

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Blanka Navrátilová

Melissococcus plutonius jako původce hniloby včelího plodu
Melissococcus plutonius causing European foulbrood

Bakalářská práce

Školitel: doc. Jan Hubert, Ph.D.

Praha, 2018

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, 14. 8. 2018

.....

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Miroslavě Bodrinové za její laskavou pomoc a ochotu, Bc. Kláře Palkoskové za odborné typografické rady a především svému školiteli doc. Janu Hubertovi, Ph.D. za jeho čas, trpělivost, rady a poznatky, které umožnily vznik této práce, a nakonec svým nejbližším za slitování, pomoc a podporu, jimiž mě zahrnovali po celou dobu studia.

Abstrakt

Hniloba včelího plodu je celosvětově rozšířená bakteriální choroba napadající larvy včely medonosné (*Apis mellifera*). Původcem tohoto onemocnění je nesporulující, Gram pozitivní, anaerobní bakterie *Melissococcus plutonius*. Dospělé včely nákazou netrpí, nicméně bakterii přenášejí na svých tělech a ve střevech do značné vzdálenosti při vylétávání z úlu, případně mohou nakazit jiné včelstvo, dojde-li k interakci především v době strádání kolonií. Jakmile je bakterie do kolonie zanesena, může zde přežívat i po dobu několika let, aniž by byla její přítomnost jakkoliv pozorována, nebo se začne masivně množit, přičemž je schopna zničit celá včelstva. Navzdory tomu, že byl *M. plutonius* objeven již před mnoha lety, většina jeho vlastností je stále neznámá, a proto zatím neexistuje léčba, jež by udržovala jak bakterii, tak i její šíření pod kontrolou. Je tedy klíčové rozeznat její přítomnost ve včelstvu včas, než vypukne akutní nákaza. Tato práce přináší poznatky, které dosud o této bakterii máme a shrnuje informace o přístupu k onemocnění z různých částí světa.

Klíčová slova:

hniloba včelího plodu, *Melissococcus plutonius*, *Apis mellifera*, včela medonosná, nemoci

Abstract

European foulbrood is a bacterial disease attacking honey bee larvae worldwide. It is caused by bacterium *Melissococcus plutonius*, which is a non-spore-forming, Gram positive, anaerobic bacterium. The adult bees are not affected but serve as a vector of the disease as they carry the bacterium within their own bodies and can travel big distances from their hive and also may interact with other hives especially when their own colony is suffering. Once the bacterium is introduced into the colony, it either remains benign and unnoticed for years, keeping its population low, or it can multiply vigorously within the brood and destroy the entire bee populations. Despite having been described many decades ago, *M. plutonius* as such along with its virulence remain poorly understood and therefore there is no treatment efficient enough that would keep this bacterium along with the disease under control. Hence it is of a great importance to recognize its presence soon enough to prevent the outbreak. This thesis brings together the knowledge we have so far about this mysterious bacterium and sums up how European foulbrood is being treated all around the world.

Key words:

European foulbrood, *Melissococcus plutonius*, *Apis mellifera*, honey bee, diseases

Obsah

Úvod.....	1
1. Medonosné včely.....	1
1.1 <i>Apis</i> sp.	1
1.2 Včela medonosná, <i>Apis mellifera</i>	2
1.3 Funkce včely medonosné.....	2
2. Nemoci včel.....	2
3. <i>Melissococcus plutonius</i>	3
3.1 Klasifikace	3
3.2 Charakteristika.....	4
3.3 Uniformita kmenů <i>M. plutonius</i>	5
3.3.1 Kmeny napadající <i>Apis mellifera</i>	5
3.3.2 Kmeny napadající <i>Apis cerana</i>	6
3.4 Patogenicita	6
4. Průběh onemocnění u včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>).....	9
5. Doprovodné bakterie	11
5.1 <i>Achromobacter eurydice</i>	11
5.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	12
5.3 <i>Paenibacillus alvei</i>	12
6. Možné rezervoáry onemocnění	13
7. Způsoby detekce <i>M. plutonius</i>	14
7.1 Pozorování a prohlídka včelstev.....	14
7.2 Kultivace <i>M. plutonius</i>	15
7.3 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	15
7.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	16
7.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR, real-time PCR).....	17
7.6 NGP (nanočástice zlata)	18
7.7 Lateral flow test	18
8. Léčba	20
8.1 Antibiotika.....	20
8.1.1 Resistence <i>M. plutonius</i> vůči antibiotikům.....	21
8.2 Shook swarm technika.....	21
8.3 Shook swarm + OTC metoda	22
8.4 Alternativní metody.....	23
8.4.1 Užití upravených rostlinných produktů	23

8.4.2 Antagonistické bakterie	24
8.5 Kontaminace medu	25
8.5.1 Odstranění <i>M. plutonius</i> z medu	25
8.5.2 Antibiotika v medu	25
8.6 Léčba v ČR	26
Závěr.....	27
Seznam použité literatury:.....	30

Úvod

Hniloba včelího plodu je celosvětově rozšířená choroba napadající larvy několika druhů rodu včela (*Apis* spp). (Bailey a Collins 1982a; Forsgren 2010), která dokáže včelstva zásadně zredukovat až úplně zničit. Příčinou této nemoci je Gram pozitivní bakterie *Melissococcus plutonius* (Bailey 1963), díky jejímu působení se však v koloniích mohou ustálit i další, v menších koncentracích neškodné bakterie, jejichž společné působení někdy vede až k zadušení celé kolonie (Bailey 1961). Ne nutně ale přítomnost *M. plutonius* v kolonii znamená aktuální hrozbu akutní nákazy, bakterie naopak dokáže po mnoho let ve včelstvu přežívat nepovšimnuta, aniž by způsobovala kolonii zásadní ztráty (Bailey 1961). Klinické projevy se dostaví až při překročení určité velikosti bakteriální kolonie na jedince (Roetschi et al. 2008), avšak není zcela jasné, co způsobuje přechod mezi benigní a akutní fází. Dospělé včely jsou do určité míry schopné napadené larvy rozpoznat a z plástů odstranit, čímž přispívají k čištění kolonie (Bailey 1961; Forsgren et al. 2013), nicméně také slouží jako vektor tohoto onemocnění, poněvadž přenášejí bakterii na svých tělech jak v rámci svojí vlastní, tak i ostatních kolonií (Pinnock a Featherstone 1984).

V České republice se toto onemocnění opět vyskytlo po několika desetiletích, a to na území Krkonošského národního parku (Erban et al. 2017). V současné době není znám žádný léčebný postup, jenž by držel infekci a její šíření pod kontrolou, jediným řešením je pálení napadených včelstev. Z toho důvodu je třeba zrevidovat poznatky, které o této bakterii a jí způsobované chorobě máme, aby se alespoň na našem území mohl vyvinout efektivní postup pro zvládnutí akutních i latentních nákaz v souladu s českou legislativou. Tato práce zároveň sumarizuje detekční metody, jejichž včasná a správná aplikace může zabránit rozsáhlým ztrátám včelstev, která jsou tak důležitou součástí nejen českého ekosystému i na hospodářské úrovni ať už jako opylovači či producenti medu a dalších komerčně využívaných produktů.

1. Medonosné včely

1.1 *Apis* sp.

Rod *Apis* sp. spadá do čeledi včelovitých (Apidae), podřádu štíhlopasích (Apocrita), řádu blanokřídlých (Hymenoptera), třídy Insecta, kmene Arthropoda v rámci říše Opisthokonta domény Eukaryota. Je to klasický zástupce sociálního hmyzu. Typická pro něj je stavba hnízd z vosku a shromažďování medu. Čítá celkem sedm žijících druhů. Nejběžnější z nich je *Apis*

mellifera Linnaeus, 1758. Kromě tohoto, který se rozšířil patrně z tropické Afriky, pocházejí všechny druhy z jižní a jihovýchodní Asie. Celkem čeled' Apidae tvoří zhruba 20 000 zástupců (Encyclopedia of Life [online]).

1.2 Včela medonosná, *Apis mellifera*

A. mellifera je náš nejběžnější zástupce medonosných včel. Má neobvykle rozsáhlý přirozený areál rozšíření, který se táhne od jižní Skandinávie na severu k Uralu a pobřeží Ománu na východě, na jihu sahá až po Západní Kapsko a na západě je lemován oceánem při pobřeží Senegalu (Ruttner, Tassencourt a Louveaux 1978). Člověkem byl tento druh introdukován do Asie, Austrálie a Severní a Jižní Ameriky, kde se stejně jako v třeba Evropě chová především kvůli produkci medu. Dále je využíván ke komerčnímu opylování plodin (Encyclopedia of Life [online]).

1.3 Funkce včely medonosné

Již před mnoha tisíci lety došlo k domestikaci medonosných včel a k jejich chování v uměle vytvořených úlech. Včelařství vzniklo patrně v Egyptě až 6 000 let př. n. l. kvůli získávání medu a včelího vosku (Morse 1989). *Apis mellifera* je považována za zásadního opylovače a prostřednictvím toho i za udržitele biologické a genetické rozmanitosti rostlin. Její hodnota jako opylovače je hospodářsky několikanásobně větší než jako producenta medu. Včelařství je vnímáno jako jedna z klíčových činností rozvíjející venkovské oblasti, která vytváří pracovní místa a nepřímo se podílí na zajišťování potravin a zachování biologické rozmanitosti (Sdělení Komise Evropskému parlamentu a Radě č. 0714/2010 o zdraví včel [online]). *A. mellifera* je zákonem definovaná jako hospodářské zvíře (§ 3 odst. 1 písm. c) z. č. 166/1999 Sb.) a veškeré úkony s ní spojené, jako například prodej, přemístování apod., jsou řešeny podle veterinárního zákona (z. č. 166/1999 Sb.)

2. Nemoci včel

Včely, stejně jako většina organismů, jsou náchylné na virová, bakteriální a mykotická (způsobovaná entomopatogenními houbami) onemocnění a různé parazity. Za normálních okolností je jejich vlastní obranyschopnost velmi účinná, ovšem používání insekticidů, herbicidů a měnící se klimatické podmínky mohou mít zásadní vliv na zdraví včel, obzvláště jsou-li již nakaženy (OIE 2013). Mezi choroby způsobované parazitickými roztoči patří např. akarínóza, jejíž původcem je roztočik včelí (*Acarapis woodi*). Ten parazituje v tracheách

dospělých včel, kde saje hemolymfu (OIE 2017). Dalším, poněkud závažnějším, celosvětově rozšířeným onemocněním, je varroáza, kterou způsobují roztoči rodu *Varroa*, přičemž nejběžnější a nejzávažnější z nich je kleštík včelí (*Varroa destructor*). Tento ektoparazit se živi hemolymfou dosělců i larev, čímž jim zkracuje dobu života (Rosenkranz, Aumeier a Ziegelmann 2010), zároveň je ale i hlavním přenašečem viróz jako např. virus deformovaných křídel apod. (OIE 2018). Mezi bakteriální nákazy se pak řadí mor včelího plodu a hniloba včelího plodu. Obě nemoci si jsou podobné projevem, liší se však jejich původce – mor včelího plodu způsobuje *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, sporulující, Gram pozitivní bakterie. Napadá a likviduje včelstva po celém světě, a protože antibiotika užívaná k léčbě nedokážou zničit spory, které často přežívají v medu, celá včelstva včetně včelařského vybavení se musí spalovat (Hansen a Brødsgaard 1999). Trošku mimo standardní kategorie stojí fenomén s názvem Syndrom zhroucení včelstev (Collony Collapse Disorder). Dochází k němu patrně v kombinaci působení nějakého patogena a dalších stresových podmínek. Typickým projevem je náhlá ztráta dělnic z úlu, až je nakonec královna obklopena jen velmi malým počtem většinou čerstvě vyvinutých dospělců. V kolonii ani v její blízkosti se přitom neobjevují mrtvé včely (Cox-Foster 2007). Přesná příčina známá není, ale zhroucení včelstev provází vyšší náchylnost na patogeny, čili jim byly kolonie buď vystaveny ve větší míře nebo trpěly sníženou imunitou (VanEngelsdorp et al. 2009). V České republice případ Syndromu zhroucení včelstev hlášen není, zato se tu vyskytuje jak mor včelího plodu, tak varroáza (Státní veterinární správa (a) [online]) a nyní opět i hniloba včelího plodu, již způsobuje *Melissococcus plutonius*. Tato práce se bude zabírat právě tímto onemocněním a jeho původcem.

3. *Melissococcus plutonius*

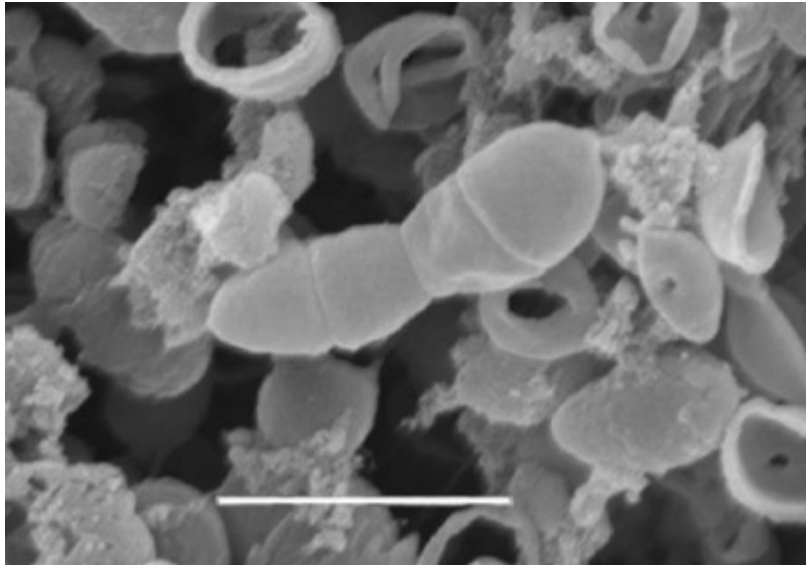
3.1 Klasifikace

Ač popsán již před více než sto lety, *Melissococcus plutonius* se dočkal správného zařazení relativně nedávno. Nejprve byl pojmenován *Bacillus pluton* (White 1912, podle Baileyho 1956), následně byl překlasifikován kvůli řetízkovým útvarům, které tvořil v kultivaci, a pojmenován *Streptococcus pluton* (Bailey 1957a). Nicméně později došlo k vyloučení z rodu *Streptococcus* na základě kulturních dat a dat biochemických a chemických. Byl tedy vytvořen nový, samostatný taxon a navrženo nové jméno *Melissococcus pluton*, jež vychází z řeckého slova pro včelu – Melissa (Bailey a Collins 1982a). S nástupem molekulárních technologií byl posléze potvrzen blízký příbuzenský vztah s rodem *Enterococcus* po srovnání sekvence genu

16S rRNA (Cai a Collins 1994). V současné době je zařazen do kmene Firmicutes čeledi Enterococcaceae, v rámci které tvoří samostatný rod, a je tudíž jeho jediným zástupcem (Forsgren 2009).

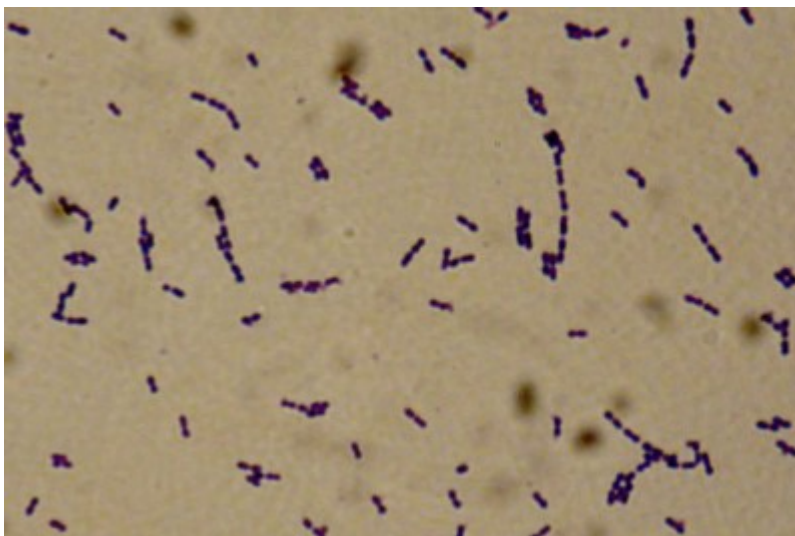
3.2 Charakteristika

M. plutonius (viz Obrázek 1) je Gram pozitivní, nesporulující, pleomorfní, anaerobní až mikroaerofilní bakterie. Je však možné ji v laboratorních podmínkách vytrénovat a přivyknout aerobním podmínkám, ve kterých je schopná růst, ale ztrácí schopnost růst anaerobně (Bailey 1957b). V anaerobním prostředí roste pouze za přítomnosti CO₂ (Bailey a Collins 1982a), přičemž koncentrace plynu není pro růst zásadní (Bailey 1957b). V závislosti na dostupnosti vzduchu tvoří formu buďto kokální



Obrázek 1: snímek *M. plutonius* ze skenovacího elektronového mikroskopu; měřítko odpovídá 1 μ m. Zdroj: Forsgren et al. (2013).

(v anaerobním prostředí) nebo silnější tyčinkovitou (v prostředí aerobním). Forma může patrně přecházet jedna v druhou v závislosti na přítomnosti sekundárních bakterií, jež ovlivňují koncentraci CO₂, případně z počátku tvoří formu tyčinkovitou, která změní podmínky v místě růstu na anaerobní a umožní tak růst kokální formy (Bailey 1957b). Buňky se mohou



Obrázek 2: *M. plutonius* po Gramově barvení. Zdroj: Forsgren et al. (2013).

vyskytovat samostatně, v párech nebo mohou tvořit řetízky různých délek (viz Obrázek 2) (Forsgren 2009). V kulturách tvoří kolonie v průměru 1 mm široké, jejichž vzhled se liší nejvíce v závislosti na druhu včely, ze které byla bakterie izolována.

V zásadě se pohybuje od hustých bílých nebo zrnitých, neprůhledných, celistvých, hladkých, kopulovitých přes relativně transparentní s klenutým středem až po prstencovité útvary se zrnitými okraji. Největší variabilitu tvoří kultury vypěstované z *Apis cerana* (Bailey a Collins 1982a).

3.3 Uniformita kmenů *M. plutonius*

3.3.1 Kmeny napadající *Apis mellifera*

Při studiu příbuznosti kmenů *M. plutonius* z různých částí světa se prokázala velká genetická podobnost i geograficky velmi vzdálených kmenů na základě kulturních a sérologických testů (Bailey a Gibbs 1962). Nejméně příbuzný se ukázal kmen z Brazílie, jenž se odlišoval jak nižšími nároky na kultivaci, tak i koncentracemi guaninu a cytosinu v DNA a sérologickými výsledky (Bailey 1984). Dále se ukázala podobnost izolátů z Číny a Indie, ačkoliv pocházely z jiných druhů včel (z *A. mellifera* a *A. cerana*), oba se však odlišovaly od britských a brazilských. Vytvořily se tak tři pomyslné skupiny kmenů odpovídající jejich geografickému rozmístění (Allen a Ball 1993). Později došlo k přezkoumání příbuznosti kmenů z jednotlivých států Austrálie v porovnání s několika kmeny z Anglie pomocí restričních endonukleáz (Djordjevic et al. 1999). Samotné australské státy mají velice odlišné klimatické podmínky – od subtropických přes temperátní a mediteránní až po suché stepní oblasti. Stejně tak se v jednotlivých státech liší vliv hniloby včelího plodu na kolonie včel, nejvíce znatelný je v jihovýchodní části kontinentu. Výsledky srovnávající DNA bakterie z takto rozmanitých podmínek však ukázaly naprostou genetickou homogenitu (Djordjevic et al. 1999).

Atypický kmen se objevil v Japonsku. Na rozdíl od typických evropských není tento zdaleka tak náročný na kultivaci, liší se i v biochemické aktivitě a v kultivaci si zachovává virulenci (Arai et al. 2012). Po srovnání oblasti genu 16S rRNA a DNA-DNA hybridizaci (tj. proces porovnávající oblasti DNA dvou organismů) se jevil jako taxonomicky identický s evropským kmenem, v pulzní gelové elektroforéze je ale šlo velmi dobře odlišit (Arai et al. 2012). V současnosti rozlišujeme 14 kmenů (viz Tabulka 1).

K zásadnímu průlomů došlo při použití multilokusové sekvenční typizaci. Ta je schopná rozeznat typy jinak geneticky homogenních organismů pomocí analýzy sekvencí tzv. „housekeeping“ genů. Ukázalo se, že atypický japonský izolát je totožný s nizozemským, britským a americkým, a že je tudíž poměrně hojně rozšířen (Haynes et al. 2013). Velmi podobný jim byl brazilský izolát (popsal Bailey 1984), nicméně tvoří vlastní typ. V roce 2013 bylo objeveno 20 sekvenčních typů, 12 z nich ve Velké Británii a 11 v ostatních zemích světa.

Především vzácné typy mohou sloužit ke studiu šíření bakterie a přispět tak k objasnění biogeografických preferencí daných typů a jejich distribučních mechanismů (Haynes et al. 2013). O rok později bylo pomocí stejné metody zkoumáno více než 200 izolátů na území Velké Británie. Došlo k objevu čtyř nových typů a nalezení dvou, které se do té doby na britském území nevyskytovaly (Budge et al. 2014).

3.3.2 Kmeny napadající *Apis cerana*

A. cerana je asijský zástupce medonosných včel. V 70. letech byl ale izolován z indických včel kmen *M. plutonius*, jenž se nejvíce od běžných evropských kmenů liší ve vzhledu kultur v kultivaci, částečně i v požadavcích na ni a sérologii, nicméně charakteristické rysy si zachoval (Bailey 1974). Kvůli odlišnostem je tedy nepravděpodobné, že by v tomto případě došlo k přenosu bakterie z jednoho druhu včely na druhý, ačkoliv ho obecně nelze vyloučit. V testovaných koloniích *A. cerana* v Číně a Vietnamu se totiž *M. plutonius* vyskytoval pouze tehdy, pokud byly v kontaktu s evropským zástupcem. To ovšem neznamená, že se tam bakterie normálně nevyskytuje (Forsgren et al. 2015). V Indii se podařilo izolovat kmen *M. plutonius*, jenž rostl striktně v anaerobních podmínkách na speciálním mediu, byl patogenní a vyskytoval se jak v larvách, tak v kuklách. Ve srovnání s izolátem z *A. mellifera* ze stejné geografické oblasti se dále drobně liší na genomické úrovni a odolnosti vůči stejným antibiotikům (Singh Rana et al. 2012). Před pár lety byl potvrzen první případ hniloby včelího plodu u *A. cerana japonica*, domorodého zástupce japonských včel. Izoláty z něj byly identifikovány jako atypické kmeny a následně díky multilokusové sekvenční typizaci rozděleny na šest typů. Tři z nich byly dosud neznámé. Nejhojněji zastoupeny byly dva typy, které byly totožné s izoláty jak z *A. mellifera*, tak *A. cerana*, a to nejen z Japonska, ale i jiných zemí (Takamatsu et al. 2014).

3.4 Patogenicita

M. plutonius velmi rychle ztrácí schopnost vyvolat onemocnění, pokud je pěstován v kultuře (Bailey 1963). Některé atypické formy si však tuto schopnost zachovávají (Arai et al. 2012). Multilokusová sekvenční typizace odhalila, že větší výskyt onemocnění je na územích, na nichž se vyskytuje více sekvenčních typů a vykazují tak větší diverzitu patogena. Sekvenční typy se podařilo rozdělit do vzájemně geneticky odlišných klonálních komplexů podle jejich podobnosti (Budge et al. 2014).

Celkem bylo zatím objeveno 34 sekvenčních typů, jež tvoří tři klonální komplexy. Tyto komplexy se liší mimo jiné virulencí. Laboratorně se podařilo nasimulovat podmínky, ve

kterých i kmeny, které standardně virulenci ztrácí, byly schopny nemoc vyvolat, a na základě *in vitro* vyvolaných infekcí se porovnála agresivita vybraných zástupců jednotlivých komplexů. Výsledky jsou následující – nejagresivnější je klonální komplex CC12, do kterého spadají tzv. atypické kmeny *M. plutonius*. Téměř 100 % napadených larev zástupcem komplexu CC12 zemře během několika dní, jejich růst je zásadně zpomalený a nedostanou se do stádia kukly. Komplex CC3 taktéž zamezuje růstu, část larev se nicméně může zakuklit, ale opět nepřežijí. Naproti tomu komplex CC13 je v podstatě avirulentní a nezpůsobuje ani malý nárůst hmotnosti ani úmrtí larev. S tím souvisí také proliferace v larválním střevě, která je nejvyšší u komplexu CC12 a nejnižší u CC13. V terénu však byli izolováni zástupci CC13 z napadených kolonií, tudíž je možné, že testovaný kmen virulenci v *in vitro* podmínkách ztratil, případně k vyvolání infekce potřebuje doprovodné bakterie nebo aby byla kolonie vystavena stresovým podmínkám jako třeba nedostatku vody. Reálně také CC3 napadá v rámci trubčí plástve větší procento larev než CC12, takže by měl být virulentnější (Nakamura et al. 2016). Tabulka 2 znázorňuje zastoupení jednotlivých komplexů a sekvenčních typů, jak jsou registrovány ve veřejné databázi multilokusové sekvenční typizace PubMLST. Typ ST 35* byl registrován na začátku roku 2018 a není tudíž ještě zařazen.

Tabulka 1: Přehled kmenů *M. plutonius* a jejich identifikační číslo pro nukleotidové databáze. Zdroj: Upraveno podle National Center for Biotechnology Information [online].

vědecký název	kmen	GenBank ID (NCBI referenční údaj)
<i>Melissococcus plutonius</i> S1	S1	NZ_CP006683.1
<i>Melissococcus plutonius</i> DAT561	DAT561	NC_016938.1
<i>Melissococcus plutonius</i> ATCC 35311	ATCC 35311	NC_015516.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	49.3	NZ_JSBA00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	B5	NZ_JSAW00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	765-6B	NZ_JSAX00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	90.0	NZ_JSAZ00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	21.1	NZ_JSAY00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	764-5B	NZ_JSAV00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	119	NZ_JSBB00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	H6	NZ_JSBC00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	60	NZ_JSBE00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	L9	NZ_JSBD00000000.1
<i>Melissococcus plutonius</i>	82	NZ_JSBF00000000.1

Tabulka 2: Přehled sekvenčních typů (ST) rozlišených podle multilokusové sekvenční typizace (MLST) na základě alelického profilu a jejich příslušnost ke konkrétnímu klonálnímu komplexu (CC) včetně počtu izolátů, jež odpovídají danému typu a jsou registrovány v PubMLST.

ST	MLST				CC	Počet izolátů registrovaných PubMLST
	argE	galK	gbpB	purR		
1	1	1	1	1	13	6
2	2	3	2	2	3	14
3	2	3	2	4	3	113
4	1	1	2	4	13	6
5	2	3	4	4	3	60
6	2	2	2	2	3	5
7	2	3	5	4	3	14
8	1	1	7	3	13	4
9	1	1	6	4	13	2
10	4	4	3	4	12	
11	3	3	4	4	3	8
12	4	4	3	5	12	57
13	1	1	1	4	13	24
14	1	5	8	4	13	1
15	5	1	1	4	13	1
16	4	6	9	4	12	1
17	1	3	1	4	13	1
18	1	1	2	1	13	1
19	4	4	10	5	12	1
20	1	1	8	4	13	3
21	4	4	11	5	12	6
22	2	7	2	2	3	4
23	2	3	12	4	3	29
24	2	3	13	4	3	2
25	6	4	3	5	12	4
26	1	1	5	4	13	3
27	4	4	14	5	12	4
28	2	1	7	3	13	
29	2	8	2	4	3	1
30	2	3	15	4	3	
31	2	3	16	4	3	
32	1	9	2	4	13	1
33	4	4	3	6	12	2
34	4	4	17	5	12	1
35*	7	3	2	4		

4. Průběh onemocnění u včely medonosné (*Apis mellifera*)

Hniloba včelího plodu je nemoc napadající striktně trávicí trubici larev (Takamatsu, Sato a Yoshiyama 2016). Bakterie se do těla larev dostává s kontaminovanou potravou. Usadí se v mesenteronu (středním střevě), kde se začne masivně množit (Forsgren 2009). Roste mezi peritrofickou matrix a potravou, jež se ve střevě nachází, a postupně začne vyplňovat skoro celou střevní dutinu. Růst se zastaví, pokud dojde k úmrtí larvy (Tarr 1938, Bailey 1961). Nakažené larvy rostou pomaleji patrně kvůli nedostatku živin vstřebaných přes střevo na úkor zvětšování bakteriální kolonie v mesenteronu (Bailey 1960). U těch nejvíce nakažených lze pozorovat degeneraci střevního epitelu a rozpad peritrofické matrix, nedochází ale k aktivnímu vycestování buněk *M. plutonius* mimo střevní dutinu a napadání tělních tkání (Tarr 1938, Takamatsu, Sato a Yoshiyama 2016).

Běžně dochází ke smrti u čtyř až pět dní starých larev. Ty přestávají být ve své typicky stočené pozici, ale jsou buď natažené podélně nebo omotané podél stěn své trubčiči či dělničiči buňky, začnou měnit barvu z perleťové bílé na světle žlutou, ztrácejí vnitřní tlak a jeví se jako seschlé nebo zvadlé, spolu s tím přestávají být viditelně segmentované, a dále přecházejí ze žluté barvy až na hnědou, přičemž se rozpadají a vytvoří polotekutou hmotu na dně buňky (viz Obrázek 3) (Forsgren et al. 2013, OIE 2016).

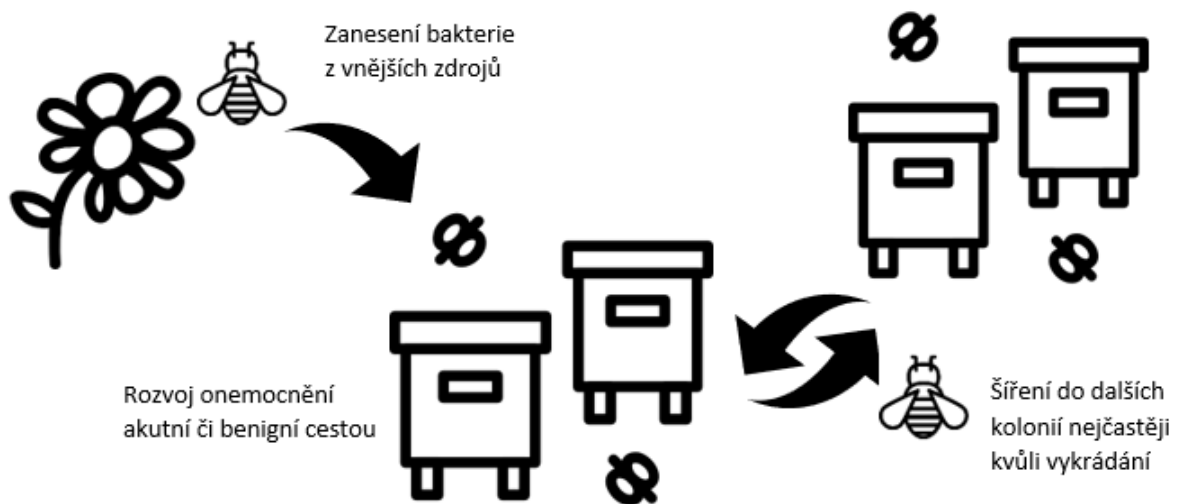
V tomto stádiu se z nich může *M. plutonius* uvolnit a potenciálně být roznesen dospělými včelami

(viz Obrázek 4), které se snaží buňku od zbytků larvy vyčistit (Bailey 1961). Stává se ale také,



Obrázek 3: Napadené larvy v různém stádiu onemocnění; ztráta perleťové bílé barvy a vnitřního tlaku (nahore), progresivní barevná změna až do fáze seschlé šedočerné šupiny (dole). Autoři: Forsgren et al. (2013).

že počkají a nechají larvu seschnout, z té se nakonec stane šedočerná měkká šupina, jež se dá snadno odstranit. V tomto případě je v ní *M. plutonius* uzavřen a odstraněn se šupinou. Smrt nastává jeden až dva dny před tím, než by byly larvy zavíčkované, případně krátce poté, ale vždy před stádiem kukly (Bailey 1961, Forsgren et al. 2013, OIE 2016). Závisí však na době, kdy k infekci došlo – pokud se larva nakazí záhy po vylíhnutí, velmi rychle zemře nebo jí odstraní dospělci. Ty, které se nakazí později, nemusí být nemocí tolik zasaženy, poněvadž se v nich bakterie nestihne rozrůst. Oproti nezasaženým jsou sice menší a vytvoří si tenčí kokon (kvůli ztrátě živin na úkor patogena), ale mohou kompletně prodělat přeměnu v dospěléce (Bailey 1961). Takové potom vyloučí velké množství *M. plutonius* spolu s výkaly, čímž napomáhají šíření nemoci kolonií, poněvadž *M. plutonius* je schopen v tamních podmínkách přežít i několik let (Bailey 1960).



Obrázek 4: Schéma introdukce a šíření bakterie v rámci jednoho a více včelstev. Autor: Blanka Navrátilová

Standardně jsou dělnice schopné nakažené larvy rychle rozpoznat a z plástu je odstranit (Bailey 1960). Vytvoří se tak nepravidelný vzor známý jako „pepper pot“, čili pepřenka, běžně označován jako mezerovitost plodu: zavíčkované a nezavíčkované buňky jsou náhodně rozmístěné po odstranění infikovaných larev (Forsgren et al. 2013). Efektivita čistícího procesu závisí na dostupnosti potravy a velikosti kolonie – když je potravy málo, jsou primárně odstraňováni nakažení jedinci, poněvadž by spotřebovávali nejvíce jídla (Bailey 1960). Dostatek potravy má kolonie tehdy, kdy roste pomalu a poměr dělnic vůči larvám je vyšší než obvykle. Potom se i ty nakažené buď dovyvinou, ačkoliv podvyživené, až do stádia dospěléce, nebo alespoň do stádia předkukly, kdy už jsou zavíčkované, nicméně před zakuklením vylučují spolu s výkaly velké množství *M. plutonius* do buňky (Bailey 1959, 1960). Ač jsou tedy larvy krmeny dostatečně, neznamená to, že nakonec nezemřou (McKee, Goodman a Hornitzky

2004). Pokud je kolonie příliš malá, jakýkoliv pokus o vychování potomstva vede k velikým ztrátám. K vymření celé kolonie dochází tehdy, kdy se nákaza díky nadbytku potravy rozvine natolik, že zabije naprostou většinu larev, nebo se včelstvo doslova zadusí rozkládajícími se těly. Obecně se dá říct, že čím větší kolonie je, tím má větší počet dělnic na odstraňování napadených larev a čištění plástů. Velmi efektivní jsou dělnice v druhé polovině léta, kdy už si navíc i schraňují potravu pro sebe kvůli přezimování, tudíž nedávají všechnu larvám. Takto jsou schopny udržet množství bakterie pod kontrolou (Bailey 1961).

Larvy umírají vždycky kvůli působení *M. plutonius*, až poté je napadají sekundární bakterie (Tarr 1938). Navzdory tomuto zjištění ze 30. let se však po několik dalších desetiletí věřilo, že hnilobu včelího plodu způsobuje *M. plutonius* v kombinaci s *A. eurydice*, bakterií velmi blízce s nemocí asociovanou (Bailey 1957a).

5. Doprovodné bakterie

Pravého původce hniloby včelího plodu bylo po mnoho let velmi obtížné identifikovat právě z důvodu, že napadené larvy jsou zpravidla osidlovány sekundárními bakteriemi. Ty byly s *M. plutonius* po dlouhá léta považovány za spolupůvodce onemocnění (Bailey 1957a, 1957b). Až po pokusech o vyvolání nákazy pomocí jednotlivých bakteriálních druhů se prokázalo, že za hnilobu včelího plodu je zodpovědný pouze *M. plutonius* a ostatní jsou s nemocí pouze blízce spjaty (Bailey 1963). Jejich role a případný mechanismus v rozvoji onemocnění jsou zatím dodnes neobjasněny (Forsgren et al. 2013). V posledních letech se navíc ukazuje, že jich je s onemocněním asociováno více (Gaggia et al. 2015), níže jsou uvedeny ty, jež jsou zmiňovány nejdéle (Tarr 1938; Bailey 1957b, 1963).

5.1 *Achromobacter eurydice*

Po mnoho let byl považován za spolupůvodce onemocnění, poněvadž se vždy vyskytoval v napadených larvách spolu s *M. plutonius* a nedařilo se vyvolat infekci čistou kulturou ani jednoho z nich (Bailey 1956). Má údajně dokonce obdobné nároky na kultivaci, především se podobají ve faktorech, které růstu zamezují (Bailey 1957b). Pokud jsou bakterie kultivovány společně v uzavřených aerobních podmínkách, dokáže *A. eurydice* snížit svým metabolismem hladinu kyslíku natolik, že umožní růst *M. plutonius*, naopak *M. plutonius* snižuje rezistenci střeva dostatečně pro vývoj *A. eurydice* a společně potom dokážou narušit obranyschopnost střeva tak, aby se v něm mohly uchytit i další sekundární bakterie (Bailey 1963). Běžně se vyskytuje i ve zdravých larvách, jeho počty však narostou během průběhu nákazy (Forsgren

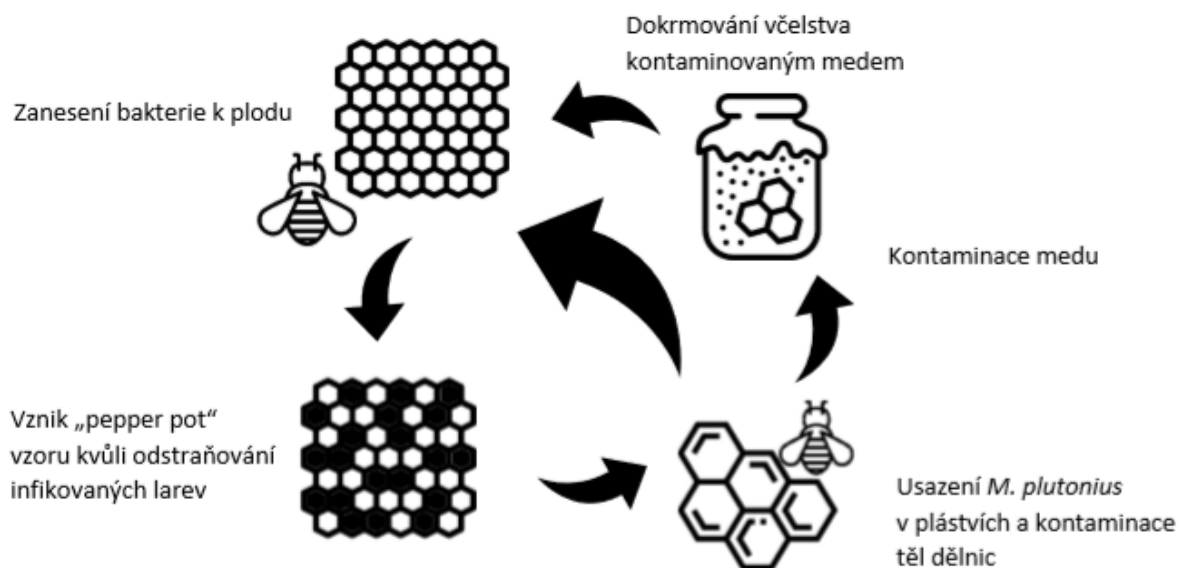
2010). V Austrálii ale asociován se včelami běžně není, tudíž je to patrně trend typický pro severní polokouli (Djordjevic et al. 1998). Vyskytuje se v trávicích traktech jak *A. mellifera*, tak *A. cerana* (Bailey 1974). Jelikož se této bakterii od 60. let nevěnovala velká pozornost, zůstává o ní spousta informací neznámá. Dokonce se spekuluje, jestli v některých dřívějších pozorováních nebyla zaměněna za *Lactobacillus kunkeei*. Její evidované kmeny byly podle genu 16S rRNA překlasifikovány na rod *Kurthia*, takže v současnosti patrně neexistuje žádný referenční kmen. Biologie tohoto mikroorganismu tak přetrvává neobjasněná včetně jejího vztahu k hnilobě včelího plodu (Erler et al. 2018).

5.2 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis je typickým příkladem bakterie sekundárně napadající larvy nakažené hnilobou včelího plodu a často znemožňuje kultivaci samotného *M. plutonius* z infikovaného materiálu (Djordjevic et al. 1998). Fylogeneticky je *M. plutonius* rodu *Enterococcus* blíže příbuzný (Cai a Collins 1994). Ve vysokých dávkách může být *E. faecalis* pro larvy patogenní, ale zdaleka není tak nebezpečný jako *M. plutonius* - nakažené larvy dospělci rychle identifikují a odstraní, nebo larvy projdou celým procesem metamorfózy naprosto nezasazené a bakterie vymizí. Hojně roste na jedincích napadených *M. plutonius* a může si udržovat stálou populaci v chronicky nakažených koloniích (Bailey 1963).

5.3 *Paenibacillus alvei*

Tato bakterie je aerobní, tudíž nedokáže žít ve střevní dutině larev. Roste jako saprofyt na mrtvých larvách a v chronicky zamořených koloniích se může ustálit (Bailey 1963). Tvoří velmi odolné spory (Bailey 1963), jež se charakteristicky formují do řad vedle sebe (Alippi 1991) a jejichž stěny lze barvit 0,2% roztokem karbolfuchsinu (Hornitzky a Wilson 1989). Tyto spory se objevují rychle a navzdory tomu, že to vypadá, jako by bakterie zmizela kvůli ostatním saprofytům, počet jejích spor vysoce převyšuje počty zbylých bakteriálních organismů (OIE 2008). Ačkoliv se většinou v nakažených koloniích vyskytuje častěji než třeba *E. faecalis* a dokonce nemoci propůjčuje její charakteristický zatuchlý zápach, nedá se jeho přítomnost využít jako spolehlivý indikátor infekce, poněvadž jeho přítomnost není podmínkou (OIE 2008) a u některých případů s atypickými příznaky nebyl vůbec objeven (Gaggia et al. 2015).



Obrázek 5: Schéma přenosu bakterie z dospělců na larvy přímým kontaktem či pomocí medu, jímž se larvy živí. Autor: Blanka Navrátilová

6. Možné rezervoáry onemocnění

Hniloba včelího plodu je rozšířena celosvětově (Forsgren 2010). Onemocnění je dlouhodobým problémem v zemích jako např. Anglie, Wales, Austrálie a Švýcarsko (Waite, Brown, et al. 2003; McKee 2003; Roetschi et al. 2008), v některých částech světa (př. Nový Zéland) se naproti tomu neobjevuje vůbec (Djordjevic et al. 1999), je tedy možné, že existují i veliká území, na nichž se patogen nevyskytuje (Belloy et al. 2007). *M. plutonius* se vyznačuje schopností přežít dlouhá období mimo těla larev, zůstává životaschopný a potenciálně infekční v jejich výkalech (Bailey 1959). Hojně se vyskytuje v dospělcích, především v těch, kteří se starají o potomstvo (Roetschi et al. 2008), ale lze ho nalézt v podstatě na všech částech těla všech dospělců v kolonii, v medu i pylu schraňovaném nakaženou kolonií. V koloniích bez příznaků se bakterie může vyskytovat především v medu a v trávicích traktech larev i dospělců. Díky přítomnosti v medu, jímž se larvy živí, dochází k opětovné infekci nové populace, ze které se bakterie může šířit na dospěléce a z nich na trubčí a dělníci buňky (viz Obrázek 5) (McKee et al. 2003a). Takto může zůstat nemoc enzootická po léta (OIE 2008, Erban et al. 2017). Do té doby zůstává benigní (Forsgren et al. 2018) a pravděpodobně i nepovšimnutá, poněvadž nezpůsobuje žádné zásadní ztráty (Bailey 1961). Propuknutí samotné se pak patrně odvíjí od narušení určité rovnováhy, jež v kolonii do té doby panuje. Přeživší larvy vylučují bakterie do pláství, které se snaží dospělci vyčistit. Díky tomu se nakazí jen velmi malý počet larev, a ty jsou efektivně odstraňovány. Tato rovnováha může být podlomena stresovými podmínkami, jako jsou nedostatek vody či potravy, ale může také záviset i na lokálních

klimatických (Bailey 1961) a jiných, neznámých faktorech popisujících dané území výskytu. Bailey a Locher (1968) pozorovali, že když jsou infikované kolonie přesunuty do oblasti, kde se hniloba včelího plodu nikdy nevyskytla, spontánně se uzdraví a následující rok nejeví žádné známky nemoci. Jednotlivé sekvenční typy klonálních komplexů se také vyskytují pouze na určitých územích, přesné důvody však ještě nejsou určeny (Budge et al. 2014).

7. Způsoby detekce *M. plutonius*

Vzhledem k závažnosti onemocnění a faktu, že dosud nebyla vyvinutá dostatečně kvalitní léčebná metoda, je včasná detekce klíčovým faktorem pro záchranu kolonií před zničením a před nechtěným roznesením nákazy na další stanoviště. Vezmeme-li v potaz, že *M. plutonius* dokáže přežívat velmi dlouhé časové úseky mimo hostitelské prostředí (Bailey 1959), ale třeba i v medu (McKee et al. 2003a), je žádoucí, aby detekční metoda byla dostatečně citlivá ať už kvůli spolehlivé diagnóze nebo aby prokázala čistotu produktu kvůli exportním účelům (Hornitzky a Smith 1998; McKee et al. 2003a). Testování nakažených larev však může být zkresleno přítomností dalších, sekundárně invadujících bakterií, jež poměrně často infekci doprovázejí a ztěžují tak určení diagnózy (Alippi 1991). Správná diagnóza je ale klíčová, poněvadž na jejím základě se aplikují příslušné léčebné postupy. Pokročilá hniloba včelího plodu může mít velmi podobné příznaky moru včelího plodu, léčba je však odlišná. Z toho důvodu je detekce a následná diagnóza zásadní (Hornitzky a Wilson 1989). V současnosti existuje několik metod jak laboratorních, tak terénních – od prostých prohlídek až po užití nanotechnologií.

7.1 Pozorování a prohlídky včelstev

Prohlížení včelstev by obecně mělo patřit k základním standardům jakožto naprosto esenciální složka péče nejen kvůli EFB, ale kvůli veškerým nakažám, kterými mohou včely trpět. V případě hniloby včelího plodu se primárně pozoruje nepravidelné rozmístění zavíčkovaných larev v plástu (mezerovitý plod) vzniklé odstraňováním nakažených jedinců dospělci a smrt larev krátce před tím, než mají být zavíčkovány (Forsgren et al. 2013; OIE 2016). Pokud se vyskytne podezření, že propukla nákaza, může včelař sám odebrat vzorky těch, které se zdají být napadené, umístit je na podložní sklo a tady je např. pomocí sirky rozmělnit. Směs se rozetře po skle, aby na něm byla vrstva mléčné tekutiny a zbytek se smete pryč. Takto vytvořený roztěr se nechá na vzduchu uschnout, načež je odeslán do laboratoře, kde dojde k tepelné fixaci a barvení 0,2% karbolfuchsinem. Pomocí mikroskopické examinace je pak *M. plutonius* snadno

rozeznán, poněvadž se rovnoměrně obarví celá buňka. Z obarveného roztěru lze navíc stále odebrat materiál pro kultivaci (Hornitzky a Wilson 1989). Podle české legislativy se prohlídky včelstev provádějí v souladu s § 12 vyhlášky č. 18/2018 Sb. Na základě klinického posouzení v nahlášených případech provede bakteriologické vyšetření plástů v rozsahu určeném krajskou veterinární správou Státní veterinární správy. Když se nákaza potvrdí, je provedeno jedno vyšetření všech včelstev v ochranných pásmech kolem ohniska onemocnění během 12 měsíců od likvidace nemocných včelstev. Tyto úkony jsou povinné a hrazené ze státního rozpočtu (Opatření obecné povahy, č. j. 63193/2017-MZE – 17210 [online]).

7.2 Kultivace *M. plutonius*

První laboratorní metodou, která se pokoušela o prokázání přítomnosti *M. plutonius* v larvách, byla kultivace z mrtvých napadených jedinců. Poměrně brzy se ale zjistilo, že je velmi náročná kvůli speciálním požadavkům bakterie na živné médium a kvůli rozlišení od doprovodných bakterií (Bailey 1957a). Nicméně se podařilo vyvinout médium, na kterém *M. plutonius* rostl (Bailey 1957a; Bailey a Collins 1982b). Dalším problémem se ukázala být různá životnost kolonií v závislosti na materiálu, ze kterého byly izolovány. Ta byla mnohem vyšší, šlo-li o roztěry obsahu mesenteronu (středního střeva) ve srovnání s buňkami, jež zůstaly v šupinách z mrtvých larev. Životnost vypěstovaných isolátů *M. plutonius* z mesenteronu byla však alespoň 15 měsíců, což vysoce převyšovalo životnost ostatních bakterií nalezených ve vzorku (Bailey 1959). záhy se ale začaly objevovat kultury s nižšími nároky na kultivační podmínky a méně příbuzné na sérologické úrovni (Bailey 1985). Standardně se v kultuře objeví kolonie během dvou až tří dní (Bailey 1957a). Závažné problémy nastaly v momentě, kdy byla snaha vypěstovat bakterii přímo ze vzorků medu. Kultivace se ukázala pro tento účel extrémně nevhodná, poněvadž se při ní projevilo méně než 0,2 % mikroskopicky detekovatelných životaschopných organismů *M. plutonius* (Hornitzky a Smith 1998).

7.3 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Diagnóza na základě mikroskopie vyžaduje rozpoznání alespoň jedné buňky *M. plutonius* v pozorovaném poli, což znamená, že počet buněk ve vzorku musí být velmi vysoký (Pinnock a Featherstone 1984). Vzhledem k tomu, že jednoznačný určovací postup byl stanoven až ke konci 80. let Hornitzkym (1989), přistoupilo se k vývoji imunologické metody, která je jak detekční, tak kvantifikační a oproti mikroskopii má nižší nároky na koncentraci bakterie ve vzorku (Pinnock a Featherstone 1984). Díky potvrzené sérologické příbuznosti kmenů z odlišných geografických podmínek (Bailey a Gibbs 1962) bylo možné vyvinout protilátky

z dostupných napadených larev a ty použít pro testování. Výsledky ukázaly mimo jiné přítomnost *M. plutonius* ve zdánlivě zdravých koloniích, přičemž dospělci hledající potravu obsahovaly bakterii nejvíce. ELISA se tedy stala přesnou a rychlou metodou pro diagnostiku a otevřela dveře kontrolním měřením. Zároveň se díky ní zrodila myšlenka, že včely cestující z úlu mohou sloužit jako vektory onemocnění (Pinnock a Featherstone 1984).

7.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je běžně využívaným způsobem k detekci hledaného daného úseku DNA či RNA. V tomto případě se podařilo najít gen, který spolehlivě identifikuje *M. plutonius* ve smíšeném vzorku genetické informace. Jde o oblast genu 16S rRNA, jež se amplifikuje pouze za přítomnosti genomu *M. plutonius*, ale při změněné teplotě i fylogeneticky příbuzného druhu *Enterococcus faecalis*. Fragmenty jsou poté rozštěpeny restriční endonukleázou. Výsledkem štěpení jsou různé dlouhé úseky, jež lze rozdělit pomocí elektroforézy, přičemž ty z genomu *M. plutonius* mají specifickou délku a jsou již nezaměnitelné s těmi pocházejícími od *E. faecalis*. Jsou potom použity pro další PCR reakci, pro níž je použita jiná kombinace primerů než v prvním kroku (hemi-nesting). Takto je možné detekovat 1–10 buněk na mililitr vzorku přímo z larev *A. mellifera* (Djordjevic et al. 1998). Odhalit přítomnost *M. plutonius* pomocí polymerázové řetězové reakce je možné nejen ze vzorků larev, ale i z medu, pylu, pláství a různých tkání dospělých včel. Oproti kultivaci je totiž mnohem citlivější. Hlavní rozdíl přitom tvoří výsledky až z druhého kroku (generace) reakce, poněvadž především v medu se bakterie vyskytuje pouze v malých koncentracích a kultivace je tedy ve valné většině případů negativní. Díky osekvenování genomů dalších příbuzných bakterií z rodu *Enterococci* se také potvrdilo, že fragment vzniklý štěpením produktu z první generace polymerázové řetězové reakce je opravdu specifický čistě pro *M. plutonius*, tudíž nemůže dojít k záměně za jiného patogena (McKee et al. 2003a). V současnosti je možné dokonce provádět tzv. multiplex PCR, což vede k detekci ne jednoho, ale několika hledaných úseků DNA různých patogenů zároveň. Testování se dá provádět přímo ze vzorků larev a dospělých včel, aniž by mu předcházela mikrobiologická kultivace (Garrido-Bailón et al. 2013). Jedinou nevýhodou tohoto typu řetězové reakce je, že nedokáže rozlišit mezi živými a neživými buňkami, pouze indikuje přítomnost bakterie (Hornitzky a Smith 1998).

Tabulka 3: Přehled primerů a podmínek pro hemi-nested PCR. Zdroj: upraveno, autoři Djordjevic et al. (1998).

autor	primer	sekvence		
Djordjevic et al.	MP1	5' CTT TGA ACG CCT TAG AGA 3'		
	MP2	5' ATC ATC TGT CCC ACC TTA 3'		
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů
	počáteční denaturace	95 °C	2 min.	40
	denaturace	95 °C	30 s	
	annealing	61 °C	15 s	
	extenze	72 °C	60 s	
	finální elongace	72 °C	5 min.	
	MP1	5' CTT TGA ACG CCT TAG AGA 3'		
	MP3	5' TTA ACC TCG CGG TCT TGC GTC TCT C 3'		
	počáteční denaturace	95 °C	2 min.	40
	denaturace	95 °C	30 s	
	annealing	56 °C	15 s	
	extenze	72 °C	60 s	
	finální elongace	72 °C	5 min.	

7.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR, real-time PCR)

Na rozdíl od výše popsané dokáže kvantitativní polymerázová řetězová reakce stanovit počet životaschopných buněk *M. plutonius* ve zkoumaném vzorku. Dá se tak tedy určit, jestli jsou všechny části úlu a jedinci v něm srovnatelně promořeni. Ukázalo se, že dělnice pohybující se především u česna (tj. „hlavní vchod“ do úlu) nesou dvacetkrát méně kolonií tvořících jednotek [KTJ] *M. plutonius* než ty, které se vyskytují u plodiště. Klinické příznaky nákazy hnilobou se začínají projevovat při překročení hranice 50 000 KTJ na jedince. Kvantitativní analýza je tedy vhodným prostředkem k monitoringu, poněvadž dokáže odhalit přítomnost bakterie ještě před tím, než se nákaza začne projevovat, přičemž vhodnější jsou pro tento účel právě ty dělnice, jež se vyskytují u plodiště (Roetschi et al. 2008). Ani dlouhodobé testování ale neumožňuje předvídat vypuknutí nákazy potažmo zredukovat počet vizuálních prohlídek pověřenými inspektory, protože PCR detekuje DNA i mrtvých buněk, dokud nedojde k její degradaci. Množství amplifikované DNA tudíž nutně nemusí korelovat s množstvím infekčních bakterií a stejně tak silně pozitivní vzorek nemusí značit akutní nákazu (Grangier et al. 2016). Tabulka 4 demonstruje hned několik variant této reakce.

7.6 NGP (nanočástice zlata)

Tato nová chromatografická metoda byla vyvinuta za účelem snížení pracovní a časové náročnosti, kterou obnáší PCR. Jedná se o užití zlatých nanočástic, jež se nahromadí v místě, kde vyvinuté specifické DNA sondy najdou svůj protějšek v testovaném vzorku DNA. V případě pozitivního vzorku na *M. plutonius* agregace nanočástic způsobí jeho barevnou změnu viditelnou pouhým okem. Ačkoliv je oproti PCR desetkrát méně citlivý, za vhodných podmínek se dá tento způsob detekce považovat za stejně spolehlivý. Jednou z hlavních výhod je, že nevyžaduje zmnožení žádné DNA a dá se tedy provádět bezprostředně po její extrakci ze zkoumaného materiálu. Další výhodou je, že cílové sekvence není nutné fluorescenčně, ani jinak značit, k barevné změně dojde pouze na základě agregace nanočástic (Saleh et al. 2012). Otázkou zůstává, zdali jsou vyvinuté DNA sondy dostatečně specifické a jestli je metoda dostatečně průkazná i při použití rutinní extrakce DNA (Takamatsu 2012).

7.7 Lateral flow test

Jedná se o test, který principiálně funguje stejně jako například běžný těhotenský test. Pro detekci hniloby včelího plodu byl vyvíjen od roku 2003 (Waite, Thompson, et al. 2003). Podařilo se vyvinout specifickou monoklonální protilátku, jež reaguje pouze na přítomnost *M. plutonius*, tedy neprokázalo se, že by vykazovala reaktivitu s jakýmkoliv jiným včelím patogenem. Zároveň test v podstatě nemá falešně pozitivní výsledky. Přesnost této detekční metody se pohybuje mezi 96–100 % a to jak v laboratoři, tak při užití v terénu, a výsledek je znám maximálně do dvaceti minut. Z těchto důvodů je hojně používán ve Velké Británii pro rutinní kontrolní i diagnostické prohlídky (Tomkies et al. 2009). Vzhledem k tomu, že bakterie se může vyskytovat i v koloniích, které nevykazují žádné symptomy nákazy a mohou jí přenášet dospělci (Belloy et al. 2007), může tento test sloužit k odhalování latentních infekcí (Tomkies et al. 2009). Problémem je, že byl vyvinut podle evropského (typického) kmene, není však schopen spolehlivě detekovat kmeny atypické hlášené např. z Japonska (Takamatsu et al. 2012).

Tabulka 4: Přehled primerů a podmínek ke qPCR a k PCR využívanému jako detekční metodě v České republice. Zdroj: upraveno, autoři Budge et al. (2010); Roetschi et al. (2008); Certifikovaná metodika [online], autoři Erban et al. (2017).

autor	primer	sekvence		
Budge et al.	EFBFor	TGT TGT TAG AGA AGA ATA GGG GAA		
	EFBRev2	CGT GGC TTT CTG GTT AGA		
	EFBProbe	FAM - AGA GTA ACT GTT TTC CTC GTG ACG GT - TAMRA		
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů
	denaturace	95 °C	10 min.	
	annealing	60 °C	1 min.	40
	extenze	95 °C	15 s	
autor	primer	sekvence		
Roetschi et al.	MelissoF	5' CAG CTA GTC GGT TTG GTT CC 3'		
	MelissoR	5' TTG GCT GTA GAT AGA ATT GAC AAT 3'		
	Taqman® MBG probe	6' FAM-CTTGGTTGGTCGTTGACMBGNFQ 3'		
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů
	denaturace	50 °C	2 min.	
	annealing	95 °C	10 min.	
	elongace	95 °C	15 s	40
finální elongace	60 °C	1 min.		
autor	primer	sekvence		
Erban et al.	EFB-F	5' GAA GAG GAG TTA AAA GGC GC 3'		
	EFB-R	5' TTA TCT CTA AGG CGT TCA AAG G 3'		
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů
	počáteční denaturace	95 °C	1 min.	
	denaturace	93 °C	1 min.	30
	annealing	55 °C	30 s	
	extenze	72 °C	1 min.	
	finální elongace	72 °C	5 min.	
	primer	sekvence		
	27Fmod	5' AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'		
	ill519Rmod	5' GTN TTA CNG CGG CKG CTG 3'		
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů
	počáteční denaturace	94 °C	3 min.	
	denaturace	94 °C	30 s	28
annealing	53 °C	40 s		
extenze	72 °C	1 min.		
finální elongace	72 °C	5 min.		

8. Léčba

Léčebné postupy se liší v různých státech na základě jejich legislativy. Ve Velké Británii dochází k vyhodnocování, zdali má kolonie naději na uzdravení. Rozhodujícím faktorem je míra promořenosti a velikost kolonie. Pokud kolonie vykazuje klinické příznaky u více než 50 % veškerých larev nebo pokud je menší než šest rámků, je celá zničena (Waite, Brown, et al. 2003). Ve Švýcarsku, kde je zakázáno užívat k léčbě antibiotika a incidence se od roku 1999 stále rapidně zvyšuje, podléhá EFB přísným nařízením, podle kterých se kolonie infikované nebo zdravé, ale slabé a v rámci infikovaného včelína, musí zlikvidovat (Roetschi et al. 2008). V České republice je léčba ze zákona zakázána (§ 5 odst. 3 z. č. 166/1999 Sb.). Efektivní a úspěšná léčba by měla včelstvo nejen zbavit akutních projevů nemoci, ale v ideálním případě i odstranit z úlů bakterie, které by mohly v následujících letech opět zavinit propuknutí nákazy.

8.1 Antibiotika

Jako poměrně logickým nástrojem k léčbě byly antibiotika. Bailey (1965) prokázal na testech *in vitro*, že *M. plutonius* je k určitým antibiotikům citlivý, konkrétně šlo o oxytetracyklin (Terramycin), streptomycin a penicilin. Při vhodném dávkování viditelné projevy nemoci poměrně rychle odezněly. V *in vitro* testech zjistil, že tato antibiotika zamezují růstu bakterie. Vhodné koncentrace byly naměřeny pro oxytetracyklin v rozmezí $10^{-5} - 10^{-7}$, pro streptomycin $10^{-4} - 10^{-6}$ a pro penicilin $10^{-7} - 10^{-9}$. Nicméně penicilin se ukázal pro léčbu nevhodný kvůli svým chemickým vlastnostem – v přirozeném pH potravy a medu larev se velmi rychle rozpadá. Ještě větší citlivost než k oxytetracyklinu a streptomycinu byla pozorována u erythromycinu. Ten stejně jako ostatní potlačuje růst bakterie, ale navíc nejevil známky snižující se efektivity (Bailey 1965). Společně s oxytetracyklinem jsou užívány například v USA, pokud je jim však vystaven dlouhodobě člověk, mohou mít teratogenní a jiné patogenní účinky. Erythromycin navíc může přímo způsobovat dýchací a trávicí obtíže. Alternativou by mohly být ampicilin nebo amoxicilin, antibiotika hojně a dlouho využívaná ve veterinářství i v medicíně. Jejich vliv na člověka je tedy dobře znám, u citlivých jedinců mohou způsobit alergickou reakci. V *in vitro* testech jevíly velmi vysokou účinnost proti *M. plutonius*, bylo by tedy přínosné ověřit jejich efektivitu v infikovaných koloniích a prověřit, zdali vůči nim *M. plutonius* nezačne být rezistentní (Doughty, Goodman a Luck 2004). V České republice se nicméně antibiotika užívat nesmějí (§ 5 z. č. 166/1999 Sb.).

Antibiotika ale nezabraňují návratu onemocnění v následujících sezónách. Navzdory léčbě, která byla hojně používána např. ve Švýcarsku během šedesátých let, nedocházelo ke snižování

výskytu choroby (Roetschi et al. 2008). Další země, která trpí opakovaným výskytem hniloby včelího plodu, je Velká Británie. Tam se k léčbě používá Terramycin (oxytetracyklin, OTC), pokud kolonie splňuje kritéria pro léčbu. Opakovaný výskyt nemoci však vedl k úvaze, že antibiotika patrně nevedou k dostatečnému odstranění bakterií z larev a z trubčích buněk (tj. buňky, kam klade včelí matka vajíčka), čímž se zachovává infekční rezervoár pro následující roky (Waite, Brown, et al. 2003). Tato obava byla již ale zmíněna mnohem dříve. Bailey (1961) publikoval názor, že antibiotika infekci neodstraní, jen ji drží pod kontrolou, a naopak jejich užití může potenciálně zvyšovat počty zbytkových bakterií, poněvadž stěžují dělnicím odstraňování nakažených larev. Nejlepším časem pro nasazení antibiotik se jeví období před vypuknutím choroby, tedy v době, kdy se *M. plutonius* teprve hojně množí, ale nezpůsobuje infekci jako takovou (Bailey 1961). Relativně nedávno však bylo zjištěno, že po dobu celého larválního vývoje včelstva léčená oxytetracyklinem vykazují vyšší mortalitu larev než ta neléčená. To naznačuje, že oxytetracyklin je toxický pro nezavíčkované larvy (Thompson et al. 2005). Naproti tomu ampicilin a amoxicilin společně s uměle vytvořenou potravou byly podávány larvám odebraným z kolonie a pěstovaným v laboratoři a jejich přítomnost neměla na jejich vývoj žádný vliv (Doughty, Goodman a Luck 2004).

8.1.1 Resistance *M. plutonius* vůči antibiotikům

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) oxytetracyklinu (OTC), antibiotika všeobecně používaného k léčbě EFB, nebyla stanovena jednotně ve státech, jež trpí výskytem EFB a tuto koncentraci určovaly. Hodnoty naměřené ve Veliké Británii udaly průměrnou MIC oxytetracyklinu ve výši 3,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Waite, Jackson a Thompson 2003). Hodnoty v Austrálii byly zjištěny poloviční, tedy 1-2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Hornitzky a Smith 1999). To podporuje myšlenku, že mezi faktory zaviňující vypuknutí akutní nákazy jsou geografické a klimatologické podmínky (Bailey 1961). Zatím nebylo prokázáno, že by *M. plutonius* jevil známky vyvíjející se resistance (Waite, Jackson a Thompson 2003; Hornitzky a Smith 1999), ale nedoporučuje se snižovat dávky OTC právě z důvodu, aby k tomu nedošlo (McKee et al. 2003b).

8.2 Shook swarm technika

Shook swarm technika je metoda spočívající v přesunutí roje ze starých, infikovaných rámmů na nové a umístění do nového úlu. Přesunutí jsou dospělci včetně královny, ale potomstvo je spáleno spolu se starým úlem a veškerými zásobami. Tato metoda byla používána ještě před objevem antibiotik. Hlavní výhodou setřesení je, že spálením původního úlu se v podstatě

odstraní veškerý potenciálně infekční materiál, což zásadně snižuje pravděpodobnost opakovaného propuknutí choroby (Waite, Brown, et al. 2003; Thompson a Brown 2001).

8.3 Shook swarm + OTC metoda

Kombinací antibiotik a shook swarm metody je možné téměř zabránit opakované infekci. Kombinace je tedy efektivnější než léčba antibiotiky samotnými. Oxytetracyklin (OTC), antibiotikum běžně užívané k léčbě, má pouze bakteriostatický účinek, tedy brání bakterii v množení, ale nezabije ji – není baktericidní, nezabraňuje tak návratu choroby (Thompson a Brown 2001). Procedura je v první části v zásadě stejná jako klasická shook swarm metoda – na místo původního úlu je umístěn nový, ze starého je vyjmuta královna, následně jsou přemístěni dospělci a po nich je do nového úlu vypuštěna i královna. Veškeré potomstvo, starý úl a zásoby se spálí. Následuje aplikace antibiotik: kolonie je krmena sirupem, který obsahuje antibiotikum. Koncentrace OTC je stejná jako při standardní léčbě pouze antibiotikem. Krmění takovýmto sirupem má dva důvody: důvodem přidání antibiotika je, aby se zajistilo, že případně přenesené bakterie na tělech dospělců jsou vystaveny jeho působení. Sirup samotný potom napomáhá podpořit růst kolonie připravené o veškeré potomstvo, obzvláště pokud jsou pro včely nevhodné podmínky z hlediska počasí (déšť) a není v rozkvětu žádný z jejich hlavních zdrojů potravy. Kolonii je tedy dobré dokrmovat, dokud není opět v plné síle. V takovéto podobě prošla metoda testem ve Velké Británii. Ošetřené kolonie byly znovu kontrolovány po osmi týdnech od aplikace OTC a prohlášeny za vyléčené, pokud nejevily žádné známky nákazy (Waite, Brown, et al. 2003).

Z důvodu spálení veškerého potomstva je třeba brát v potaz, kdy jsou v rozkvětu hlavní zdroje nektaru (tzv. honey flow). Pokud se totiž léčba pomocí SSM + OTC načasuje špatně, hrozí, že celá kolonie vyhyne, poněvadž se nestihne dostatečně zvětšit, než začne zima. Při srovnání se však tato metoda ukázala jako úspěšnější než léčba samotným antibiotikem a SSM jako taková by se měla stát rutinní součástí péče o včelstvo (Waite, Brown, et al. 2003). Zároveň je vhodné omezovat aplikaci antibiotik v rámci profylaxe kvůli jejich zbytkovým koncentracím v medu a kvůli minimalizaci pravděpodobnosti vzniku rezistence (Thompson a Brown 2001). SSM jediné opatření, které se podle švýcarských zákonů smí a doporučuje aplikovat jako léčbu kolonií dostatečně velikých a s pouze slabými klinickými symptomy (Roetschi et al. 2008).

8.4 Alternativní metody

8.4.1 Užití upravených rostlinných produktů

Ač léčba antibiotiky vykazuje jisté výsledky, existuje snaha prokázat, že *M. plutonius* může být kontrolován i jiným způsobem (McKee 2003). Jedním z důvodů budiž fakt, že státy, jejichž legislativa antibiotika zakazuje, jsou vůči nákaze v podstatě bezmocné. Dalším jistě i to, že po své aplikaci zůstávají antibiotika ve včelích produktech, tj. medu a mateří kašičce, detekovatelné po několik týdnů (Matsuka a Nakamura 1990). To, a jistě i všeobecný tlak společnosti na vyvíjení nových technologií šetrnějších k přírodě, vedlo k testování přírodních produktů, zdali se neprokáže jejich bakteriostatický účinek. Jednou z variant by patrně mohlo být užívání extraktů skupiny *Bryophyta*, tedy mechorostů. Organické extrakty z *Marchantia polymorpha*, *Plagiochasma appendiculatum* a *Dicranum undulatum* v *in vitro* testech vykázaly jak bakteriostatickou, tak i baktericidní aktivitu vůči *M. plutonius* srovnatelnou s aktivitou běžně užívaných antibiotik (viz Tabulka 5) (Gahtori, Chaturvedi a Singh 2011).

Další možnou variantou je aplikace esenciálních olejů. Podařilo se prokázat vysokou antibakteriální aktivitu tzv. tea tree oleje – to je esenciální olej získávaný z listů kajeputu střídavolistého (*Melaleuca alternifolia*). Olej samotný vykazoval lepší bakteriostatické účinky než organické extrakty z mechorostů, ještě účinnější jsou však nanočástice, ve kterých je tea tree olej enkapsulován. Jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC), tj. minimální koncentrace, při které látka již prokazatelně působí proti růstu bakterie, byla stanovena na 0,01–0,93 % (viz Tabulka 6). Olejové nanočástice mají navíc tu výhodu, že nepůsobí toxicky na živé včely. Jak tea tree olej samotný, tak nanočástice byly v koncentraci vyšší, než byla jejich MIC, nasprejovány na živé včely, jež pak byly pozorovány po dobu sedmi dní. Ty, na které byl aplikován samotný olej, jevily 80% úmrtnost, zatímco jedinci, na něž byly aplikovány olejové nanočástice, ani po týdnu pozorování nejevily žádné známky intoxikace (Santos et al. 2014).

Tabulka 5: Minimální inhibiční koncentrace (MIC; $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a minimální baktericidní koncentrace (MBC; $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) různých organických extraktů tří zástupců skupiny Bryophyta a ampicillinu jako kontrolního antibiotika vůči M. plutonius. Zdroj: upraveno, autoři Gahtori, Chaturvedi a Singh (2011).

extrakt	<i>M. polymorpha</i>		<i>P. appendiculatum</i>		<i>D. undulatum</i>	
	MIC	MIB	MIC	MIB	MIC	MIB
methanol	2,5	3	2,5	4,5	1,25	2,5
chloroform	-	-	-	-	0,65	1,25
ethanol	1,5	1,5	2,5	4,5	-	-
aceton	1,25	2,5	0,65	1,25	-	-
ampicillin	0,65	0,8	0,65	0,8	0,65	0,8

Tabulka 6: Minimální inhibiční koncentrace tea tree oleje (TTO) a nanočástic obsahujících tea tree olej (nTTO) vyjádřena v procentech; a – atypický kmen, b – typický kmen. Zdroj: Santos et al. (2014).

izolát	MIC [%]	
	TTO	nTTO
<i>M. plutonius</i> DAT561 ^a	6,25	0,93
<i>M. plutonius</i> DAT606 ^b	3,12	0,93

Oba dva tyto postupy byly testovány pouze laboratorně na vypěstovaných kulturách *M. plutonius*, jejich užití v praxi ani jejich účinnost v terénních podmínkách zatím nebyly provedeny ani zkoumány.

8.4.2 Antagonistické bakterie

Ukázalo se, že dospělé včely i larvy přirozeně obsahují specifickou skupinu laktobacilů, jejichž hlavním zdrojem potravy je fruktóza a obsazují proto jen niky na fruktózu bohaté. Jedním z jejich zástupců je *Lactobacillus kunkeei*, který je hojně zastoupen v mikrobiotě larev, ale i pylu a medu shromažďovaném v úlu. Jednotlivé kmeny této bakterie se mírně geneticky odlišují na základě jejich geografického výskytu. V laboratorních podmínkách se ukázalo, že některé kmeny této bakterie působí proti růstu *M. plutonius* a mohly by být zvažovány pro vývoj probiotik (Endo a Salminen 2013). Tuto myšlenku podpořily zvýšené koncentrace *L. kunkeei* v koloniích s klinickými projevy nákazy hnilobou včelího plodu. Společně s ním byly hojněji zastoupeny také *Fructobacillus fructosus*, *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara* a *Bifidobacterium coryneforme*, zástupci kmenů Firmicutes, Proteobacteria a Actinobacteria. Je však třeba mít na paměti, že výskyt některých těchto druhů mohl být umožněn kvůli zeslabené obranyschopnosti a nedostatečné výživě larev a že ne všechny tyto bakterie nemají patogenní účinky (Erban et al. 2017).

Střevní mikrobiota druhu *A. cerana japonica* obsahuje zástupce rodu *Bacillus*, jenž prokazatelně inhiboval růst *M. plutonius*. Jeden z izolátů dokonce snižoval úmrtnost larev *A. mellifera* nakažených hnilobou včelího plodu, pokud jím byly larvy krmeny. Oba pokusy byly provedeny v *in vitro* podmínkách, nicméně popsáný izolát slibuje potenciální využití ve vývoji probiotické léčby (Wu et al. 2014). Je tedy možné, že někteří zástupci přirozené včelí střevní mikrobioty hrají v raných fázích nákazy ochrannou roli jako inhibitoři *M. plutonius* či stimulanty imunitního systému (Erban et al. 2017).

8.5 Kontaminace medu

8.5.1 Odstranění *M. plutonius* z medu

Veškeré popsané léčebné metody jsou aplikovatelné na kolonii samotnou, ale už ne na ošetření medu, ve kterém se bakterie také může velmi často nacházet (Wootton, Hornitzky a Ryland 1981; McKee et al. 2003a). Wootton (1981) tedy provedl testy na pěti vzorcích květového medu lišících se v pH a obsahu vody. Každý ze vzorků medů byl uměle inokulován a následně vystaven různým teplotám od 10 °C až po 80 °C. Při teplotách do 50 °C byla doba nutná pro spolehlivé usmrcení bakterie v řádu dní, pro vyšší teploty se tato doba pohybovala v řádu hodin až desítek minut. Vzhledem k zachování kvality medu, přičemž klíčovými faktory byly barva, obsah hydroxymethylfurfuralu a diastázová aktivita, byly jako nejvhodnější vyhodnoceny teploty 44 °C a 50 °C, kterým více méně odpovídá i teplota, kterou se med během standardního zpracovávání ošetřuje. V teplotách 44 °C a 50 °C byly veškeré buňky *M. plutonius* zničeny po dvou až šesti dnech (Wootton, Hornitzky a Ryland 1981).

Další testovanou variantou bylo vystavení medu gama záření. Buňky *M. plutonius* přestávají být životaschopné po ozáření 1,4 Mrad (=14 kGy) z kobaltu 60. Mortalita byla ověřena pokusem o kultivaci buněk zcentrifugovaných ze vzorků testovaného medu. Neví se však, jaký má ozáření vliv na kvalitu medu samotného (Hornitzky 1982).

8.5.2 Antibiotika v medu

Oxytetracyklin podáván ať už jako profylaxe nebo jako léčba akutních projevů EFB se může vyskytnout v medu a přetrvat detekovatelný 6-8 týdnů po aplikaci (Matsuka a Nakamura 1990), tudíž je nutné ji provést dostatečně včas, než vypukne hlavní honey flow, čili období květu hlavních zdrojů nektaru (Santos et al. 2014) a předešlo se tak těmto zbytkovým koncentracím (Thompson a Brown 2001). Hladina OTC v medu se může lišit na základě formy, v jaké se antibiotikum podává. V tekuté podobě, tj. ve vodném roztoku sacharózy, ve kterém je rozpuštěn 1 g aktivního OTC, zanechává OTC velmi vysoké hladiny ještě 8 týdnů po podání (Thompson et al. 2005). Jsou-li kolonie léčeny kombinací shook swarm metody a OTC, je doporučeno, aby se med stácel 16 týdnů po podání antibiotik v tekuté formě a 18 týdnů po podání ve formě práškové (1 g OTC smíchan s moučkovým cukrem ve hmotnostním poměru 1:2). Standardní doba stáčení přitom byla 56 dní po ošetření. Oxytetracyklin by tedy měl být podáván přibližně půl roku před plánovaným stáčením a jeho použití by se mělo v kombinaci s SSM co nejvíce omezit (Thompson et al. 2006). Zkoumané alternativy, konkrétně ampicilin a amoxicilin, se v medu rozkládají velice rychle a již po 42 dnech nezanechávají v podstatě žádná nebo minimální reziduální koncentrace (Doughty, Goodman a Luck 2004). Kontaminace medu

antibiotiky zabraňuje, aby byl takový med uveden na trh (§ 20 odst. 2 písm. e) z. č. 166/1999 Sb.). V České republice je ze zákona zakázáno hnilobu včelího plodu léčit (§ 5 odst. 3 z. č. 166/1999 Sb.), tudíž v medu, který prokazatelně pochází z území ČR, by se antibiotika vyskytovat neměla.

Na podzim roku 2015 se však na českém trhu objevily medy s prokazatelným množstvím antibiotik. Státní veterinární správa provedla testy medů jak od českých včelařů, tak i těch dostupných v obchodních řetězcích od velkého výrobce. Medy od včelařů byly prokazatelně bez reziduí, zato v těch od výrobce byla zjištěna přítomnost stejného spektra antibiotik jako v medech původem z Ukrajiny. Nevyhovující šarže byly nahlášeny do Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF, jenž slouží pro sdílení informací mezi Evropskou komisí, členskými státy Evropské Unie a EFTA (Island, Lichtenštejnsko a Norsko) a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin), ukrajinský med byl navrácen a medy od výrobce byly staženy z prodeje. Podle Státní veterinární správy konzumace kontaminovaných medů neohrožuje spotřebitele přímo na životě, nicméně se nedoporučuje. Kauza se táhne až do letošního roku (ČTK [online]), během let byly výrobci uděleny milionové pokuty (Státní veterinární správa (b) [online], Informační centrum bezpečnosti potravin [online]).

8.6 Léčba v ČR

V současnosti je dle zákona hnilobu včelího plodu zakázáno léčit (§ 5 odst. 3 z. č. 166/1999 Sb.). Včelaři jsou povinni hlásit krajské veterinární správě stav, kdy dochází k úhynu u více než 25 % včelstev (§ 5 vyhlášky 18/2018 Sb.). V momentě podezření na výskyt EFB je včelař povinen na pokyn příslušné krajské veterinární správy úly na stanovišti označit, označení zdokumentovat, vyhotovit pro krajskou veterinární správu soupis veškerého příslušenství, které mohlo přijít s včelami do styku a provést následná opatření (§ 8 vyhlášky č. 18/2018 Sb.). Jakmile je infekce potvrzena nálezem v úlu a potvrzena laboratorními výsledky, rozhoduje úmrtnost larev v jednotlivých koloniích. Je-li pod 15 %, spálí se tato kolonie a ostatní materiál projde důkladnou desinfekcí, ideálně vyžiháním. V případě, že mortalita přesahuje hranici 15 %, jsou veškerá včelstva v místě nákazy utracena a spálena a veškerý materiál desinfikovaný žehem. Za utracená včelstva a za zničené či zlikvidované zařízení, pomůcky, úly a jejich vybavení se včelaři poskytne náhrada, pokud o ni požádá. Stanoviště napadených včelstev je krajskou veterinární správou vymezeno jako ohnisko nákazy a v okruhu minimálně 3 km se kolem něj zřídí ochranné pásmo. Celá tato oblast podléhá speciálním nařízením ohledně používání produktů z ní, kontrol, přemísťování společenstev apod., ta platí minimálně 6 měsíců

a dále se vyvíjejí podle výsledků nařízených laboratorních vyšetření (§ 8–11, § 13 vyhlášky 18/2018 Sb.).

Závěr

Hniloba včelího plodu je bakteriální onemocnění napadající larvy zástupců rodu včela (*Apis* sp.). Způsobuje ho Gram pozitivní bakterie *Melissococcus plutonius*, která se dostane do těla larev s kontaminovanou potravou. Usadí se v mesenteronu, kde se začne množit a vyplňovat střevní dutinu. V tomto stádiu ještě nemají larvy utvořený řitní otvor, tudíž z nich bakterie neodchází. Bakteriální kolonie pak patrně kompetuje s larvou o živiny, poněvadž zamezuje jejich vstřebávání přes střevo do těla larvy. Není známo, že by *M. plutonius* agresivně proliferoval ze střeva do ostatních tkání, zdá se tedy, že larvu vyhladoví, přesný mechanismus nákazy však není znám.

Ačkoliv je tato choroba rozšířena v podstatě po celém světě, její původce si zachovává velikou genetickou podobnost (okolo 99 %) a jeho známé kmeny tedy členíme do tří klonálních komplexů. Tyto komplexy kopírují genetickou podobnost, ne však geografický areál rozšíření. Zároveň se v rámci komplexů objevují noví zástupci na již zamořených územích. Avšak není objasněno, proč existují velká území, na nichž se bakterie nevyskytuje.

Nákazu doprovází sekundární bakterie, jež jsou buď saprofytické nebo zástupci přirozené včelí mikroflóry, které oportunisticky zneužijí oslabenou obranyschopnost včelích larev. Některé se mohou ustálit v chronicky nakažených koloniích, a dokonce i dotváří charakteristické rysy onemocnění (především zápach), v poslední době se však ukazuje, že druhy sekundárních bakterií se mohou lišit a jejich přítomnost v napadené kolonii není pravidlem. Zároveň nemohou sloužit ani jako spolehlivý indikátor choroby, poněvadž se mohou vyskytovat ve včelstvech přirozeně bez patogenních následků. Role sekundárních bakterií v rozvoji a průběhu onemocnění zůstává taktéž dosud neobjasněna.

Nedořešenou otázkou zůstává i léčba této nemoci. Legislativy každého státu přistupují k současným léčebným postupům jinak, v zásadě jde ale hlavně o povolení užívání antibiotik. V mnoha státech, např. ve Švýcarsku, je však aplikace antibiotik zakázána. V České republice je nelegální jakýkoliv léčebný proces, dochází pouze ke spalování napadených včelstev a infikovaného materiálu. Pro země, jako je Anglie, Wales, Švýcarsko a Austrálie, kde se s hnilobou včelího plodu potýkají dlouhodobě a v zásadě neúspěšně, je otázka kvalitní léčby

naprosto zásadní, stejně tak pro státy, kde se incidence po mnoha letech opět zvyšuje nebo se objevuje nově (Polsko, Norsko). Jednou z cest by mohlo být využití antagonistických bakterií nebo aplikace rostlinných extraktů. Léčebný postup by však neměl ovlivňovat kvalitu včelích produktů, poněvadž kontaminované mnohdy nesmí být uvedeny na trh. Z tohoto důvodu nejsou antibiotika nejvhodnějším řešením. Zároveň také existuje možnost, že pokud se dávky antibiotik sníží, dojde k vyvinutí rezistence.

Je třeba lépe porozumět vztahu mezi *M. plutonius* a včelou medonosnou, abychom byli schopni efektivně vyvíjet nová opatření proti vzniku akutních i chronických nálezů a zamezili tak dalším ztrátám včelstev.

Seznam zkratk

argE, galK, gbpB, purR – geny, pomocí kterých se vytváří alelický profil sekvenčních typů

- argE – acetylornithin deacetyláza
- galK – galaktokináza
- gbpB – putativní sekretovaný antigen
- purR – purinový operonový represor

CC – klonální komplex

ČTK – Česká tisková kancelář

EFB – European foulbrood, hniloba včelího plodu

EFTA – Evropské sdružení volného obchodu

Gy – [gray], odvozená jednotka soustavy SI pro absorbovanou dávku ionizujícího záření

MLST – multilokusová sekvenční typizace

OTC – oxytetracyklin

rad – starší jednotka pro absorbovanou dávku ionizujícího záření mimo jednotky soustavy SI

SSM – shook swarm metoda

ST – sekvenční typ

Definice použitých výrazů

- 16S rRNA gen – gen kódující komponent malé podjednotky prokaryotického ribozomu, který se hojně využívá ke studiu fylogenetických vztahů a taxonomie bakterií (Janda a Abbott 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 (§ 3 odst. 1 písm. c) z. č. 166/1999 Sb.)
- housekeeping geny – geny zodpovědné za základní děje v buňce, jsou neustále exprimovány a jejich struktura je díky tomu velmi konzervativní (Medical Dictionary [online])
- ohnisko nákazy – hospodářství nebo jiné místo, kde byl zjištěn jeden nebo více případů nákazy (§ 3 odst. 1 písm. k) z. č. 166/1999 Sb.)
- ochranné pásmo – okruh nejméně 3 km kolem ohniska nákazy s přihlédnutím k epizootologickým, zeměpisným, biologickým a ekologickým podmínkám (§ 11 odst. 1 písm. a) vyhlášky 18/2018 Sb.)

Seznam použité literatury:

- Alippi A. M. 1991. „Techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina". *Journal of Apicultural Research* 30 (2 1992): 75–80. <https://doi.org/10.1080/00218839.1991.11101237>.
- Allen, M. F., a B. V. Ball. 1993. „The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*". *Journal of Apicultural Research* 32 (2): 80–88.
- Arai, Rie, Kiyoshi Tominaga, Meihua Wu, Masatoshi Okura, Kazutomo Ito, Naomi Okamura, Hidetaka Onishi, et al. 2012. „Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates". *PLoS ONE* 7 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033708>.
- Bailey, Leslie. 1956. „Aetiology of european foul brood; A disease of the larval honey-bee [27]". *Nature*. <https://doi.org/10.1038/1781130a0>.
- . 1957a. „European foul brood: A disease of the larval honeybee (*Apis mellifera* L.) caused by a combination of streptococcus pluton (*Bacillus pluton* white) and *Bacterium eurydice* white [34]". *Nature* 180 (4596): 1214–15. <https://doi.org/10.1038/1801214a0>.
- . 1957b. „The Isolation and Cultural Characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*", č. May 1954: 39–48.
- . 1959. „An Improved Method for the Isolation of *Streptococcus pluton*, and Observations on Its Distribution and Ecology". *Journal of Insect Pathology* 1: 80–85.
- . 1960. „The Epizootiology of European Foulbrood of the Larval Honey Bee, *Apis mellifera* Linnaeus". *Journal of Insect Pathology* 2 (2): 67–83.
- . 1961. „European Foulbrood". *American Bee Journal* 101: 89–92.
- . 1963. „The pathogenicity for honey-bee larvae of microorganisms associated with european foulbrood". *Journal of insect pathology* 5 (2): 198–205.
- . 1965. „The Effect of Erythromycin on *Streptococcus Pluton* (White)". *Journal of Apicultural Research* 4 (2): 101–3. <https://doi.org/10.1080/00218839.1965.11100112>.
- . 1974. „An Unusual Type of *Streptococcus*". *Journal of Invertebrate Pathology* 23: 246–47.
- . 1984. „A strain of *Melissococcus pluton* cultivable on chemically defined media". *FEMS Microbiology Letters* 25 (2–3): 139–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01443.x>.
- . 1985. „*Melissococcus pluton* and European foul brood". *Bee World* 66 (4): 134–36. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1985.11098843>.
- Bailey, Leslie, a M. D. Collins. 1982a. „Reclassification of ‘*Streptococcus pluton*’ (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov." *Journal of Applied Bacteriology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1982.tb04679.x>.
- . 1982b. „Taxonomic studies on ‘*Streptococcus pluton*’". *Journal of Applied Bacteriology* 53: 209–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1982.tb04678.x>.
- Bailey, Leslie, a A. J. Gibbs. 1962. „Cultural Characters of *Streptococcus pluton* and its Differentiation from Associated Enterococci". *Journal of General Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-28-3-385>.
- Bailey, Leslie, a N. Locher. 1968. „Experiments on the etiology of european foul brood of the honeybee". *Journal of Apicultural Research* 7 (2): 103–7. <https://doi.org/10.1080/00218839.1968.11100197>.
- Belloy, Luc, Anton Imdorf, Ingemar Fries, Eva Forsgren, Hélène Berthoud, Rolf Kuhn, a Jean-Daniel Charrière. 2007. „Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood". *Apidologie* 38 (2): 136–40. <https://doi.org/10.1051/apido:2006069>.

- Budge, Giles E., Mark D F Shirley, Benjamin Jones, Emiline Quill, Victoria Tomkies, Edward J. Feil, Mike A. Brown, a Edward G. Haynes. 2014. „Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*". *ISME Journal* 8 (8): 1588–97. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.20>.
- Cai, J., a M. D. Collins. 1994. „Evidence for a Close Phylogenetic Relationship between *Melissococcus pluton*, the Causative Agent of European Foulbrood Disease, and the Genus *Enterococcus*". *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (2): 365–67. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-365>.
- Cox-Foster, Diana. 2007. „A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony". *Science* 318: 283–87. <https://doi.org/10.1126/science.1146498>.
- Djordjevic, Steven Philip, Kerrie Noone, Lisa Annette Smith, a Michael A. Z. Hornitzky. 1998. „Development of a hemi-nested PCR assay for the specific *Melissococcus pluton*". *Journal of Apicultural Research* 37 (3): 165–74.
- Djordjevic, Steven Philip, Lisa Annette Smith, Wendy Ann Forbes, a Michael Alan Hornitzky. 1999. „Geographically diverse Australian isolates of *Melissococcus pluton* exhibit minimal genotypic diversity by restriction endonuclease analysis". *FEMS Microbiology Letters* 173 (2): 311–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00088-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00088-9).
- Doughty, Stephen William, Russell Goodman, a Joanne Luck. 2004. "Evaluating Alternative Antibiotics for Control of European Foulbrood Disease". *Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation*.
- Endo, Akihito, a Seppo Salminen. 2013. „Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria". *Systematic and Applied Microbiology* 36 (6): 444–48. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.06.002>.
- Erban, Tomas, Ondrej Ledvinka, Martin Kamler, Bronislava Hortova, Marta Nesvorna, Jan Tyl, Dalibor Titera, Martin Markovic, a Jan Hubert. 2017. „Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood". *PeerJ* 5: e3816. <https://doi.org/10.7717/peerj.3816>.
- Erler, Silvio, Oleg Lewkowski, Anja Poehlein, a Eva Forsgren. 2018. „The Curious Case of *Achromobacter eurydice*, a Gram-Variable Pleomorphic Bacterium Associated with European Foulbrood Disease in Honeybees". *Microbial Ecology* 75 (1). <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1007-x>.
- Forsgren, Eva. 2009. *Molecular Diagnosis and Characterization of Honey Bee Pathogens. Sciences-New York*.
- . 2010. „European foulbrood in honey bees". *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (SUPPL. 1): S5–9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>.
- Forsgren, Eva, Giles E. Budge, Jean-Daniel Charrière, a Michael A. Z. Hornitzky. 2013. „Standard methods for European foulbrood research". *Journal of Apicultural Research* 52 (1): 1–14. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.12>.
- Forsgren, Eva, Barbara Locke, Fabrice Sircoulomb, a Marc Oliver Schäfer. 2018. „Bacterial Diseases in Honeybees". *Current Clinical Microbiology Reports*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0083-0>.
- Forsgren, Eva, Shi Wei, Ding Guiling, Liu Zhiguang, Toan Van Tran, Phuong Thi Tang, Tuan Anh Truong, Tam Quyet Dinh, a Ingemar Fries. 2015. „Preliminary observations on possible pathogen spill-over from *Apis mellifera* to *Apis cerana*". *Apidologie* 46 (3): 265–75. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0320-3>.
- Gaggia, Francesca, Loredana Baffoni, Verena Stenico, Daniele Alberoni, Enrico Buglione, Andrea Lilli, Diana Di Gioia, a Claudio Porrini. 2015. „Microbial investigation on honey bee larvae showing atypical symptoms of European foulbrood". *Bulletin of Insectology* 68 (2): 321–27.
- Gahtori, Dheeraj, Preeti Chaturvedi, a Shivom Singh. 2011. „Using bryophytes as a tool to

- cure European foulbrood disease of honey bee: An eco-friendly approach". *Current Science* 101 (3): 420–23.
- Garrido-Bailón, Encarna, Mariano Higes, Amparo Martínez-Salvador, Karina Antúnez, Cristina Botías, Aránzazu Meana, Lourdes Prieto, a Raquel Martín-Hernández. 2013. „The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay". *Microbial Biotechnology* 6 (6): 731–39. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12070>.
- Grangier, Valérie, Luc Belloy, Jean-Daniel Charrière, Marcus G Doherr, Albert Fritsche, a Andreas S Waldvogel. 2016. „Real-time PCR as a decision aid in the control of European foulbrood". *Journal of Apicultural Research* 54 (4): 366–72. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1169650>.
- Hansen, Henrik, a Camilla Juul Brødsgaard. 1999. „American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control". *Bee World* 80 (1): 5–23. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099415>.
- Haynes, Edward, Thorunn Helgason, J. Peter W Young, Richard Thwaites, a Giles E. Budge. 2013. „A typing scheme for the honeybee pathogen *Melissococcus plutonius* allows detection of disease transmission events and a study of the distribution of variants". *Environmental Microbiology Reports* 5 (4): 525–29. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12057>.
- Hornitzky, Michael A. Z. 1982. „Use of gamma radiation from cobalt 60 in the control of *Streptococcus pluton* in honey" 21 (2): 126–27. <https://doi.org/10.1080/00218839.1982.11100528>.
- Hornitzky, Michael A. Z., a Lisa Annette Smith. 1998. „Procedures for the Culture of *Melissococcus Pluton* from Diseased Brood and Bulk Honey Samples". *Journal of Apicultural Research* 37 (4): 293–94. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100987>.
- . 1999. „Sensitivity of Australian *Melissococcus pluton* isolates to oxytetracycline hydrochloride". *Australian Journal of Experimental Agriculture* 39 (7): 881–83. <https://doi.org/10.1071/EA99064>.
- Hornitzky, Michael A. Z., a S. C. Wilson. 1989. „A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees". *Journal of Apicultural Research* 28 (4): 191–95. <https://doi.org/10.1080/00218839.1989.11101183>.
- Janda, J. Michael, a Sharon L. Abbott. 2007. „16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls". *Journal of Clinical Microbiology* 45 (9): 2761–64. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>.
- Matsuka, Mitsuo, a Jun Nakamura. 1990. „Oxytetracycline residues in honey and royal jelly". *Journal of Apicultural Research* 29 (2): 112–17. <https://doi.org/10.1080/00218839.1990.11101206>.
- McKee, Ben. 2003. „Prevention of Residues in Honey: A Future Perspective". *Apiacta* 38 (2): 173–77.
- McKee, Ben Alexander, Steven Philip Djordjevic, Russell David Goodman, a Michael Alan Hornitzky. 2003. „The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR". *Apidologie* 34 (1): 19–27. <https://doi.org/10.1051/apido:2002047>.
- McKee, Ben Alexander, Russell David Goodman, a Michael Alan Hornitzky. 2004. „The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*)". *Journal of Apicultural Research* 43 (3): 93–100. <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101117>.
- McKee, Ben, Russell Goodman, Christian Saywell, a Graham Hepworth. 2003. „Oxytetracycline hydrochloride activity in honey bee larvae (*Apis mellifera*) following medication with various doses". *Apidologie*. <https://doi.org/10.1051/apido>.

- Morse, R A. 1989. „History of Subsection Cb: apiculture and social insects". *Bulletin of the Entomological Society of America* 35 (3): 115–19.
- Nakamura, Keiko, Yuko Yamazaki, Akiyo Shiraishi, Sota Kobayashi, Mariko Harada, Mikio Yoshiyama, Makoto Osaki, Masatoshi Okura, a Daisuke Takamatsu. 2016. „Virulence Differences among *Melissococcus plutonius* Strains with Different Genetic Backgrounds in *Apis mellifera* Larvae under an Improved Experimental Condition". *Scientific Reports* 6 (March): 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep33329>.
- OIE. 2008. „European Foulbrood of honey bees". *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*, 405–9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>.
- . 2013. „Apinae introductory note on bee diseases". *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres*, č. May: 2013.
- . 2016. „European foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Melissococcus plutonius*)", 1–4. <https://doi.org/10.15713/ins.mmj.3>.
- . 2017. „Acarapisosis of honey bees (infestation of honey bees with *Acarapis woodi*)". *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 388–94.
- . 2018. „Infestation of honey bees with *Varroa* spp. (varroosis)". *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 10–13.
- Pinnock, D. E., a N. E. Featherstone. 1984. „Detection and quantification of *Melissococcus pluton* infection in honeybee colonies by means of enzyme-linked immunosorbent assay". *Journal of Apicultural Research* 23 (3): 168–70. <https://doi.org/10.1080/00218839.1984.11100627>.
- Roetschi, Alexandra, H el ene Berthoud, Rolf Kuhn, a Anton Imdorf. 2008. „Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation". *Apidologie* 39 (3): 362–71. <https://doi.org/10.1051/apido:200819>.
- Rosenkranz, Peter, Pia Aumeier, a Bettina Ziegelmann. 2010. „Biology and control of *Varroa destructor*". *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S96–119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>.
- Ruttner, F., Lucienne Tassencourt, a J Louveaux. 1978. „Biometrical-statistical analysis of the geographical variability of *Apis mellifera* L." *Apidologie* 9 (4): 363–81. <https://doi.org/10.1051/apido:19780408>.
- Saleh, M., H. Soliman, H. S orum, A. K. Fauske, a M. El-Matbouli. 2012. „Papers: A novel gold nanoparticles-based assay for rapid detection of *Melissococcus plutonius*, the causative agent of European foulbrood". *Veterinary Record* 171 (16): 400. <https://doi.org/10.1136/vr.101040>.
- Santos, Roberto Christ Vianna, Leonardo Quintana Soares Lopes, Camilla Filippi dos Santos Alves, Viviane Pedroso Fausto, Kauana Pizzutti, Victor Barboza, Marcia Ebling de Souza, et al. 2014. „Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents". *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17 (3): 343–47. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.02.003>.
- Singh Rana, Bachitter, Kukkamudi Mohan Rao, Swarup Kumar Chakravarty, a Sapna Katna. 2012. „Characterization of *Melissococcus plutonius* causing European foulbrood disease in *Apis cerana* F." *Journal of Apicultural Research* 51 (4): 306–11. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.4.03>.
- Takamatsu, Daisuke. 2012. „Editorial: Going for gold in the detection of honeybee pathogens". *Veterinary Record* 171 (16): 397. <https://doi.org/10.1136/vr.e6762>.
- Takamatsu, Daisuke, Keiko Morinishi, Rie Arai, Aya Sakamoto, Masatoshi Okura, a Makoto Osaki. 2014. „Typing of *Melissococcus plutonius* isolated from european and japanese honeybees suggests spread of sequence types across borders and between different apis species". *Veterinary Microbiology* 171 (1–2): 221–26.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.036>.

- Takamatsu, Daisuke, Masatoshi Okura, Mikio Yoshiyama, Meihua Wu, Rie Arai, a Yuiko Morinaga. 2012. „Detection of atypical *Melissococcus plutonius* in honeybees". *Veterinary Record* 171 (24): 630. <https://doi.org/10.1136/vr.e8457>.
- Takamatsu, Daisuke, Masumi Sato, a Mikio Yoshiyama. 2016. „Infection of *Melissococcus plutonius* clonal complex 12 strain in European honeybee larvae is essentially confined to the digestive tract". *Journal of Veterinary Medical Science* 78 (1): 29–34. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0405>.
- Tarr, H. L. A. 1938. „Studies on European Foul Brood of Bees: Iv. on the Attempted Cultivation of *Bacillus Pluton*, the Susceptibility of Individual Larvae To Inoculation With This Organism and Its Localization Within Its Host". *Annals of Applied Biology* 25 (4): 815–21. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1938.tb02356.x>.
- Thompson, Helen M., a Michael A. Brown. 2001. „Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood?" *Bee World* 82 (3): 130–38. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2001.11099515>.
- Thompson, Helen M., Ruth J. Waite, Selwyn Wilkins, Michael A. Brown, Tim Bigwood, Marvin Shaw, Christopher Ridgway, a Matthew Sharman. 2005. „Effects of European foulbrood treatment regime on oxytetracycline levels in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and toxicity to brood". *Food Additives and Contaminants* 22 (6): 573–78. <https://doi.org/10.1080/02652030500089986>.
- . 2006. „Effects of shook swarm and supplementary feeding on oxytetracycline levels in honey extracted from treated colonies". *Apidologie* 37 (1): 51–57. <https://doi.org/10.1051/apido:2005058>.
- Tomkies, Victoria, Jonathan Flint, Gaynor Johnson, Ruth Waite, Selwyn Wilkins, Chris Danks, Max Watkins, et al. 2009. „Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood". *Apidologie* 40: 63–72. <https://doi.org/10.1051/apido>.
- VanEngelsdorp, Dennis, Jay D Evans, Claude Saegerman, Chris Mullin, Eric Haubruge, Bach Kim, Maryann Frazier, et al. 2009. „Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study". *PLoS ONE* 4 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>.
- Waite, Ruth, Michael Brown, Helen Thompson, a Medwin Bew. 2003. „Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK". *Apidologie*. <https://doi.org/10.1051/apido>.
- Waite, Ruth, S Jackson, a Helen Thompson. 2003. „Preliminary investigations into possible resistance to oxytetracycline in *Melissococcus plutonius*, a pathogen of honeybee larvae". *Letters in Applied Microbiology* 36 (1): 20–24. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01254.x>.
- Waite, Ruth, Helen Thompson, Mike Brown, Max Watkins, a M Bew. 2003. „Preliminary studies into novel detection methods for honeybee pathogens". In *XXXVIII Congress Apimondi*.
- White, G. F. 1912. The cause of European foul brood. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Agriculture, *Bureau of Entomology*,. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.63494>.
- Wootton, M., M. Hornitzky, a L. Ryland. 1981. „Thermal Destruction of *Streptococcus Pluton* in Australian Honeys and its Effect on Honey Quality". *Journal of Apicultural Research*. <https://doi.org/10.1080/00218839.1981.11100483>.
- Wu, Meihua, Yuya Sugimura, Kyoko Iwata, Noriko Takaya, Daisuke Takamatsu, Masaru Kobayashi, DeMar Taylor, Kiyoshi Kimura, a Mikio Yoshiyama. 2014. „Inhibitory Effect of Gut Bacteria from the Japanese Honey Bee, *Apis cerana japonica*, Against *Melissococcus plutonius*, the Causal Agent of European Foulbrood Disease". *Journal of Insect Science* 14 (129): 1–13. <https://doi.org/10.1673/031.014.129>.

Zákony

- ČESKO. § 3 odst. 1 písm. c) zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166#p3-1-c>
- ČESKO. § 3 odst. 1 písm. k) zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166#p3-1-k>
- ČESKO. § 5 odst. 3 zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166#p5-3>
- ČESKO. § 5 vyhlášky č. 18/2018 Sb., 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: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-18#p5>
- ČESKO. § 5 zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166#p5>
- ČESKO. § 8 vyhlášky č. 18/2018 Sb., 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: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-18#p8>
- ČESKO. § 11 vyhlášky č. 18/2018 Sb., 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: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-18#p11>
- ČESKO. § 12 vyhlášky č. 18/2018 Sb., 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: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-18#p12>
- ČESKO. § 13 vyhlášky č. 18/2018 Sb., 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: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-18#p13>
- ČESKO. § 20 odst. 2 písm. e) zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010-2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166#p20-2-e>

Webové stránky

- Certifikovaná metodika [online]; Využití kombinace laboratorních metod pro včasnou diagnostiku hniloby včelího plodu (původce *Melissococcus plutonius*) [cit. 18. 6. 2018]. Dostupné z: <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN%20978-80-7427-212-7.pdf>
- Česká tisková kancelář [online]; SZPI našla 31,5 tuny medu zakázaných šarží s etiketou Včelpa [cit. 18. 6. 2018]. Dostupné z: <http://www.ceskenoviny.cz/zpravy/szpi-nasla-31-5-tuny-medu-zakazanych-sarzi-s-etiketou-vcelpa/1591172>
- Encyclopedia of Life [online]; *Apis*, Honey bees [cit. 20. 4. 2018]. Dostupné z: http://eol.org/pages/104135/hierarchy_entries/52191457/overview

- Informační centrum bezpečnosti potravin [online]; Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva [cit. 18. 6. 2018]. Dostupné z: [http://www.bezpecnostpotravin.cz/stranka/system-rychleho-varovani-pro-potraviny-a-krmiva-\(rasff\).aspx](http://www.bezpecnostpotravin.cz/stranka/system-rychleho-varovani-pro-potraviny-a-krmiva-(rasff).aspx)
- Medical Dictionary [online]; Housekeeping gene. (n.d.) *The American Heritage® Medical Dictionary*. (2007), [cit. 17. 7. 2018]. Dostupné z: <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/housekeeping+gene>
- NCBI [online]; *Melissococcus plutonius* overview [cit. 16. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/6591>
- Opatření obecné povahy ze dne 20. listopadu 2017, č. j. 63193/2017- MZE – 17210. In: portál eAGRI. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2017 [cit. 30. 7. 2018]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/567003/_70200_2017_MZE_17210.pdf
- PubMLST [online]; *Melissococcus plutonius* MLST Databases [cit. 16. 7. 2018]. Dostupné z: <https://pubmlst.org/mplutonius/>
- SDĚLENÍ KOMISE EVROPSKÉMU PARLAMENTU A RADĚ ze dne 6. prosince 2010 o zdraví včel /* KOM/2010/0714 konečném znění */. In: EUR-Lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 30. 7. 2018]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A52010DC0714>
- Státní veterinární správa (a) [online]; Ochrana zdraví zvířat a péče o jejich pohodu [cit. 30. 7. 2018]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/>
- Státní veterinární správa (b) [online]; Tiskové zprávy 2016 [cit. 18. 6. 2018]. Dostupné z: https://www.svscr.cz/statni_veterinarni_sprava_udelila_pokutu/