky. (2019). *Český včelařský program 2020 - 2022*.
https://www.szif.cz/cs/CmDocument?rid=%2Fapa_anon%2Fcs%2Fdokumenty_ke_staze_ni%2Fkomodity%2Fzv%2F07%2F01%2F1333445470640%2F1563883921397.pdf
- Morrissey, B. J., Helgason, T., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Genersch, E., & Budge, G. E.

- (2015). Biogeography of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environmental Microbiology*, 17(4), 1414–1424.
- Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E., & Süssmuth, R. D. (2015). Involvement of secondary metabolites in the pathogenesis of the American foulbrood of honey bees caused by *Paenibacillus* larvae. *Natural Product Reports*, 32(6), 765–778.
- Munawar, M. S., Raja, S., Waghchoure, E. S., & Barkat, M. (2010). Controlling American Foulbrood in honeybees by shook swarm method. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 23(1–2), 53–58.
- Ogier, J. C., Pagès, S., Galan, M., Barret, M., & Gaudriault, S. (2019). RpoB, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1546-z>
- OIE - World Organisation for Animal Health. (2018). Chapter 3.2.2. American Foulbrood of Honey Bees (infection of honey bees with *Paenibacillus* larvae). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (pp. 719–735). https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf
- OIE - World Organisation for Animal Health. (2019a). Chapter 4.15. Official Health Control of Bee Diseases. In *Terrestrial Animal Health Code* (pp. 1–4).
- OIE - World Organisation for Animal Health. (2019b). Chapter 9.2. Infection of Honey Bees with *Paenibacillus* larvae (American Foulbrood). In *Terrestrial Animal Health Code* (pp. 1–4).
- Pernal, S. F., Albright, R. L., & Melathopoulos, A. P. (2008). Evaluation of the Shaking Technique for the Economic Management of American Foulbrood Disease of Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(4), 1095–1104. <https://doi.org/10.1093/jee/101.4.1095>
- Pernal, S. F., & Melathopoulos, A. P. (2006). Monitoring for American foulbrood spores from honey and bee samples in Canada. *Apiacta*, 41(1), 99–109.
- Poppinga, L., & Genersch, E. (2015). Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus* larvae kills honey bee larvae. *Current Opinion in Insect Science*, 10(1), 29–36.
- Prýmas, L., Dlouhá, Š., Kabát, M., Danihlík, J., Dostálková, S., Hroncová, Z., & Petřivalský, M. (2017). *Včelařství - svazek II*. (L. Prýmas (ed.); 1.). Pracovní společnost

nástavkových včelařů, z. s.

- Quintana, S., Fernández, N. J., Pagnuco, I., Medici, S., & Gende, Y. (2017). Report of a real-time PCR assay for *Paenibacillus* larvae DNA detection from spores of scale samples. *REVISTA ARGENTINA DE PRODUCCIÓN ANIMAL*, 37(2), 83–88.
<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/55325>
- Ramkissoon, S., MacArthur, I., Ibrahim, M., de Graaf, H., Read, R. C., & Preston, A. (2020). A qPCR assay for *Bordetella pertussis* cells that enumerates both live and dead bacteria. *PLOS ONE*, 15(4), 19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232334>
- Ribeiro, H. G., Melo, L. D. R., Oliveira, H., Boon, M., Lavigne, R., Noben, J. P., Azeredo, J., & Oliveira, A. (2019). Characterization of a new podovirus infecting *Paenibacillus* larvae. *Scientific Reports*, 9(1), 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56699-y>
- Rudge, S. R., & Monnig, C. A. (2000). ELECTROPHORESIS TECHNIQUES. *Separation and Purification Methods*, 29(1), 129–148. <https://doi.org/10.1081/SPM-100100006>
- Ruiz-Villalba, A., van Pelt-Verkuil, E., Gunst, Q. D., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. (2017). Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 7–18.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.001>
- Rytina, L., Texl, P., Čermák, K., Gruna, B., Hajdušková, J., Holub, P., Klíma, Z., Kovařík, I., Navrátil, S., Texl, F., & Tůma, Z. (2016). *Včelařství - svazek I.* (L. Rytina (ed.); 1.). Pracovní společnost nástavkových včelařů, z. s.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354.
<https://doi.org/10.1126/science.2999980>
- Santos, S. B., Oliveira, A., Melo, L. D. R., & Azeredo, J. (2019). Identification of the first endolysin Cell Binding Domain (CBD) targeting *Paenibacillus* larvae. *Scientific Reports*, 9(1), 2568. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39097-2>
- *Schirach, G. A. (1769). *Histoire des Abeilles*.
- Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, 15(4), 172–180.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., & Růžičková, V. (2008). *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita.
- Solčanský, M. (2016). Přemetání na mezistěny. *Moderní Včelař*, 2, 36–37.

- Stamereilers, C., Fajardo, C. P., Walker, J. K., Mendez, K. N., Castro-Nallar, E., Grose, J. H., Hope, S., & Tsourkas, P. K. (2018). Genomic analysis of 48 *Paenibacillus* larvae bacteriophages. *Viruses*, *10*(7), 29. <https://doi.org/10.3390/v10070377>
- Thompson, A., Bench, S., Carter, B., Zehr, J., Abelson, J. N., & Simon, M. I. (2013). Chapter 3. - Coupling FACS and Genomic Methods for the Characterization of Uncultivated Symbionts. In *Methods in Enzymology* (pp. 45–60). Elsevier Inc.
- Titěra, D. (2009). *Mor včeliho plodu*. Výzkumný ústav včelařský.
- Titěra, D., Kamler, M., Erban, T., & Hubert, J. (2018). *Mor včeliho plodu – Diagnostika, prevence a tlumení*. Výzkumný ústav včelařský, s. r. o., Dol. <https://www.beedol.cz/wp-content/uploads/2019/05/Mor-vceliho-plodu-2018.pdf>
- van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Springer Science & Business Media.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D. R., & Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE*, *4*(8), 17.
- vanEngelsdorp, D., & Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, 80–95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>
- Visscher, P. K., & Seeley, T. D. (1982). Foraging Strategy of Honeybee Colonies in a Temperate Deciduous Forest. *Ecology*, *63*(6), 1790. <https://doi.org/10.2307/1940121>
- Volf, P., & Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Triton.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, *173*(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- White, G. F. (1906). The Bacteria of the Apiary, with Special Reference to Bee Disease. In *U. S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology* (Technical, Vol. 14). Government Printing Office. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/164836#page/48/mode/1up>
- Wilson, W. T. (1971). Resistance to American Foulbrood in Honey Bees. XI. Fate of *Bacillus* larvae spores ingested by adults. *Journal of Invertebrate Pathology*, *17*(2), 247–255.
- Wilson, W. T. (1972). Resistance to American Foulbrood in Honey Bees XII. Persistence of viable *Bacillus* larvae spores in the feces of adults permitted flight. *Journal of Invertebrate Pathology*, *20*(2), 165–169.
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L. H., & Genersch, E. (2008). Fluorescence in situ

hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 10(6), 1612–1620.

Zvára, K. (2008). *Biostatistika*. Karolinum.

* Sekundární citace

Zákony

Česká Republika. Vyhláška č. 299/2003 Sb. ze dne 1. září 2003, o opatřeních pro předcházení a zdolávání nákaz a nemocí přenosných ze zvířat na člověka. In Sbíрка zákonů ČR, ročník 2003. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-299> [cit. 2020-08-10].

Česká Republika. Vyhláška č. 18/2018 Sb. ze dne 31. ledna 2018, o veterinárních požadavcích na chov včel a včelstev a o opatřeních pro předcházení a zdolávání některých nákaz včel a o změně některých souvisejících vyhlášek. In Sbíрка zákonů ČR, ročník 2018. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-18> [cit. 2020-08-10].

Česká Republika. Zákon č. 166/1999 Sb. ze dne 13. července 1999, o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). In Sbíрка zákonů ČR, ročník 1999. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166> [cit. 2020-08-10].

Česká Republika. Zákon č. 154/2000 Sb. ze dne 17. května 2000, o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon). In Sbíрка zákonů ČR, ročník 2000. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-154> [cit. 2020-08-10].

Ministerstvo zemědělství, Státní veterinární správa. Opatření obecné povahy č. 49935/2019-MZE-18142 ze dne 29. 10. 2019 – Metodika kontroly zdraví zvířata nařízené vakcinace na rok 2020. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/wp-content/files/dokumenty-a-publikace/Dokument-60848-2019-MZE-18141.pdf#page=1&zoom=auto,-82,733> [cit. 2020-08-10].

Webové stránky

CARTO – Hustota zavčelení; Dostupné z: <https://colosscz.carto.com/builder/18c57198-e01d-4feb-8506-c3109913c972/embed> [cit. 2020-08-10]

Český institut pro akreditaci; Dostupné z: <https://www.cai.cz/>; [cit. 2020-08-10]

Encyclopedia of Life [online]; Dostupné z: <http://www.eol.org/>; [cit. 2020-08-10]

List of prokaryotic names with standing in nomenclature [online]; Dostupné z: <http://www.bacterio.net/-classifphyla.html#Firmicutes>; [cit. 2020-08-10]

NCBI vyhledávací program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), Dostupné z: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastp [cit. 2020-08-10]

SmugMug. Dostupné z: <https://designmjc.smugmug.com/Hobbies/Shook-Swarm/> [cit. 2020-08-10]

Státní veterinární správa: Mapové výstupy ohnisek nákaz včel a ochranných pásem [online]; Dostupné z: <https://www.svscr.cz/mapove-vystupy-ohnisek-nebezpecnych-nakaz-a-ochrannych-pasem/> [cit. 2020-08-10]

Státní veterinární správa: Mor včelího plodu [online]; Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/mor-vceliho-plodu/> [cit. 2020-08-10].

Velký lékařský slovník [online]; Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/vertikalni-prenos;> [cit. 2020-08-10]