

Posudek diplomové práce Bc. Kristýny Haltufové Dospělci včely medonosné (*Apis mellifera*) jako přenašeči a reservoár moru včelího plodu (*Paenibacillus larvae*).

Diplomová práce Kristýny Haltufové pojednává o původci moru včelího plodu, čímž tematicky navazuje na svou bakalářskou práci. Předem musím říci, že jsem se s Kristýnou Haltufovou setkal při práci v terénu při odběru vzorků a oceňoval jsem zájem pro danou problematiku a aktivní přístup.

Práce je členěna klasickým způsobem (úvod, materiál a metodika, výsledky a diskuse).

Úvodu, metodice a výsledkům je věnována zhruba stejná část práce (17, 12 a 14 stran textu včetně tabulek, grafů a obrázků), diskusi však méně (5 stran).

V úvodu se studentka věnuje charakteristice a popisu původce moru včelího plodu, průběhu onemocnění i praktickým aspektům a postupům při prokázání této nemoci včel. Při popisu diagnostických metod možná příliš zabíhá do principů molekulárních metod, které jsou všeobecně již známé. Zřejmě proto mi chybí přehled známých prací a jejich výsledků, které se věnovali moru včelího plodu s přístupem qPCR detekce, když to je klíčová metoda zpracování vzorků pro diplomovou práci.

V metodické části je detailně popsán postup zpracování vzorků. Zde podotknu, že získání vzorků ze včelstev v případě moru včelího plodu provází nelehká práce, protože se jedná o nebezpečnou nákazu dle Veterinárního zákona a při jejím potvrzení se vyhláší mimořádná veterinární opatření. I proto je předložená diplomová práce unikátním souborem dat. Bohužel už dále musím také konstatovat, že data nejsou plně zpracována tak, jak by mohla být. Ve výsledcích se vzájemně prolínají části všech 3 dílčích cílů a je třeba opakovaného se vracení k textu i tabulkám na různých stranách, aby byl jasně patrný výsledek a dosaženého cíle. Všechny 3 dílčí cíle bylo dosaženo, i když ne plně jasně popsáno a diskutováno. V práci se správně využilo obecných bakteriálních primerů, specifických primerů pro *Paenibacillus larvae*, následně i nested PCR, sekvenování a qPCR. Musím říci, že jsem se ztratil, a ne plně poznal, které a kolik vzorků bylo falešně pozitivních, protože následné sekvenování odhalilo jiné bakterie. První cíl, který srovnává včelstva *P. larvae* pozitivní, avšak bez klinických příznaků, před a po přemetení na mezistěny představuje velmi zajímavé výsledky. Zcela neočekávaně se qPCR prokázalo, že paradoxně i po přemetení přítomnost *P. larvae* v dělnicích stoupla. Bohužel již zmíněným sekvenováním vlastně nevím, jestli jsou to hodnověrné a správné výsledky, případně které vzorky se mohli, díky nejasnosti při zpracování, do výsledných tabulek a grafů vyhodit. Nemohu souhlasit, že by přemetení včelstev v prevenci moru včelího plodu nefungovalo – i sama studentka píše, že na dané lokalitě již klinika moru nepropukla. Zajímavý a unikátní výsledek byl dosažen právě využitím qPCR. V druhém cíli se studentka věnuje porovnání qPCR v klinicky pozitivních a negativních včelstvech, což mělo vést také k závěrům a dosažení třetího cíle, který měl objasnit limity detekce qPCR. Díky spolupráci s kolegy z VÚVč studentka porovnávala data s výsledky získaných klasickým přístupem kultivačních metod vyšetření vzorků. Zde by mi přišlo ideální všechna data ze všech včelstev propojit v jedné tabulce nebo grafu, což by ukázalo jasné limity detekce a přesnost analýz. Bohužel sama studentka konstatuje, že díky neprokázání *P. larvae* v některých vzorcích sekvenováním není vhodné ani toto provést. Bohužel nejsem schopen posoudit, zda byly vzorky nevhodně zpracovány nebo došlo k obyčejné kontaminaci během zpracování. Studentka správně diskutuje význam teploty tání při qPCR, ale tím se dostáváme čistě k metodickému pojetí práce, které nebylo cílem. Opakovaným zpracováním by se jistě dosáhlo kýženého výsledku a diagnostice. K obhajobě bych doporučil se držet vytyčených 3 dílčích cílů a dát k nim jasné výsledky a odpovědi, tak jak to vytykám výše. qPCR jistě bude představovat v brzké době alternativu ke klasickým

kultivačním metodám, které využívají možnost kvantifikace P. larvae ve vzorku, což je klíčové při řešení ohnisek a ochranných pásem moru včelího plodu v terénu.

Z praktického hlediska by mne zajímalo časové i finanční srovnání vyšetření vzorků pomocí kultivace a qPCR. Lze ozdravné opatření přemetení včelstev na mezistěny provádět kdykoli během roku?

Diplomovou práci Kristýny Haltufové přes uvedené výtky doporučuji k obhajobě.

V Dole 2. září 2020

MVDr. Martin Kamler