

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Fakulta veterinární hygieny a ekologie

**Metody rozlišení živých a devitalizovaných
spor mikrosporidií rodu *Nosema***

Diplomová práce

Autor práce:
Bc. Hana Peterová

Vedoucí práce:
MVDr. Ivana Papežíková, Ph.D.

Brno, 2017

PROHLÁŠENÍ STUDENTA

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala zcela samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a veškeré podkladové materiály, z nichž jsem vycházela, uvádím v Seznamu literatury.

V Brně dne.....

.....

(podpis studenta)

Poděkování

Děkuji MVDr. Ivaně Papežíkové Ph.D., vedoucí diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytla v průběhu zpracovávání diplomové práce. Dále děkuji své rodině a příteli, za trvalou podporu a zázemí, které mi poskytují během mého studia, zde na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Literární přehled	7
2.1. Včela medonosná, taxonomické zařazení.....	7
2.2. Význam včely medonosné pro člověka	7
2.3. Význam včely medonosné pro ekosystém	9
2.4. Trávicí ústrojí včely medonosné	10
2.4.1. Vyměšovací ústrojí včely medonosné	13
2.5. Charakteristika mikrosporidií	13
2.6. Nosemová nákaza včely medonosné	14
2.6.1. Historie výskytu nosematózy u včely medonosné.....	14
2.6.2. Morfologie spor <i>Nosema apis</i> a <i>Nosema ceranae</i>	15
2.6.3. Cesty přenosu	16
2.6.4. Životní cyklus.....	17
2.6.5. Průběh onemocnění, klinické příznaky	17
2.6.5.1. Rozdílné příznaky u nosematózy typu C.....	19
2.6.6. Diagnostika.....	20
2.6.6.1. Rozlišení druhů	21
2.6.7. Terapie.....	21
2.6.8. Prevence	22
2.6.8.1. Zootechnická opatření	22
2.6.8.2. Dezinfekce.....	22
2.7. Fluorescenční techniky	24
2.7.1. Fluorescenční mikroskopie.....	25
2.7.2. Princip průtokové cytometrie	25
2.7.3. Princip flurometrie.....	26
2.8. Metody rozlišení živých a mrtvých buněk	26
2.8.1. Propidium iodide	28
2.8.2. DAPI.....	28
3. Materiál a metodika	30
3.1. Přehled použitých chemikálií a roztoků	30
3.2. Příprava zásobních roztoků DAPI a PI.....	31
3.3. Příprava vzorků	31
3.4. Izolace spor.....	31

3.5. Barvení trypanovou modří.....	32
3.6. Příprava vzorků na měření.....	32
3.7. Průtoková cytometrie.....	32
3.8. Měření na fluorimetru.....	33
3.9. Fluorescenční mikroskopie.....	33
3.10. Pořízení fotodokumentace a vyhodnocení.....	34
3.11. Statistické vyhodnocení výsledků	34
4. Výsledky a diskuze	35
4.1. Srovnání fluorescenčních barviv	37
4.2. Srovnání průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie	39
4.2.1. Fluorescenční mikroskopie.....	39
4.2.2. Průtoková cytometrie.....	40
4.3. Srovnání fluorimetrie a fluorescenční mikroskopie	44
4.3.1. Fluorescenční mikroskopie.....	44
4.3.2. Fluorimetrie	45
4.4. Srovnání účinnosti různých způsobů permeabilizace spor.....	49
4.5. Vyhodnocení.....	51
5. Závěr	53
6. Seznam literatury	54
7. Abstrakt.....	61
8. Abstract.....	62
9. Přílohy.....	63

1. Úvod

Včela medonosná je nadmíru důležitou součástí ekosystému a jakýkoliv pokles její populace například v důsledku nemoci má nedozírné následky v mnoha směrech na životní prostředí i ekonomiku.

Chovatelé včely medonosné se v současné době musí vypořádávat s mnoha problémy, jedním z nich je i rozšiřující se nosemová nákaza – onemocnění trávicího traktu včel. Dříve jsme se potýkali pouze s jedním známým původcem - mikrosporidií *Nosema apis*. Ačkoli se vždy jednalo o vážný problém, většinou docházelo k samouzdravování včelstev během léta díky malé odolnosti tohoto původce k vysokým teplotám. Nyní se včelaři musejí potýkat i s *Nosema ceranae*, která původně způsobovala nosematózu pouze u včely východní, avšak více než úspěšně se v nedávné době adaptovala i na naši včelu medonosnou. Momentálně se jedná o dominantní druh, infekce se u nás vyskytují buď smíšené nebo způsobené pouze *N. ceranae*. Informací o tomto původci máme zatím málo, mnoho studií je protichůdných a chybí účinná léčba. Tato mikrosporidie je pravděpodobně podle dosavadních studií odolnější vůči vysokým teplotám, proto nedochází k samouzdravování včelstev během letních měsíců a mnohdy jsou neúčinné i běžně používané preventivní postupy. Je často viněna i z kolapsů včelstev, které se v posledních letech vyskytují po celém světě.

Ve své diplomové práci se zabývám optimalizací a srovnáním metod vhodných k rozlišení živých a devitalizovaných spor mikrosporidií rodu *Nosema*. Konkrétně se jedná o porovnání výsledků fluorescenční mikroskopie a fluorimetrie a o srovnání průtokové cytometrie s fluorescenční mikroskopií.

2. Literární přehled

2.1. Včela medonosná, taxonomické zařazení

Kmen	členovci (<i>Arthropoda</i>)
Podkmen	vzdušnicovci (<i>Tracheata</i>)
Třída	hmyz (<i>Insecta</i>)
Podtřída	křídlatí (<i>Pterygota</i>)
Řád	blanokřídlí (<i>Hymenoptera</i>)
Podřád	štíhlopasí (<i>Apocrita</i>)
Nadčeleď	včely (<i>Apoidea</i>)
Čeleď	včelovití (<i>Apidae</i>)
Rod	včela (<i>Apis</i>)
Druh	včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>)

Nadčeleď včely (*Apoidea*) tvoří celkem sedm čeledí. Šest z nich v sobě zahrnuje samotářské včely, které jsou druhově velmi rozmanité. Jen na území České republiky a na Slovensku žije 609 druhů včel samotárek. Sedmou čeleď představuje čeleď včelovití (*Apidae*) do níž patří naše včela medonosná (a ostatní druhy rodu *Apis*), čmeláci a tropické bezžihadlové včely (Nezbeda 2012).

2.2. Význam včely medonosné pro člověka

Včelařství je jedním z nejstarších oborů lidské činnosti (Veselý a kol., 2009). Kamler (1999) uvádí, že přínos včelařství pro společnost můžeme rozdělit do dvou základních oblastí. Včela zajišťuje opylení polních plodin a volně rostoucích rostlin

v přírodě; ve středoevropských podmínkách je to 90% užitku včel. Jen zbývajících 10% užitku je ve formě včelích produktů, které ale zajišťují ekonomiku chovu včel.

Švamberk (2000) uvádí, že včelařství je dodavatelem medu, pylu, mateří kašičky, jedu, vosku a propolisu. Podle Kubišové a Haslbachové (1998) k tomu v některých oblastech světa přistupují ještě některé pro nás exotické produkty, jako např. trubčí larvy a kukly, sloužící buď jako potravina (např. v některých částech Asie), nebo jako surovina pro výrobu léků proti stárnutí (např. v Rumunsku). Titěra (2006) uvádí, že složení těla trubčích larev a kulek je srovnatelné s hovězím masem nebo sójou. Výlučné postavení mezi všemi těmito produkty má ovšem med, který je včelstvům odebírán od prvopočátků včelaření (Kubišová a Haslbachová, 1998).

S postupem intenzity využívání půdy k zemědělským účelům nabývalo včelařství význam i při opylování hmyzosnubných rostlin (Veselý a kol. 2009). V současné době je opylování rostlin včelami hodnoceno jako největší hospodářský přínos chovu včel. Uvádí se, že hodnota výnosů zemědělské produkce ovlivněná opylovací činností včel je 10 - 15 x vyšší než hodnota získaného medu (Lucký, 1984). Dále bylo zjištěno, že včela medonosná se podílí úhrnem přímo i nepřímo jednou třetinou na zajišťování lidské výživy – to rozhodující je právě její opylovací činnost (Přidal, 2005).

Kubišová a Haslbachová (1998) uvádějí, že kromě opylovací činnosti je včela i indikátorem kvality životního prostředí. Je velmi citlivá vůči škodlivým látkám. Podle Přidala (2005) se dnes těchto bioindikačních vlastností včely medonosné využívá i cíleně. Probíhají testy, kdy se pravidelně odebírají vzorky medu a pylu, ale i včel na rozborů na obsah těžkých kovů a radioaktivních látek.

Nemalý význam má včelařství jako obor zájmové činnosti lidí při využívání volného času. Včelařstvím se u nás zabývá kolem 53000 lidí všech věkových skupin. S rozvojem vědy a s novými objevy v oblasti včelařství vznikla v 19. století i potřeba včelařů scházet se a předávat si zkušenosti a poznatky, ale i společně hájit své zájmy. Proto ve druhé polovině 19. století vznikly na území Čech, Moravy a Slezska první včelařské spolky. V roce 1951 byl ustaven Český svaz včelařů jako jednotná organizace sdružující chovatele včel, zájemce a odborníky u oboru včelařství (Veselý a kol. 2009).

2.3. Význam včely medonosné pro ekosystém

Včela medonosná neopyluje jen zemědělské entomofilní plodiny, nýbrž i většinu divoce v přírodě rostoucích entomofilních rostlin (Kubišová a Háslbachová, 1998).

Dle Nezbedy (2012) bylo při porovnávání významu včel během opylování vůči jiným druhům hmyzích opylovatelů opakovaně ověřeno, že jejich role je nejdůležitější. Většina expertů uvádí více jak 95% zásluh. Včely jsou velikostí a tvarem těla přizpůsobeny k vniknutí do květů, které opylují. Ochlupení celého těla jim umožňuje sbírat pyl na co největší plochu těla a došlo také k vývoji specializovaných orgánů na sběr pylu (Přidal, 2005). Velkou předností včely medonosné je, že je florokonstatní. Lze říci, že když najde vydatný zdroj snůšky, kvetoucí porost jednoho druhu rostlin, dokáže tuto informaci předat ostatním létavkám. Tyto včely pak téměř všechny navštěvují výhradně tento druh. Proto se pyl z jednoho květu dostává na blizny dalších květů stejného druhu. Jejich opylení je více cílené a účinnější než u ostatních druhů opylovatelů. I z těchto důvodů má včela nezastupitelné místo mezi opylovateli hmyzosnubných rostlin a je nezbytná pro zachování rozmanitosti krajiny.

Podle Veselého a kol. (2003) dochází nedokonalým opylením divoce rostoucí hmyzosnubné zeleně k jednostrannému posunu struktury druhového složení rostlin ve prospěch větrosnubných rostlin, především trav, případně až k vymizení rostlinného druhu na daném území.

Baumgartner a Loritz (2014) uvádějí, že vedle vlastního opylování a tvorby semen je důležité i křížení zprostředkované hmyzem přenášejícím pyl, které zabraňuje genetickému chudnutí místních populací. Kromě toho slouží hmyz navštěvující květy jako základní zdroj potravy pro hmyzožravé ptáky a savce.

Navrátil a kol. (2011) uvádí, že uplatnění včely medonosné ve všech jejích významech je ovlivněno také zdravotním stavem včelstev. Ne všechny výnosy z chovu včel je možné ekonomicky vyčíslit. Jen výnosy medu však představují (vyčísleno v cenách zemědělských výrobců) každoročně až půl miliardy korun. Výnosy opylením se pak odhadují zhruba na 3 miliardy ročně. Význam zdravotního stavu včel a především význam péče o zdraví včel pak vynikne, když si představíme, že ztráty v důsledku chorob se odhadují na 1,5 násobek výnosu z produkce medu a představují tedy ročně několik set miliónů korun. Tyto ztráty zahrnují ztráty včelstev úhynem, ztráty utracením v rámci protinákazových opatření, náklady na léčbu a eradikaci chorob,

ztráty na včelích produktech a ztráty na výnosech hospodářsky významných entomofilních rostlin.

Včela a její plod mohou onemocnět řadou nemocí. Jsou to jednak nemoci nenakažlivé, které se nedají přenést na okolní včelstva a jednak nemoci nakažlivé, které lze přenést na ostatní jedince ve včelstvu nebo na sousední zdravá včelstva (Veselý a kol, 2009). Jelikož jsou včely vysoce eusociálním druhem, dokonce u nich probíhá trophalaxe (vzájemné předávání potravy mezi členy kolonie orální cestou), každý patogen, který se v úle vyskytne se může šířit velice snadno a rychle (Ritter, 2005).

V posledních letech postihují různé zdravotní problémy včelstva po celém světě. Kromě negativního vlivu pesticidů se za největší problém považují choroby včel. Jednou z nejrozšířenějších nemocí včely medonosné je nosematóza, způsobená mikrosporidii *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Toporčák, 2015). Tyto mikrosporidie napadají trávicí trakt včel (Traver, 2012). V některých oblastech světa je *Nosema spp.* řazena mezi faktory, přispívající ke hromadným kolapsům včelstev (Paxton, 2010).

2.4. Trávicí ústrojí včely medonosné

Toto ústrojí slouží včele k přijímání, přenášení a zpracování potravy a spolu s vyměšovacími ústroji rovněž i k odstraňování nestrávených zbytků potravy z těla, jakož i k jejich hromadění v době, kdy včela nemůže z úlu vylétat (Veselý a kol. 2009). Podle Přidala (2003) rozdělujeme trávicí soustavu včely medonosné na tři části (stomodeum – přední část, mesenteron – střední část a proctodeum – zadní část). Podle Veselého a kol. (2009) z nich pouze střední část, tj. žaludek, vznikla z vnitřního zárodečného listu a má tedy vlastní žláznatý epitel, který umožňuje trávení. Ostatní dvě části vznikly vchlípením vnějšího zárodečného listu a mají obdobnou stavbu jako pokožka. Schönfeld (1955) uvádí, že k přednímu čili orálnímu oddílu patří hltan (pharynx) a jícen (oesophagus) s medným váčkem zvaným též vole (ingluvies). Střední oddíl zažívacího traktu (mesenteron) tvoří žaludek (ventriculus) a zadní oddíl anální tvoří střevo (intestinum) a konečník (rectum). Střevo se dělí na tenké střevo (ileum) a tlusté střevo (colon). Konečník se rozděluje na rektální vak a vlastní rectum.

Zažívací ústrojí začíná ústním otvorem umístěným na spodině hlavy. Ten je opatřen několika důležitými částmi. Na čelisti je svrchní pysk (labrum), jehož úkolem je krýt bázi kusadel. Spodní pysk (labium) je uložen mezi kmeny maxil a je důležitou součástí včelího sosáku, který není jednolitým samostatným útvarem, ale byl vytvořen

společně všemi částmi čelistí. Sosák (proboscis) slouží k sání tekutiny (vody, nektaru, medu), dále ke krmení larev, matky, trubců i dělnic. Délka sosáku kolísá. Dělnice v našich podmínkách mají sosák asi 6,2 mm dlouhý. Matka a trubci mají sosák kratší. Tekutiny protékají sosákovou rourkou, v níž je uložen jazyk (glossa) (Lucký, 1984). Jazyk je zakončen lžičkou (labellum), kterou včely používají hlavně k předávání potravy (Veselý a kol. 2009).

Na ústní štěrbinu navazuje hltan (Svoboda a kol. 1968). Háslbachová (1992) uvádí, že hltan prochází hlavou od ústního otvoru do týlního otvoru. Trubici hltanu obepínají okružní a podélné svaly, které spolu se svaly, upínajícími se k hltanu a vnitřní straně čelního štítu umožňují rozšiřování a zužování hltanu a tím nasávání potravy a její posun do jícnu. Při nasávání potravy jsou současně strhovány do hltanu výměšky žláz. Svoboda a kol. (1968) uvádí, že na stěnách hltanu jsou dvě hltanové destičky, na kterých u dělnic vyúsťují hltanové žlázy.

Hltan se ještě v hlavě zužuje v jícen (Svoboda a kol. 1968). Jícen (oesophagus) prochází středem hrudi mezi svaly a stopkou vstupuje do zadečku. Jícen se může při průchodu většího sousta značně rozšířit (Lucký, 1984).

Po vstupu do zadečku se jícen rozšíří v medný váček (Lucký, 1984). Háslbachová (1992) uvádí, že je to orgán důležitý nejen pro včelu, jako jedince, ale i pro celé včelstvo. V něm totiž včela přenáší do úlu veškerý nektar, medovici i vodu, které v přírodě nasbírání. Medný váček má schopnost se roztáhnout, pojme obvykle 15 - 20 mm³ tekutiny, může však pojmout i 50 mm³. Veselý a kol. (2009) uvádí, že zde nedochází k trávení potravy. Vlivem výměšek žláz vyúsťujících do trávicího ústrojí v hlavové části však dochází k postupné chemické přeměně tekuté potravy (nektar, medovice) na řídký med. V medném váčku rovněž mladé včely vyrábějí krmnou kašičku z pylu, medu a výměšek hltanových žláz a krmí jí starší larvy.

Průchod potravy z medného váčku do žaludku je regulován tzv. česlem (proventriculus), které je vklíněno jak do medného váčku, tak do žaludku a kromě uvedené funkce brání i zpětnému posunu natrávené potravy ze žaludku zpět do medného váčku. Do medného váčku ční hlava česla. Hlava česla vlastně tvoří pravá „ústa“ včely – jedince; teprve to, co projde hlavou česla, se dostane do žaludku včely a je tráveno (Veselý a kol. 2009).

Žaludek je nejdůležitější trávicí orgán včely (Svoboda a kol. 1968). Veselý a kol. (2009) uvádí, že jako jediný vznikl z vnitřního zárodečného listu a má jinou anatomickou stavbu než ostatní části trávicího ústrojí. Háslbachová (1992) uvádí, že až

v žaludku je trávena potrava, kterou včela potřebuje pro vlastní výživu. Trubice žaludku je dlouhá u dělnice 10 mm, u matky 13 mm a u trubce 19 mm a široká 1,5-2 mm. Stěna žaludku je zvrásněna do kruhových záhybů, čímž se zvětšuje trávicí plocha.

Podle Svobody a kol. (1968) je stěna žaludku složena ze tří vrstev. Na zevní straně jsou dvě vrstvy svalů (příčné a podélné), potom následuje bazální membrána na ní je uložena nejdůležitější vrstva buněk výstelkových, vlastní sliznice žaludeční. Tvoří ji vysoké válcovité buňky, které mají na straně obrácené do nitra žaludku jemná plazmatická vlákénka, tzv. rhabdiorium. Při činnosti buněk během trávení se rhabdiorium odděluje a tvoří se z něho peritrofická membrána, která souvisle v několika vrstvách obaluje přijatou potravu, postupuje s ní a asi v 3/4 délky žaludku se trhá a spolu s nestrávenými zbytky potravy odchází tenkým střevem do výkalového vaku. Podle Klímy a Babincové (2012) brání peritrofická membrána poranění žaludečního epitelu ostrými částmi potravy (například obaly pylových zrn) a je zároveň bariérou proti vstupu infekčních agens.

Výstelkové buňky tvoří záhyby, ve kterých jsou menší buňky, tzv. buňky kryptové; z nich se tvoří nové výstelkové buňky, nahrazující buňky opotřebované. Ve výstelkových buňkách jsou krystalky uhličitanu vápenatého, jež mizí při poruchách zažívání, jaké nastávají např. při nosemové nákaze. (Svoboda, 1968).

Dále uvádí, že výstelkové buňky produkují trávicí šťávy, které obsahují všechny enzymy potřebné ke štěpení složitých součástí potravy při trávení; jsou to např. invertáza ke štěpení sacharózy, pepsin ke štěpení bílkovin, lipolytické enzymy ke štěpení tuků aj. Jednotlivé složky potravy se v žaludku štěpí na jednoduché látky, jako jsou jednoduché cukry glukóza a fruktóza, mastné kyseliny a aminokyseliny. Výstelkové buňky tyto látky vstřebávají a dopravují je stěnou žaludku do hemolymfy. Nestrávené části přecházejí tenkým střevem do výkalového vaku.

Rovněž Rada a kol. (2009) uvádí, že zbytky potravy a produkty vyměšovací soustavy jsou před vyloučením z těla hromaděny ve výkalovém vaku. To vytváří vhodné prostředí pro rozvoj mikroflóry uvnitř výkalového vaku. Velký význam má tento orgán především v zimním období, kdy se včely nemohou zbavit zbytků potravy po dlouhou dobu. Podle Veselého a kol. (2009) rektální žlázy v podobě šesti proužků na povrchu přední části výkalového vaku brání svým sekretem kvašení a hnití nestrávených zbytků potravy a ovlivňují zřejmě vodní režim v životě včely. Titěra (2006) uvádí, že výkalový vak umožňuje zadržet výkaly v objemu až poloviny váhy těla včely, tedy asi 50 mg.

2.4.1. Vyměšovací ústrojí včely medonosné

S trávicím ústrojím velmi úzce souvisí i ústrojí vyměšovací, tzv. Malpighiovy trubice, které fungují obdobně jako ledviny u obratlovců. (Veselý a kol. 2009). Je to soubor 100 – 150 trubic, volně uložených kolem jednotlivých orgánů v zadečku včely. Jeden jejich konec je uzavřený, druhým vyúsťují do trávicího ústrojí v krajině pyloru. Jsou velmi dlouhé (17 – 21 mm) a úzké (0,05 – 0,1 mm) (Veselý a kol. 2009).

Rada a kol. (2009) uvádí, že včely vylučují metabolizovaný dusík desítkami malpighických trubic obvykle ve formě kyseliny močové. Produkty vyměšovacího ústrojí jsou stejně jako nestrávené zbytky potravy dopraveny do výkalového vaku (Svoboda a kol. 1968).

2.5. Charakteristika mikrosporidií

Podle Corradi (2009) jsou mikrosporidie obligátně vnitrobuněční parazité. Vyznačují se výrazným snížením počtu nebo dokonce nepřítomností buněčných složek, jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát a bičíky, typických pro eukaryotické organismy. Dále uvádí, že se po 150 letech výzkum evoluce mikrosporidií dostává zpět na začátek: z nejasných důvodů byly prvotně řazeny mezi houby, dále prošly cestu skrze různé skupiny prvoků k Archezoa a nyní jsou opět zařazeny mezi houby.

Od jejich prvního rozpoznání jako patogenu u bource morušového (Nagéli, 1857), byly mikrosporidie identifikovány jako původci mnoha infekčních chorob u obratlovců a bezobratlých včetně člověka, ryb a hmyzu. Je popsáno 143 rodů a více než 1200 druhů mikrosporidií a bylo zjištěno, že jejich nejčastějším hostitelem je hmyz. Většina z entomopatogenních mikrosporidií patří do rodu *Nosema*, který zahrnuje více než 150 popsanych druhů a infikuje téměř všechny taxonomické řády hmyzu, zvláště z řádu Lepidoptera a Hymenoptera (Chen a kol. 2009).

Vzhledem k velkému počtu rodů a druhů se kmen vyznačuje velkou rozmanitostí morfologie a strategií životního cyklu. Obecná charakteristika, která spojuje všechny zástupce kmene a kvalifikuje organismus jako mikrosporidii je, že mimo hostitelskou buňku přežívají jen jako metabolicky inaktivní spory a že infikování hostitelských buněk zahrnuje klíčení spor (germinaci). Při germinaci dojde k vymrštění pólového vlákna, stočeného uvnitř spory, které prorazí cytoplazmatickou membránu hostitelské buňky a přímo do její cytoplazmy aplikuje infekční sporoplazmu (Bigliardi 2011).

Weiss (2001) uvádí, že nejčastějším klinickým projevem je infekce trávicího traktu, ale mohou se vyskytnout i infekce reprodukčního a respiračního aparátu, svalů, vylučovacího ústrojí a nervové tkáně.

K přenosu většiny druhů dochází pozřením spor vnímavým hostitelem, spory se dostávají do vnějšího prostředí trusem, močí nebo po rozpadu těla uhynulého hostitele. U některých zástupců parazitujících u hmyzu dochází i k transovariálnímu přenosu (Chroust a kol. 1998)

U včely medonosné byly popsány druhy *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Maside a kol. 2015).

2.6. Nosemová nákaza včely medonosné

Nosematóza je jedním z nejvážnějších a nejčastěji se vyskytujících onemocnění včely medonosné na světě. Je způsobena mikrosporidiálními intracelulárními parazity rodu *Nosema* (Chen, 2010).

Peng (2014) uvádí, že se tato nemoc projevuje dysenterií hostitele, sníženou schopností včelstva sbírat pyl a nektar, zkrácením života dělnic a zvýšenou mortalitou zimujících včelstev. O Nosemě se mluví jako o „tichém zabijáku“ včel, protože infekce ze začátku zůstávají nezjištěny, ale mohou ve výsledku vést ke značným ztrátám ve včelstvu. Větší pozornost se v posledních letech této nemoci věnuje po zprávách o tom, že druh *Nosema ceranae*, který je běžně nacházen u asijské včely východní (*Apis cerana*) se úspěšně prosadil jako nový patogen *A. mellifera*.

2.6.1. Historie výskytu nosematózy u včely medonosné

V roce 1909 byl popsán původce nosematózy včely medonosné (Zander, 1909), - mikrosporidie *Nosema apis*. Nosematóza postihovala včelstva pravděpodobně již v dávných dobách, ale úplavice včel se dříve připisovala na vrub pouze nevhodné potravě. Díky vědeckým postupům se pak podařilo zjistit detailní patogenezi a vypracovat preventivní opatření v chovech včel vůči této chorobě (Svoboda a kol, 1968).

Po zavlečení roztoče *Varroa destructor* do Evropy se varroáza stala nejzávažnější chorobou včely medonosné a sledování nosematózy včel ustoupilo do pozadí. V posledních letech se však nosematóza opět dostává do popředí zájmu (Peng, 2014). Počátek 3. tisíciletí je ve včelařském odvětví spojen s vážnými problémy.

Celosvětově se vyskytují masivní úhyny včelstev a v případě nosematózy včel se objevuje zásadní milník – ve Španělsku a na Taiwanu je u včely medonosné *Apis mellifera* prokázán nový druh *Nosema ceranae*. Stejně jako v případě rozšíření roztoče *Varroa destructor* se objevuje stejný scénář – mikrosporidie *Nosema ceranae* je původně popsána pouze u včely východní *Apis cerana*, avšak díky rozšíření včelařství a včely medonosné do všech koutů světa získává nového hostitele – včelu medonosnou (Kamler, 2011).

N. ceranae se postupně rozšířila na populace *A. mellifera* po celém světě a je považována za jeden z faktorů, podílejících se na syndromu hromadného kolapsu včelstev (Peng, 2014). Infekce se vyskytují buď samostatně, tedy *N. apis* nebo *N. ceranae*, nebo jako smíšené infekce oběma druhy *Nosema* spp. (Kamler, 2011). Nemoc způsobená *N. ceranae* se v současné době označuje jako nosematóza typu C (Higes a kol., 2010 (a)). Sokół a Michalczyk (2016) uvádějí, že v současné době je většina včelstev v Evropě infikována již pouze *N. ceranae*, což bylo hlášeno i z ostatních oblastí ve světě. V České republice se v rámci prevence dlouhodobě sleduje a kontroluje výskyt nosematózy u chovatelů s komerční produkcí matek. Například v roce 2011 bylo vyšetřeno celkem 4 010 včelstev ze 113 lokalit. Prevalence *Nosema* spp. dosahovala 54 % (2167 včelstev), z toho samostatná infekce *N. ceranae* byla zjištěna v 52,3 % případů (1 134 včelstev) a smíšená infekce *N. apis* a *N. ceranae* v 16,4 % případů (356 včelstev). Doposud nebyla *N. ceranae* detekována jako primární patogen, který vede ke kolapsu včelstev v ČR (Kamler, 2011).

2.6.2. Morfologie spor *Nosema apis* a *Nosema ceranae*

Spory *N. apis* jsou malých rozměrů: 4.5 až 6 x 2 až 3 μm (Kilani 1999) a mají oválný tvar (Kamler, 2011). Pouzdro spor je sklerotizováno a při pozorování v mikroskopu je nápadné svou světlolomností. Spory jsou velmi odolné (Kubišová, Hálsbachová, 1997). Uvnitř spor je polysacharidová čepička, polaroplast, zadní vakuola, duté pólové vlákno (dlouhé až 400 μm) a dvoujaderný zárodek (sporoplazma) (Přidal, 2005). Na jednom pólu spory je otvor – mikropyle. Jím při germinaci spory proniká pólové vlákno, kterým projde do žaludku včely měňavkovitý zárodek. Spory *N. apis* vždy obsahují více než 30 závitů pólového vlákna (Traver a Fell, 2012). Počet závitů pólového vlákna je důležitým kritériem při rozlišování různých druhů rodu *Nosema* (Chen, 2009).

Morfologie spor *N. ceranae* je podobná jako u *N. apis*. Velikost spor *N. ceranae* se pohybuje mezi 4.4 x 2.2 μm . Počet závitů pólového vlákna uvnitř spory je 18-21, tedy výrazně méně než u *N. apis*. (Chen, 2009). Spory jsou spíše cylindrického tvaru (Kamler, 2011).

Ptaszyńska (2014) uvádí, že pomocí elektronové mikroskopie lze sledovat i rozdíly v povrchu spor a identifikovat tak oba druhy. Spory *N. ceranae* byly více vytvarovány s hlubší ornamentací než u *N. apis*. Spory *N. apis* měly výrazně větší záhyby než *N. ceranae* a větší vzdálenosti mezi brázdami ornamentace a širší hrany brázd.

2.6.3. Cesty přenosu

Infikování mohou být všichni členové včelstva – dospělé dělnice, trubci i matky (Chen, 2009). Horizontální přenos spor je pravděpodobně podobný u obou druhů *Nosemy* a dochází k němu díky trophalaxi (vzájemné výměně potravy), pozřením spor při čištění kontaminovaného plástu (Maistrello a kol., 2008), pozřením infikovaných výkalů (Fries a kol., 1996), kontaminovaného pylu a medu (Higes a kol., 2010 (b)) a vody (Maistrello a kol., 2008). Do včelstva přenesou spory zalétlé nemocné včely nebo loupežící včely. Spory může do včelstva zanést i vyměněná nemocná matka, popřípadě škůdci. Velmi často šíří nosematózu i sám včelař spojováním nemocných včelstev se zdravými, přidáváním plástů a souší od nakažených včelstev nebo při posilování včelstev. Zdrojem spor jsou i nevhodná napajedla a pokálené rámkové úly. Výkaly nemocných včel, kálejících v úle, jsou sladké a jsou rychle odklizeny včelami čističkami, které se při této činnosti nakazí. Včely létavky pak ve vnějším prostředí kontaminují zdroje potravy – vodu i pyl. Tím se infekce šíří dále. (Kamler, 2011).

Mnohé houby rodu *Nosema* napadají vaječníky plodných samiček a dochází k přenosu infekce na potomky. V případě nosematózy včel může mít infekce vliv na vývoj vajíček, může dokonce i zastavit reprodukci, ale k transovariálnímu přenosu patogenu nedochází. (Huang a Solter, 2013). Rovněž podle Přídala a kol. (2005) jsou čerstvě vylíhlé včely prosté nákazy a k jejich nakažení dochází až zmiňovanou alimentární cestou.

2.6.4. Životní cyklus

Webster a Aronstein (2012) uvádějí podrobněji životní cyklus Nosemy. Když je spora zkonsumovaná včelou, prochází přes medný váček do žaludku. Specifické prostředí v luminu žaludku nastartuje germinaci (klíčení) spory. V procesu germinace velmi dlouhé pólové vlákno vystřelí ze své stočené pozice uvnitř spory. Tato everze (vystřelení) je velice rychlá. V průběhu několika vteřin se vlákno natáhne na 200 μm nebo více, na skoro stokrát větší délku než má spora. Ve vláknech dochází také k teleskopickému prodloužení, tím pádem je ještě delší, než když bylo stočené ve spore. Hrot vlákna potom může prorazit hostitelskou buňku v epitelu žaludku včely. Potom sporoplazma, která obsahuje jádro a cytoplazmu spory projde skrze pólové vlákno do epiteliální buňky včely. Intracelulární životní cyklus má dvě fáze, proliferační fázi (merogonii) a sporogenní fázi (sporogonii). V průběhu několika dní se vyvinou primární neboli autoinfekční spory. Tyto spory klíčí uvnitř epiteliální buňky včely. Mají krátké pólové vlákno, skrze něž infikují buňky v těsném sousedství. V těchto vedlejších buňkách se během 1 – 2 týdnů vyvinou silnostěnné environmentální spory (druhá fáze). Když environmentální spory dozrají, epiteliální buňka se roztrhne a uvolní spory do lumina žaludku. Mnoho z těchto spor prochází do recta a opouští tělo včely ve výkalech. Některé environmentální spory mohou vyklíčit krátce potom, co jsou vypuštěny do střeva, čímž začínají novou fázi infekce.

2.6.5. Průběh onemocnění, klinické příznaky

Navrátil a kol. (2011) uvádí, že inkubační doba u nosematózy je 3-5 dní. Kubišová a Haslbachová (1998) uvádí, že za pět dní po invazi dochází v důsledku porušení střevní bariéry k infekci hemolymfy saprofytickými bakteriemi z trávicího ústrojí a k možnému úhynu včel na septikémii. Poškozené buňky žaludeční výstelky přestávají také vytvářet peritrofickou membránu. Podle Veselého a kol. (2009) tím dochází k porušení činnosti žaludku a k nedokonalému trávení. Včela nemůže plně využít z potravy především bílkoviny. Nedostatek bílkovin způsobuje atrofii hltanových žláz. V důsledku atrofie hltanových žláz potom nemohou nosematické včely krmit plod ani matku a předčasně stárnou.

Nedokonale jsou vstřebávány také sacharidy, které především v zimním období zatěžují výkalový vak a způsobují úplavici včel. Nemocné včely jsou malátné, nemohou

létat a předčasně hynou (Lucký, 1984). Podle Kubišové a Haslbachové (1998) nejsou na začátku onemocnění příznaky příliš nápadné, až v pozdější fázi nemoci se objevují včely se zduřelými zadečky od přeplněných výkalových váčků, které se snaží dostat z úlu ven i v zimě a vykálet se. Rovněž podle Veselého a kol. (2009) na nosematózu u jednotlivých včel můžeme usuzovat podle zvětšených zadečků nemocných včel. Při preparaci samotného trávicího ústrojí zjistíme u nosematických včel zvětšený a bělavý žaludek, jehož stěna se trhá. Naopak žaludek zdravé včely je žlutorůžový a stěna je pevná.

Matky a trubci bývají napadeni nejméně, protože se na rozdíl od dělnic neúčastní čištění buněk. Pokud je napadena matka, je to pro ni zhoubné. Ztráty matek v prvních 3 týdnech po úspěšném přidání do včelstev jsou dávány do souvislosti s nosematózou (Přidal, 2005). U infikované matky dochází k degeneraci vaječníků, matka špatně klade a dělnice často provedou tichou výměnu. Od roku 2015 jsou registrovaní chovatelé matek povinni každoročně dodat k vyšetření do akreditované laboratoře vzorek 30 včel z každého včelstva (Papežíková a kol. 2015).

Napadená včelstva neklidně zimují, na jaře nacházíme v úle hodně mrtvolek a stopy kálení v úle a na letáku. Nejnápadnější je zeslabení včelstva v důsledku zkrácení délky života včel. K úhynu včelstva dochází hlavně v jarních měsících, u silně napadených včelstev, kde úbytek starých včel není vyrovnán mladou generací, dochází k uhynutí celého včelstva (Kubišová a Haslbachová, 1998). Silně nosematické včelstvo uhynie ještě v zimním období (Veselý a kol., 2009).

Svoboda a kol. (1968) uvádí, že včelstvo zeslabené nosemovou nákazou špatně obsedá plásty a často nedovede obsadit ani plásty s plodem. Tím méně se pak může věnovat činnosti mimo úl, téměř nevyletuje za snůškou. Dále uvádí, že příznakem nosemové nákazy ve včelstvu jsou četné uhynulé včely na letáku úlu nebo v jeho blízkosti. Instinkt nutí včelu nezahynout v úle, ale nemocná včela již nemůže odletět daleko od letáku. Na jaře je typickým příznakem nosematických včelstev kolísavé množství jedinců ve včelstvu. Včelstvo sílí, pak náhle zeslábne a tak se to stále opakuje. Před úplným vyhynutím nalezneme v úle pouze matku v chumáčku mladušek.

2.6.5.1. Rozdílné příznaky u nosematózy typu C

Výše uvedené příznaky se týkají především infekce *N. apis*. Higes a kol. (2010 (a)) uvádí, že na rozdíl od infekce *N. apis* nenacházíme u infekce *N. ceranae* pokálené plásty, bezletné včely ani makroskopické změny na žaludku. V období, kdy včely vyletují za snůškou, hynou napadené dělnice mimo úl a včelstvo slábne. Příčina rozdílů v klinických projevech obou typů nosematózy není dosud objasněna – oba druhy mikrosporidií napadají stejnou tkáň a způsobují podobné histologické změny.

Studie využívající metodu PCR od Chen a kol. (2009) však ukázala, že infekce *N. ceranae* není omezena pouze na žaludek, ale šíří se i do ostatních tkání, včetně Malpighiho tubulů, hltanových žláz, slinných žláz a tukového tělesa. Mezi vyšetřenými a vypreparovanými včelími tkáněmi byla *N. ceranae* 100% detekována v zaživacím traktu, Malpighiho tubulech a v hltanových žlázách, v 87% slinných žláz a ve 20% v tukovém tělese.

Naproti tomu Huang a Solter (2013) ve své srovnávací studii *N. apis* a *N. ceranae* u hostitele včely medonosné tvrdí, že *N. ceranae* nemůže proniknout ze žaludku do hemolymfy ani do ostatních tkání. Dále uvádí, že *N. ceranae* vyprodukuje přibližně 8 milionů spor denně, zatímco *N. apis* při plně rozvinuté infekci pouhou polovinu. *N. ceranae* má v porovnání obou druhů také výhodu spočívající ve vyšším poměru zralých infekčních spor. V závěru studie uvádí, že *N. ceranae* napadá stejné tkáně jako *N. apis*, a není dle jejich studií nakažlivější. V její prospěch hraje rychlejší životní cyklus a produkce většího počtu infekčních spor. Z tohoto důvodu úspěšně konkuruje *N. apis* a stává se dominantním patogenem včel v kategorii mikroskopických hub.

Co se týká sezónnosti u infekce způsobenou *N. ceranae*, byla provedena řada studií, jejichž výsledky se rovněž liší. Některé práce udávají, že u nosematózy typu C chybí sezónnost a původce je ve včelstvu přítomen po celý rok (Hernández a kol., 2007). Jiní autoři popisují sezónní dynamiku podobnou jako u infekce *N. apis*. Pětiletá studie, prováděná na 22 včelnicích na severozápadě Německa ukázala vyšší prevalenci onemocnění na jaře (Gisder a kol., 2010). K podobným výsledkům došli i jiní autoři (Traver a kol., 2012). Sezónní dynamiku onemocnění v podmínkách České republiky popisuje Kamler (2012), který udává nejvyšší prevalenci onemocnění v létě.

Nanneti (2015) uvádí, že v posledních letech se *Nosema ceranae* stala jedním z nejrozšířenějších včelích patogenů po celém světě. V některých částech světa (zejména v teplých oblastech) se údajně podílí na obecném fenoménu ztrát včelstev, ale v chladnějších oblastech byla její zodpovědnost za rozsáhlé úhyny vyloučena.

Bahreini and Currie (2015) uvádí, že infekce *N. ceranae* inhibuje funkci imunitního systému včel, který pak může snížit odolnost hostitele proti jiným patogenům.

2.6.6. Diagnostika

Navrátil a kol. (2011) uvádí, že diagnózu stanovíme na základě anamnestických údajů, výše popsaných klinických příznaků a patologických změn a identifikace původce. Včely můžeme vyšetřovat individuálně nebo hromadně. Při individuálním vyšetření se uhynulé nebo utracené včele odstraní hlava a za poslední zadečkový článek se vytáhne celé trávicí ústrojí. Žaludek se rozetře po podložním sklíčku nebo se rozmáčkne krycím sklíčkem. Při zvětšení 400–600x se pod mikroskopem hledají spory původce. Spory můžeme zjišťovat i v obsahu zadečku. Ten se odstříhne a s několika kapkami vody se rozetře ve třetí misce. Roztěr se opět vyšetřuje pod mikroskopem.

Svoboda a kol. (1968) uvádí, že základním vyšetřením je tzv. skupinové vyšetření včel. Zpravidla vyšetřujeme 30 zimních mrtvolek. Postup přípravy vzorku před vyšetřením v laboratoři je tento: Do třetí misky nastříháme zadečky včel. Přilijeme asi 5 ml destilované vody a pomocí tloučku důkladně rozetřeme. Papežíková a kol. (2015) uvádí, že homogenát zfiltrujeme přes dvojitou vrstvu gázy a prohlížíme pod mikroskopem pod 400násobným zvětšením. Před mikroskopováním je třeba zfiltrovaný homogenát dobře promíchat, protože spory rychle klesají ke dnu. Spory obou druhů připomínají zrnka rýže. Jejich stěna odráží světlo, takže spory v zorném poli mírně září a jeví se jako homogenní objekty bez vnitřní struktury. Svoboda a kol. (1968) dále uvádí, že při prohlížení vyšetříme alespoň 10 zorných polí. Nález hodnotíme kvantitativně: + znamená malé množství spor (slabá infekce), ++ = střední množství spor (pokročilá infekce), +++ = velké množství spor (silná infekce). Při vyšetřování nativních preparátů musíme umět rozlišit od spor i jiné útvary, sporám podobné. Jsou to spory plísní a kvasinky i některá pylová zrna, která jsou však zpravidla větší, mají jinou barvu nebo zřetelně viditelnou vnitřní strukturu. Kvasinky mají různý tvar a jsou

zbarveny do růžova nebo fialova. Někdy se na preparátu pohybují, pučí, kdežto spory nosemy jsou nepohyblivé.

2.6.6.1. Rozlišení druhů

Do roku 1996 kdy byl znám pouze jeden druh Nosemy napadající *A. mellifera* nebylo třeba rozlišovat jednotlivé druhy. Objev *N. ceranae* u včely medonosné si vyžádal vývoj molekulárních metod, umožňujících rozlišit *N. apis* od *N. ceranae*. Tyto metody jsou obvykle založeny na PCR (Fries a kol. 2013). Molekulární detekce nabízí jak specifčnost tak citlivost. Molekulární metody jsou v současné době nezbytné, jelikož je velmi jednoduché zmýlit se v druzích pouze na základě morfologie spor a jelikož je u těchto metod snižené riziko falešně pozitivních či negativních výsledků (Traver a Fell, 2012).

Při mikroskopickém vyšetření lze pozorovat patrný rozdíl ve velikosti a tvaru spor u obou druhů Nosemy (Kamler, 2011), ale tato metoda není k odlišení jednotlivých druhů zcela spolehlivá (Giersch a kol., 2009).

K vizuálnímu rozlišení *N. apis* od *N. ceranae* je nejčastěji používána elektronová mikroskopie, pomocí které lze pozorovat ultrastrukturální znaky spor (Weber a kol., 2000). Jednotlivé druhy je možné identifikovat na základě počtu závitů pólového vlákna (spory *N. ceranae* mají 20 - 23 závitů pólového vlákna, u spor *N. apis* vždy napočítáme více než 30 závitů, v rozsahu 30-44), (Traver a Fell, 2012).

2.6.7. **Terapie**

Dříve se k terapii nosematózy používal fumagilin (antibiotikum z houby *Aspergillus fumigatus*). Dnes je v EU používání fumagilinu pro včely zakázáno kvůli riziku kontaminace včelích produktů, takže chovatelé jsou odkázáni pouze na preventivní a chovatelská opatření (Papežíková a kol. 2015).

Iljasov a kol. (2013) rovněž uvádí, že po zákazu fumagilinu jako léčebného přípravku pro včely Evropskou komisí v roce 2002 se včelaři mohou dnes spolehnout pouze na symptomatickou léčbu a zootechnická a preventivní opatření. Bylo zjištěno, že na nosematózu mají tlumivý účinek látky jako thymol, resveratrol, enteroseptol, sulfadimezin, monomycin, sulfapyridazin, sulfadimetoxin, kyselina askorbová, nebo vodno-alkoholové extrakty měsíčku, máty, pelyňku a anděliky lékařské.

Navrátil a kol. (2011) uvádí, že volně dostupným prostředkem použitelným k tlumení nosematózy jsou odparné desky s kyselinou mravenčí (FORMIDOL), primárně určené pro léčbu varroózy. Páry kyseliny mravenčí jsou schopny spory devitalizovat.

2.6.8. Prevence

Nosematóza je nákazou, která je potlačována nejlépe prevencí - důkladnou dezinfekcí a dodržováním zootechnických zásad. Prokázalo se totiž, že jakkoliv pečlivé podávání léků bez současné dezinfekce nemá potřebnou účinnost (Přidal, 2005).

2.6.8.1. Zootechnická opatření

Zootechnická opatření vycházejí z faktu, že na náchylnost k infekci a průběh mají značný vliv podmínky, v nichž včely žijí a přítomnost dalších infekcí. Největší význam při tlumení nosematózy má správné ošetřování včelstev. Silná včelstva, která bez námahy udržují potřebný tepelný režim, jsou vůči nosemě méně náchylná (Veselý a kol., 2009).

Včelstva by neměla být umístěna na vlhkém, studeném stanovišti a neměla by být stresována příliš častými nebo nevhodnými zásahy. Měla by zimovat nerušeně a na vhodných zásobách (květový med nebo kvalitní cukr s nízkým podílem balastních látek). Samozřejmostí by měla být hygiena krmení (čistá krmítka a napáječky, ve kterých se včely netopí a nekontaminují je výkaly) a pravidelná obměna včelího díla – včelstva by měla postavit alespoň třetinu nového díla ročně. Důležitá je péče o genetický materiál. Je třeba rozchovávat pouze zdravá, negativní včelstva, u nichž je předpoklad vyšší odolnosti, přestože zatím dokonale neznáme její mechanismy (Papežíková a kol. 2015).

Navrátil a kol. (2011) uvádí, že mezi opatření patří také povinné vyšetření komerčních chovů matek a zákaz komerčního chovu matek při výskytu nosematózy u více než 50 % včelstev.

2.6.8.2. Dezinfekce

Zdrojem infekce mohou být napadené včely, infikované plodové pláсты, zásobní pláсты, úl, med, vosk, různé pomocné včelařské nástroje (kleště, rozpěrák, smetáček, půda před včelínem, napajedlo, popřípadě včelař sám (Svoboda a kol. 1968).

Dále uvádí, že při dezinfekci se používá ve včelařství ohně, vroucí vody i páry a chemických prostředků. Účinnost uvedených prostředků je různá. Nejúčinnější je oheň, který zničí (spálí) veškerou organickou hmotu, tedy i původce nákaz a jejich zárodky. Jeho použití je ovšem omezené. Při různých nákazách je nutno volit vhodné dezinfekční prostředky.

Ve včelařství se nejčastěji setkáváme s použitím následujících postupů:

- Dezinfekce ohněm se používá především u dřevěných předmětů - nástavků, plemenáčů, oplodňáčků apod. Plamenem se musí působit tak dlouho, až dřevo zhnědne. Pozor na styk stěn a na rohy, které se vypalují obtížně.
- Tepelná dezinfekce se používá zvláště u drobných předmětů, hlavně proti nosematóze a zvápenatění včelího plodu. Důležité je zajištění rovnoměrného vyhřátí prostoru, v němž jsou dezinfikované předměty uloženy. Potom je nutné na ně působit po dobu potřebnou pro vlastní dezinfekci.
- Ohřev v horkém parafínu je určen k penetraci dřeva. Pro dezinfekci udržujeme teplotu parafínové lázně na hranici 200 °C, předmět se ponořuje na dobu 5 minut.
- Vosk pro výrobu mezistěn se sterilizuje při teplotě 117 °C po dobu 60 minut. 5% roztok louhu s přídavkem 0,5 % chlornanu sodného se používá hlavně na nehořlavé předměty (Kamler, 2014).

Kamler (2014) dále uvádí, že v současné době lze využít přípravek Beesafe na bázi aktivního jódu - jodoformu. Spolu se silnými minerálními kyselinami a účinným smáčedlem je tento přípravek účinný proti všem patogenům včetně spor.

K dezinfekci úlů a včelího díla je možné použít páry kyseliny octové (minimálně 60% roztok) anebo některý z odpařovačů kyseliny mravenčí, používaných k tlumení varroázy. Dokud se u nás vyskytovala jen infekce *N.apis* bylo možné vydezinfikovat plásty teplem - uložením na 24 hodin do termokomory nastavené na 49°C (OIE manual, 2013). Fenoy a kol. (2009) ve své studii uvádí, že *N. ceranae* však snáší vysoké teploty daleko lépe než *N.apis*. Při vystavení spor *N. ceranae* teplotě 60°C po dobu 6h, která jiné intracelulární parazity běžně eliminuje, došlo k zachování životaschopnosti zhruba u 90% spor. Z toho vyplývá dobrá odolnost vůči vysokým teplotám. Při vystavení spor *N. apis* teplotě 60°C po dobu 15 minut došlo k úplné devitalizaci spor. Tento výsledek je v souladu s předchozími studiemi, ve kterých bylo pozorováno lepší přizpůsobení *N. ceranae* vysokým teplotám než *N. apis*. Higes a kol. (2010 b) popsal vysokou

prevalenci infekce *N. ceranae* během všech čtyř ročních období. Naproti tomu infekce *N. apis* více převládá v mírnějších obdobích jako na jaře a na podzim; přes léto často dochází k samouzdravování napadených včelstev. Je pravděpodobné, že tato nižší citlivost na vysoké teploty byla onou výhodou, která umožnila *N. ceranae* převládnout nad *N. apis* (Papežíková a kol. 2015).

Například podle Forsgren a kol. (2013) a dalších autorů (Peng 2014, Sánchez 2014, Fenoy 2009) je *Nosema ceranae* naopak daleko náchylnější na chlad než *N. apis*. Po týdnu zmrazení dochází k výrazně větší ztrátě životnosti spor než je tomu u *N. apis*. S tím pravděpodobně také souvisí menší rozšíření a následky infekce *N. ceranae* v chladnějších klimatech.

2.7. Fluorescenční techniky

Fluorescenční techniky jsou založeny na poznatku, že některé látky (fluorofory) jsou po ozáření (excitaci) světlem schopny absorbovat světlo o určité vlnové délce a následně vyzařovat (emitovat) světlo o vyšší vlnové délce (Pavlík, 2009). Mnoho organických látek má schopnost základní fluorescence (autofluorescence) a některé z nich jsou užitečné pro specifické označování složek v potravinách rostlinného a živočišného původu. V rostlinách jsou to pigmenty (např. chlorofyl a karotenoidy) a fenolové sloučeniny s vysokou i nízkou molekulární hmotností a v živočišných tkáních kosti a chrupavky, kolagen, elastin a některé tuky. Pro zvýraznění dalších struktur se používají fluorescenční barviva. V současnosti je k dispozici velký spektrální rozsah fluoroforů, který umožňuje současné zobrazení různých buněčných, subcelulárních nebo molekulárních komponent. Ke specifickému zviditelnění struktur, které nevykazují autofluorescenci se využívá několik postupů, například:

1/ použije se fluorofor, který se specificky váže na jednotlivé komponenty v buňce (např. DAPI na DNA) (Brychtová, Hlobilková, 2008.).

2/ použije se fluorofor, kovalentně spojený s látkou, která se specificky váže na určité struktury (např. s phalloidinem, který se specificky váže na polymerovaný aktin)

3/ použije se fluorofor, vázaný na protilátku, specificky namířenou proti určité struktuře ve studovaném objektu (Pospiech a kol. 2014).

2.7.1. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskop je konstruován podobně jako běžný světelný mikroskop; je doplněn o silný světelný zdroj (nejčastěji rtuťovou nebo xenonovou výbojku) a dva typy filtrů – excitační a bariérový (emisní). Excitační filtr propouští z barevného spektra pouze část, vhodnou pro excitaci vybraného fluoroforu a zabraňuje průchodu světla o stejné vlnové délce, jako má emitované světlo. Bariérový (emisní) filtr propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačního světla, které je mnohem intenzivnější než světlo emitované fluoroforem (Lakowicz, 2007). Výběr vhodných excitačních/emisních filtrů je dán excitačním a emisním spektrem použitého fluoroforu. Jako excitační spektrum označujeme rozsah vlnových délek, schopných excitovat daný fluorofor. Vlnová délka, která navodí maximální excitaci (a tudíž nejintenzivnější fluorescenci) fluoroforu, se nazývá excitační maximum. Jako emisní spektrum označujeme rozsah vlnových délek, emitovaných fluoroforem. Vlnová délka, při které pozorujeme nejintenzivnější fluorescenci, se nazývá emisní maximum (Pavlík, 2009).

2.7.2. Princip průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je vysoce citlivá metoda ke sledování řady vlastností buněk (popř. i jiných korpuskulárních objektů) v suspenzi s rychlostí detekce až několik tisíc buněk za sekundu. Používá se k fenotypizaci buněk na základě rozlišení jejich povrchových znaků nebo k průkazu intracelulárních molekul, ale i ke sledování fází buněčného cyklu a dalších funkčních vlastností (Toman a kol., 2009).

Analyzované buňky jsou unášeny proudem nosné kapaliny a každá jednotlivá buňka prochází optickou částí, kde je osvětlena zdrojem světla (laser, UV lampa). Rozptyl světla a barevně definovaná fluorescence, kterou buňka emituje při excitaci zdrojem, je zaznamenána. Analýza buněk je založena na jejich relativní velikosti, granularitě, na tom, zda buňka nese fluorescenční molekulu a v jakém množství. Fluorescenční próba nám dává informaci o specificky definovaných parametrech jako jsou například povrchové receptory, membránový potenciál, pH, aktivita enzymů nebo obsah DNA. Je možné používat i několik flurochromů zároveň, kdy každý může mít stejnou excitační vlnovou délku, ale jinou emitující, což umožňuje simultánní měření několika různých parametrů (Fedr a kol.2013).

Signály z optiky jsou v detektorech převedeny na elektrické impulsy, které jsou zpracovány počítačovým programem. Pro jednotlivé buňky jsou generována multiparametrická data, která se ukládají do počítače. Výsledek je vyjádřen graficky v podobě jednoparametrového histogramu (osa x – intenzita signálu, osa y – četnost) nebo dvouparametrově pomocí dot plotů (Bursová a kol. 2014).

2.7.3. Princip flurometrie

Fluorimetrie je založena na podobném principu jako fluorescenční mikroskopie. Vzorek je ozářen světlem o určité vlnové délce. Emitované světlo prochází přes emisní filtr, který zachytí excitační světlo a do detektoru propustí jen požadovanou vlnovou délku, emitovanou fluoroforem. Metoda je vysoce citlivá, ale má řadu omezení (například citlivost fluoroforů na minimální změny pH, iontové síly nebo polaritu a na látky, „zhášející“ fluorescenci), (Matoušek, 2013).

V současné době se prudce rozvíjejí bioanalytické techniky využívající mikrotitrační destičky. I sem pronikla fluorimetrie a dnes jsou komerčně k dispozici čtečky ("readery"), které pomocí optických vláken umožňují měřit fluorescenci v jamkách destiček (Káš, 2007).

2.8. Metody rozlišení živých a mrtvých buněk

Zastoupení životaschopných neboli viabilních buněk v populaci je jednou z klíčových informací (Bránská a kol., 2011). Pro stanovení aktuální viability buněk ve vzorku je velmi často používaná metoda využívající trypanovou modř. Test vylučování trypanové modři je používán pro určení porušení strukturální integrity buněčné membrány. Barvivo nemůže prostoupit do buněk s neporušenou buněčnou membránou (živých buněk), to znamená, že tyto buňky zůstávají neobarvené. Pro prostup barvy musí být buněčná membrána již značně poškozená (mrtvé buňky), makromolekuly barviva těmito mezerami projdou a buňku obarví modře. Pomocí trypanové modři je možno detekovat asi 60% mrtvých buněk, protože pro detekci musí být buňky barvivem silně prostoupeny (Mascotti, 2000).

U mikroorganismů je nejčastější a zároveň i tradiční technikou stanovení životaschopnosti kultivace na pevných médiích. Tato metodika má ale svá omezení, a to zejména časovou náročnost, která neumožňuje dostatečně rychlou zpětnou odezvu na získaný výsledek. Problematické je taktéž její využití u těžko kultivovatelných

mikroorganismů, které za daných podmínek či v určitém fyziologickém stavu na povrchu pevných médií nerostou, byť mají zachovány své životní funkce (Bránská a kol. 2011). Tak je tomu i v případě intracelulárního parazita *Nosema* spp., který je zcela závislý na živinách a metabolických procesech hostitelské buňky (Webster a Aronstein, 2012).

Bránská a kol. (2011) uvádí, že z tohoto důvodu byly vyvinuty alternativní postupy stanovení viability. Významné postavení mezi nimi zaujímá polymerázová řetězová reakce (PCR). Standardní PCR však neumožňuje rozlišení DNA izolované z živých a mrtvých buněk. Intaktní DNA, amplifikovatelná pomocí PCR, může být přítomná i v mrtvých buňkách. Rozlišení DNA pocházející z živých a mrtvých buněk lze docílit kombinací metod stanovení membránové integrity a PCR. K testování membránové integrity lze použít barvení buněk ethidium monoazidem (EMA) nebo propidium monoazidem (PMA). Metoda je založena na poznatku, že barviva EMA/PMA nemohou vstoupit do cytoplazmy živých buněk s neporušenou cytoplazmatickou membránou a navázat se na DNA, zatímco do mrtvých buněk tato barviva procházejí, vážou se na DNA a brání její amplifikaci (Nocker a kol. 2006).

Další metodou nezávislou na kultivačních postupech je například fluorescenční analýza. Stanovení životaschopnosti buněk je založeno na detekci životně důležitých funkcí, které jsou sledovány pomocí selektivního značení fluorescenčními sondami. Ke sledování značených buněk je tradičně využíván fluorescenční mikroskop, který poskytuje náhled na jednotlivé buňky, počet analyzovaných částic za určitou dobu je však omezený a i s využitím analyzátorů obrazu mnohdy pracný. Fluorimetry naopak mohou měřit velký počet buněk, ale neumožňují pohled na vlastnosti konkrétní buňky. K velkému rozvoji fluorescenčního značení tak vedlo především rozšíření průtokové cytometrie, která umožňuje analýzu jednotlivých buněk rychlostí až několik tisíc částic za sekundu (Bránská a kol., 2011).

Z hlediska principu detekce viability lze fluorescenční sondy rozdělit do několika následujících skupin: nejčastějšími jsou měření intracelulární esterázové aktivity, sledování integrity buněčné membrány a existence transmembránového potenciálu, v menší míře je pak u mikroorganismů využívána detekce respirační aktivity či měření intracelulárního pH (Breeuwer, 2000). Stanovení viability buněk pomocí detekce membránové integrity je založeno na aplikaci látek, které za běžných podmínek neprocházejí neporušenými buněčnými membránami, případně jsou ihned vylučovány zpět do extracelulárního prostředí. Naopak, je-li cytoplazmatická membrána narušena

natolik, že mohou do buňky projít, dojde k vazbě na složky buněčné hmoty a k zesílení a/nebo posunu spektra fluorescence. Buňky s takto narušenými membránami či membránovými funkcemi nejsou považovány za životaschopné. Do této skupiny patří vůbec nejrozšířenější fluorescenční sonda propidium jodid (Bránská a kol. 2011).

Kombinování barviva k rozlišování mrtvých a živých buněk (PI nebo Sytox green) s dobarvováním (Calcofluor nebo DAPI) je všeobecná metoda pro posuzování životaschopnosti spor mikroskopidií, která byla zavedena již v předchozích studiích (Fenoy a kol. 2009, Green a kol. 2000).

2.8.1. Propidium iodide

Jedná se o jednu z nejvíce používaných sond, používaných pro stanovení viability. Živé buňky se od mrtvých liší schopností vylučovat molekuly propidium iodidu, popř. molekulám úplně zabránit v proniknutí skrze plazmatickou membránu, což u mrtvých buněk s poškozenou membránou není možné. Velkou výhodou této sondy je její široké využití ať už u eukaryotických či prokaryotických buněk. Další výhodou je jednoduchost použití, emitované světlo je jasné a výsledky přesné (Nevel a kol. 2013). V mrtvých buňkách se PI interkaluje mezi vlákna DNA a emituje světlo převážně v červené oblasti světelného spektra. Vazbou na DNA se 20 – 30x zvyšuje jeho fluorescenční signál. Excitační maximum u PI je 535nm a jeho emisní maximum 617nm. Metodické a přístrojové využití propidium iodidu je široké, hodí se jak pro cytometrické stanovování, tak i pro fluorescenční mikroskopii (McCarthy a kol. 2001). Peng (2014) uvádí, že molekuly membránově nepropustných barviv jako je PI jsou větší ve srovnání s buněčně propustnými barvivy a procházejí tedy pouze přes fyzicky porušené buněčné membrány.

2.8.2. DAPI

Dalším barvivem, vážícím se na DNA je DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol). Při vysokých koncentracích tento fluorofor proniká i přes nepoškozenou plazmatickou membránu živých buněk (Hughes a Mehmet, 2003) a barví tedy živé i mrtvé buňky (Falugi a kol. 2015). Do buněk s poškozenou membránou však proniká mnohem snáze. Živé buňky od mrtvých se tak dají rozlišit podle různé intenzity fluorescence (ThermoFisher, online). Živé spory, obarvené DAPI, fluoreskují modře, mrtvé spory intenzivně modro-bíle (Papežíková a kol. 2016). Jež (2016) uvádí, že maximální

excitace celku DAPI-DNA je dosažena UV-zářením o vlnové délce 358 nm, maximum emise probíhá v oblasti viditelného světla s vlnovou délkou 461 nm.

3. Materiál a metodika

V rámci diplomové práce bylo provedeno srovnání metod k rozlišení živých a devitalizovaných mikrosporidií rodu *Nosema*, konkrétně se jedná o porovnání výsledků z fluorescenční mikroskopie a fluorimetrie a o srovnání průtokové cytometrie s fluorescenční mikroskopií. Pod fluorescenčním mikroskopem byly vyhodnoceny snímky spor, obarvených fluorescenčními barvivy DAPI a PI. Dále bylo provedeno i barvení spor pomocí trypanové modři a porovnání účinnosti metod, devitalizujících spory - teplené inaktivace, ošetření ultrazvukem a použití detergentu Triton - X100.

3.1. Přehled použitých chemikálií a roztoků

Propidium iodide - viz. kapitola 2.8.1 Propidium ioide

DAPI- viz. kapitola 2.8.2. DAPI

Trypanová modř- viz. kapitola 2.8. Metody rozlišení živých a mrtvých buněk

Percoll- Percoll je vyráběn speciálně pro účely centrifugace. Percoll je suspenze koloidních silikonových částic o průměru 15-30 nm. Koloidní částice jsou pokryty polyvinyl - pyrrolidinem (PVP), který minimalizuje jejich interakci s biologickým materiálem a stabilizuje je. Osmotická síla percollu je velmi nízká a málo se mění s hustotou (Sharpe, 1988).

Cell wash – roztok pro průtokovou cytometrii (navážka na 2 l destilované vody)

Chemikálie	Množství
NaCl	16g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	5,78g
KCl	0,4g
KH ₂ PO ₄ (PBS)	0,4g
EDTA	3,68g
NaN ₃ (azid sodný)	2g
Želatina	8ml

PBS - Fosfátový pufr (neboli PBS - phosphate buffered solution) je vodný roztok hydrogenfosforečnanu sodného, chloridu sodného, a v některých formách i chloridu draselného a dihydrogenfosforečnanu draselného. Jedná se o nejčastěji využívaný

pufrovací roztok v biologických výzkumech, převážně ke stabilizaci pH v neutrální a lehce zásadité oblasti (zhruba pH 6 - 8,5), (Kanoatov, 2016).

Triton X - 100 - Jedna z nejvíce využívaných neiontových povrchově aktivních látek používaná pro lýzu buněk (např. před extrakcí bílkovin nebo buněčných organel) nebo k permeabilizaci membrán živých buněk pro transfekci (Koley, 2017).

3.2. Příprava zásobních roztoků DAPI a PI

Obě fluorescenční barviva byla naředěna na koncentraci 1 mg/ml. 1 mg práškového fluorescenčního barviva byl rozpuštěn v 1 ml destilované vody. Oba zásobní roztoky byly skladovány v lednici při 4°C.

3.3. Příprava vzorků

Spory byly získány z přirozeně infikovaných včel. Mrtvé včely byly před zpracováním skladovány v lednici. Zadečky z 50 včel byly nastříhány do třecí misky a zhomogenizovány v 5 ml destilované vody. Poté byl obsah misky přefiltrován přes dvojitou vrstvu gázy. Při pozorování pod mikroskopem při zvětšení 40x-100x byla v nátěru na podložním sklíčku zjištěna přítomnost spor *Nosemy*. Morfologii spor v získaném filtrátu jsme porovnali s čistými suspenzemi spor *Nosema apis* a *Nosema ceranae* z archivu Ústavu ekologie, chorob zvířet, ryb a včel VFU. Spory, přítomné v našem vzorku jsme identifikovaly jako *N. ceranae*. Spory *N. ceranae* byly viditelně menší než spory *N. apis* a konce měly více zašpičatělé. Jak již bylo uvedeno, mikroskopické vyšetření je považováno pouze za orientační (Giersch a kol., 2009), a pro spolehlivou identifikaci druhu je nutné provést PCR (Fries a kol, 2013).

3.4. Izolace spor

Izolaci spor jsme provedly pomocí gradientové centrifugace na médiu Percoll (Sigma-Aldrich, Německo).

Připravily jsme si 4 zkumavky s Percollem o různých koncentracích - 25%, 50%, 75% a 95%. Poté jsme na sebe navrstvily do mikrozkušavek jednotlivé koncentrace Percollu od nejvyšší koncentrace po nejnižší. Na hladinu (nejnižší koncentrace) jsme opatrně navrstvily filtrát, získaný při předchozí přípravě vzorků. Poté jsme vzorky umístily do centrifugy, kde probíhala centrifugace při 10000 otáčkách/min

a laboratorní teplotě po dobu 10 min. Spory jsou nejtěžší a po centrifugaci vytvoří pelet na dně mikrozkuhavky. Většina dalšího materiálu zůstane na hladině a nebo je zachycena jednotlivými vrstvami Percollu. Supernatant byl opatrně odstraněn, spory byly rozsuspendovány ve 100 mikrolitrech PBS a celý proces gradientové centrifugace byl opakován ještě jednou, aby byla získána co nejčistší suspenze spor. Získané spory byly rozsuspendovány v 1 ml PBS, pH 7,1 a až do použití skladovány v ledničce při 4°C. Spory *Nosema ceranae* je možné tímto způsobem skladovat v ledničce minimálně dva měsíce, aniž by ztratily životnost (McGowan, 2012).

3.5. Barvení trypanovou modří

K barvení byla použita 0,4% trypanová modř, kterou jsme přidali k nativní suspenzi vyizolovaných spor v poměru 1:1 (10 μ l : 10 μ l) na podložní sklíčko. Přikryli jsme krycím sklíčkem a pozorovali pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 51 pod bílým světlem.

3.6. Příprava vzorků na měření

Nejprve jsme vyizolované spory důkladně promíchali a rozdělili na dvě poloviny. Jedna polovina spor byla tepelně inaktivována (zahřívání suspenze na teplotu 95°C po dobu 30 minut). Poté jsme smíchali nativní a tepelně inaktivované spory v různých poměrech. Byly připraveny směsi se 100%, 75%, 50%, 25% a 0 % podílem inaktivovaných spor.

3.7. Průtoková cytometrie

Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru FACScalibur. Spory byly rozsuspendovány v 50 mikrolitrech fosfátového pufru (pH 7,1). Poté jsme je obarvily fluorescenčním barvivem propidium iodide (0,01 mg/ml) a promíchaly. Následovalo promytí suspenze 1 ml roztoku Cell Wash. Poté byla suspenze zcentrifugována (rychlost 1500 otáček za minutu, čas 5 minut, laboratorní teplota). Poté jsme opatrně odsály supernatant, spory byly rozsuspendovány ve 100 mikrolitrech Cell Wash, přepipetovány do zkumavek na průtokovou cytometrii a analyzovány. Jako první byla analyzována nativní suspenze (0% tepelně inaktivovaných spor), a poté tepelně inaktivovaná suspenze (100 % tepelně inaktivovaných spor). Na základě výsledků byl

vytvořen gate (byla definována oblast, v níž se na dot plotu vyskytují mrtvé spory). Poté byly analyzovány zbývající vzorky. V každém vzorku bylo analyzováno 20000 spor. Zbytky směsí byly uchovány a následně obarveny fluorescenčními barvivý a vyfotografovány pod fluorescenčním mikroskopem pro pozdější vyhodnocení a srovnání.

3.8. Měření na fluorimetru

Měření bylo prováděno na multifunkčním modulárním readeru pro měření fluorescence, absorbance a luminiscence - Tecan Infinite M 200.

Připravili jsme celkem 5 směsí (se 100%, 75%, 50%, 25% a 0% podílem tepelně inaktivovaných spor) po 300 μ l. Do jamek bylo pipetováno vždy 40 μ l spor celkem v šesti paralelách. Zásobní směsi byly před pipetováním důkladně promíchávány, aby výsledky nebyly zkresleny rozdílným množstvím spor v jednotlivých jamkách. Do jamek bylo následně přidáno po 100 μ l PBS (pH 7,1) s PI (koncentrace 0,01 mg/ml). U každé koncentrace spor byl měřen i blank - blank č. 1 (40 μ l PBS + 100 μ l PBS s 0,01 mg/ml PI) a blank č. 2 (40 μ l spor + 100 μ l PBS bez PI). Zbytky směsí byly uchovány a následně obarveny fluorescenčními barvivý a vyfotografovány pod fluorescenčním mikroskopem pro pozdější vyhodnocení a srovnání.

Kromě tepelné inaktivace byly otestovány i další způsoby inaktivace spor – ošetření ultrazvukem a permeabilizace plazmatické membrány pomocí detergentu Triton X - 100. Suspenze spor byla rozdělena na tři části. První díl byl inaktivován teplem (ve vodní lázni 95°C po dobu 30 minut), druhý byl ošetřen po dobu dvou minut v ultrazvukové lázni a poslední byl po dobu 10 minut inkubován s 0,2% roztokem detergentu Triton X-100 v PBS. Ošetřené suspenze spor byly následně rozpipetovány do jamek a byl přidán PBS s propidium iodidem (0,01 mg/ml), podobně jako u předchozího měření.

3.9. Fluorescenční mikroskopie

Vzorky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 51. K 18 mikrolitrům suspenze spor jsme přímo na podložním sklíčku přidaly 2 mikrolitry DAPI (Sigma-Aldrich, Německo), nebo 2 mikrolitry PI (Sigma-Aldrich, Německo). Finální koncentrace byla u obou fluorescenčních barviv 0,1 mg/ml. Kapku suspenze

obarvených spor jsme přikryly krycím sklem a pozorovaly. U vzorků, obarvených DAPI byla použita sestava UMWU2 - zrcadlová kostka se zabudovaným excitačním filtrem (BP 330 – 385), dichroickým zrcadlem (DM 400) a bariérovým filtrem (BA 420). U vzorků, obarvených PI byla použita sestava UMWIG3 - zrcadlová kostka se zabudovaným excitačním filtrem (BP 530 - 550), dichroickým zrcadlem (DM 570) a bariérovým filtrem (BA 575 IF).

3.10. Pořízení fotodokumentace a vyhodnocení

U barvení DAPI jsme u každého vzorku vyfotografovaly čtyři zorná pole (zvětšení 400x) pod fluorescenčním filtrem. Byly spočítány modře fluoreskující spory (živé) a spory, fluoreskující jasně modro – bíle (mrtvé). Bylo vypočítáno procento mrtvých spor ve vzorku. V každém vzorku bylo vyhodnoceno minimálně 200 spor.

U barvení PI jsme u každého vzorku vyfotografovaly čtyři zorná pole (zvětšení 400x) pod fluorescenčním filtrem a tatáž zorná pole bez fluorescenčního filtru. Při vyhodnocování jsme porovnávaly snímek, pořízený pod fluorescenčním filtrem, se snímkem téhož zorného pole bez filtru. Byly spočítány všechny spory v zorném poli (snímek bez filtru) a poté všechny mrtvé, červeně fluoreskující spory (snímek pod filtrem). Byl vypočítán podíl mrtvých spor ve vzorku. V každém vzorku bylo vyhodnoceno minimálně 200 spor.

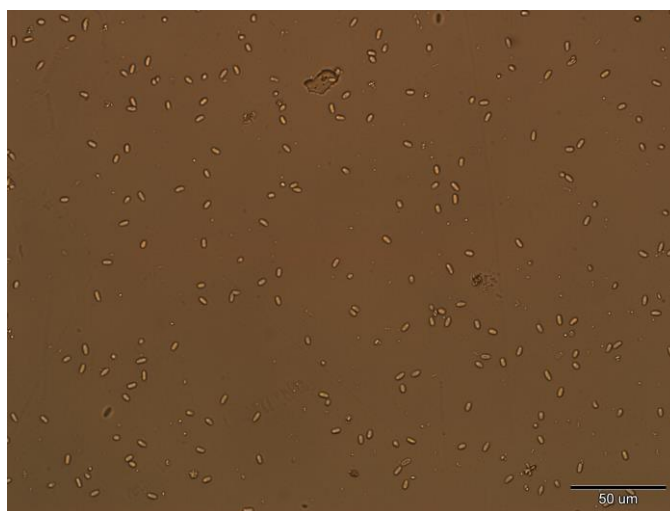
3.11. Statistické vyhodnocení výsledků

Statistické zpracování dat bylo provedeno v programu Microsoft Excel. Porovnání dat bylo provedeno pomocí Studentova t-testu. Data, uvedená v tabulkách a grafech představují průměr $\pm$ střední chybu průměru. Označení statistických průkazností mezi hodnocenými metodami je v grafech znázorněno symbolem ** při hladině významnosti $\leq 0,01$.

4. Výsledky a diskuze

Životaschopnost spor mikrosporidií je obvykle stanovována infekčními testy (experimentální infekcí vnímavého hostitele) nebo *in vitro*, určením schopností spor germinovat po kontaktu s germinačním roztokem, alternativně může být životaschopnost určena pomocí barvicích technik, jako je např. barvení trypanovou modří (Sánchez, 2014). Další rozšířenou metodou ke stanovování životaschopnosti mikrosporidií je použití fluorescenčních barviv či jejich kombinací (Fenoy a kol. 2009, Green a kol. 2000). K vyhodnocení intenzity fluorescence je možné použít automatizované metody jako je průtoková cytometrie nebo fluorimetrie (Sánchez, 2014). V této diplomové práci byly při posuzování viability srovnávány zmíněné metody - průtoková cytometrie a fluorimetrie s fluorescenční mikroskopií.

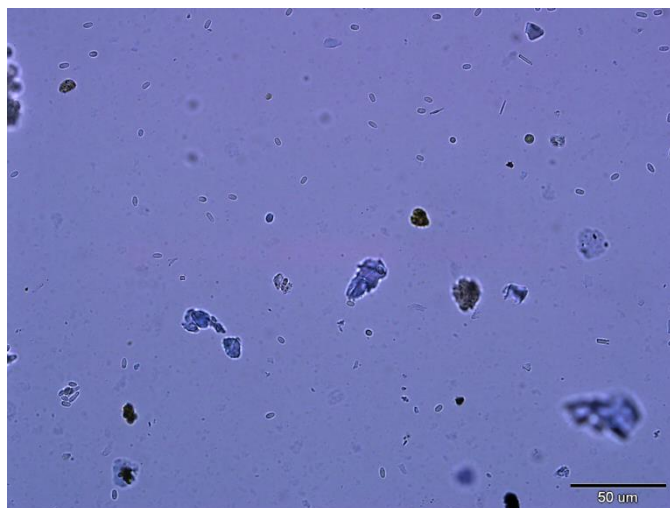
Papežíková a kol. (2015) uvádí, že v České republice jsou včely napadeny buď pouze druhem *N. ceranae* nebo se může jednat o smíšenou infekci oběma druhy (*N. ceranae* a *N. apis*). Podle Kamlera (2011) lze při mikroskopickém vyšetření pozorovat patrný rozdíl ve velikosti a tvaru spor u obou druhů. Pomocí gradientové centrifugace se podařilo získat relativně čistou koncentrovanou suspenzi spor a při pohledu pod mikroskopem (obrázek č. 1) lze vidět, že se jedná pouze o spory druhu *N. ceranae*.



Obrázek č. 1: Suspenze spor *Nosema* spp. (zvětšení 400x)

Barvení trypanovou modří (Trypan blue exclusion test) je běžně používáno k rozlišení živých a mrtvých buněk v buněčných kulturách. Výhodou tohoto barvení je, že k vyhodnocení životnosti stačí běžný světelný mikroskop. Přestože bylo popsáno

úspěšné použití tohoto barvení i u spor *Nosemy* (Webster 2012, Martín-Hernández a kol., 2009; Higes a kol., 2010 (a)), nám se neosvědčilo. Spory se barvily nevýrazně a živé od mrtvých bylo obtížné rozlišit. K dalším testům bylo tedy používáno značení fluorescenčními barvivy. Rovněž Strober (2001) udává získání daleko přesnějších výsledků u mikrosporidií pomocí fluorescenčních barviv ve srovnání s barvením trypanovou modří.



Obrázek č. 2: Spory *Nosema* spp. obarvené trypanovou modří (zvětšení 400x)

Značení spor mikrosporidií rodu *Nosema* fluorescenčními barvivy za účelem odlišení živých a mrtvých bylo popsáno několika autory. Green a kol. (2000) ve své studii k rozlišení mrtvých a živých spor mikrosporidií používal dvojí barvení - Sytox green a Calcofluor White M2R, Fenoy a kol. (2009) využil k Sytox green barvivo DAPI. Peng a kol. (2014) ve své práci porovnává dokonce účinky dvou různých kombinací fluoroforů - SYTO a SYBR, a dále PI a SYTOX. McGowan (2012) uvádí, že po provedení předběžných experimentů u výše zmiňovaných barviv bylo rozhodnuto, že kombinace fluorescenčních barviv DAPI/PI je k posuzování životnosti spor nejvhodnější, protože měly ze všech testovaných fluoroforů nejmenší autofluorescenci a barvily spory dobře rozlišitelnými barvami. My jsme testovali právě tato dvě fluorescenční barviva, která jsme však na rozdíl od McGowan nekombinovali, ale používali samostatně:

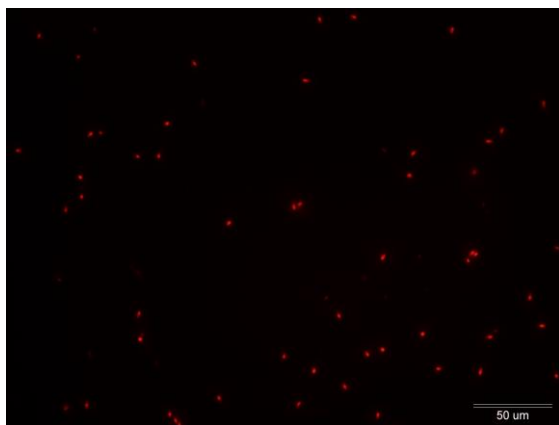
DAPI – Jak již bylo uvedeno, DAPI lze použít k barvení jak živých tak mrtvých buněk, do buněk s poškozenou membránou však proniká mnohem snáze. Živé buňky od

mrtvých se tak dají rozlišit podle různé intenzity fluorescence. Živé spory fluoreskují slabě modře, mrtvé spory výrazně modro – bíle.

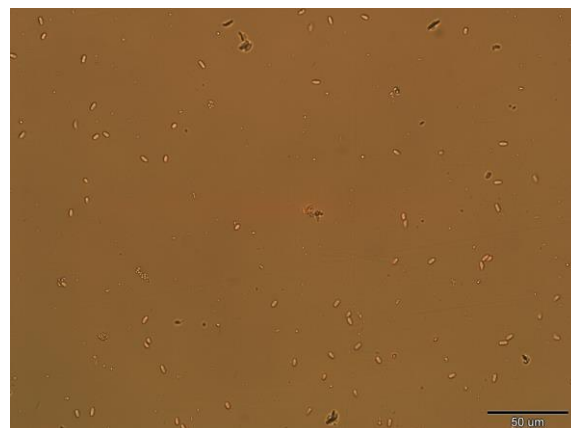


Obrázek č. 3: Spory obarvené fluorescenčním barvivem DAPI (zvětšení 400x)

Barvení propidium iodidem – živé spory nefluoreskují, mrtvé spory fluoreskují červeně (vlevo foto pod fluorescenčním filtrem, vpravo foto téhož zorného pole bez filtru, zvětšení 400x)



Obrázek č. 4: Spory obarvené PI

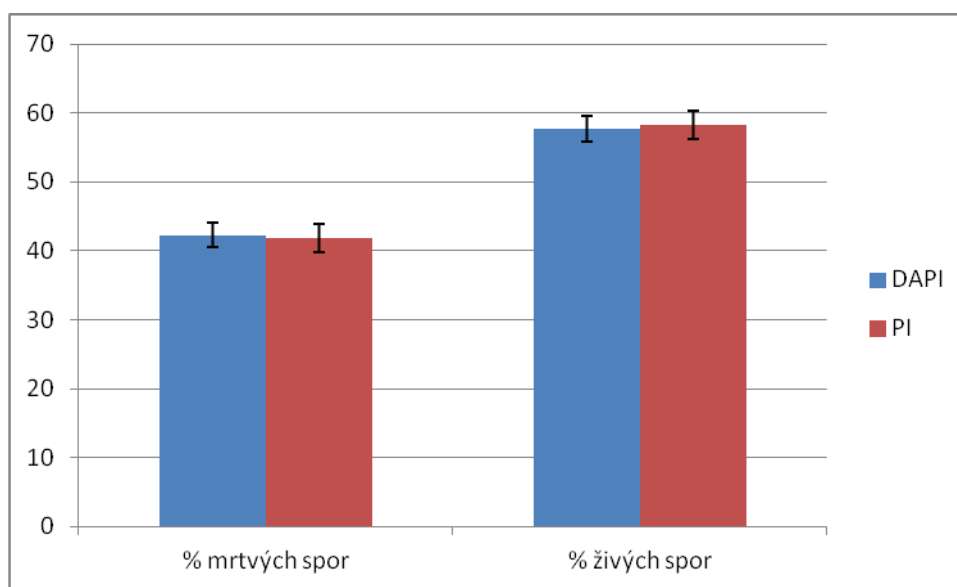


Obrázek č.5: Nativní pole

4.1.Srovnání fluorescenčních barviv

Pro vyhodnocení životnosti pomocí fluorescenční mikroskopie byl použit DAPI a PI. Výhodou fluorescenční mikroskopie je přímá kontrola úspěšnosti barvení. Nevýhodou je velká pracnost při vyhodnocování, které je náročné na lidskou práci a obecně nižší přesnost (kvůli malému počtu vyhodnocených spor) než u následujících metod.

Provedli jsme srovnání obou fluorescenčních barviv. Suspenzi spor *N. ceranae*, v níž byly obsaženy živé i mrtvé spory jsme obarvili DAPI anebo PI. U barvení DAPI jsme vyfotografovali pět zorných polí pod 200 násobným zvětšením. U barvení PI jsme vyfotografovali pět zorných polí pod 200 násobným zvětšením pod fluorescenčním filtrem a tatáž zorná pole pod bílým světlem. Provedli jsme vyhodnocení životnosti a srovnání obou způsobů barvení. K vyhodnocení bylo použito vždy nejméně 200 spor. Výsledky jsou zaznamenány v následujícím grafu.



Graf č. 1: Srovnání barvení fluorescenčními barviv DAPI a PI

Zjištěné procentuální zastoupení živých a mrtvých spor v suspenzi bylo u obou barvení srovnatelné, mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky výrazný rozdíl. Oba typy barvení lze tedy úspěšně použít k rozlišení živých a devitalizovaných spor.

Výhodou DAPI oproti PI je, že živé i mrtvé spory se dají odečítat z jednoho snímku takže není potřeba porovnávat každé zorné pole se snímkem téhož pole, pořízeným bez fluorescenčního filtru. Z tohoto důvodu bylo v další práci pro stanovení životnosti pomocí fluorescenční mikroskopie vždy použito pouze barvení DAPI.

V další práci byla srovnávána průtoková cytometrie a fluorimetrie s fluorescenční mikroskopií. Fluorescenční mikroskopie byla pro srovnání s oběma dalšími metodami vybrána proto, že při mikroskopování máme pod přímou vizuální kontrolou jak výsledek barvení, tak čistotu suspenze.

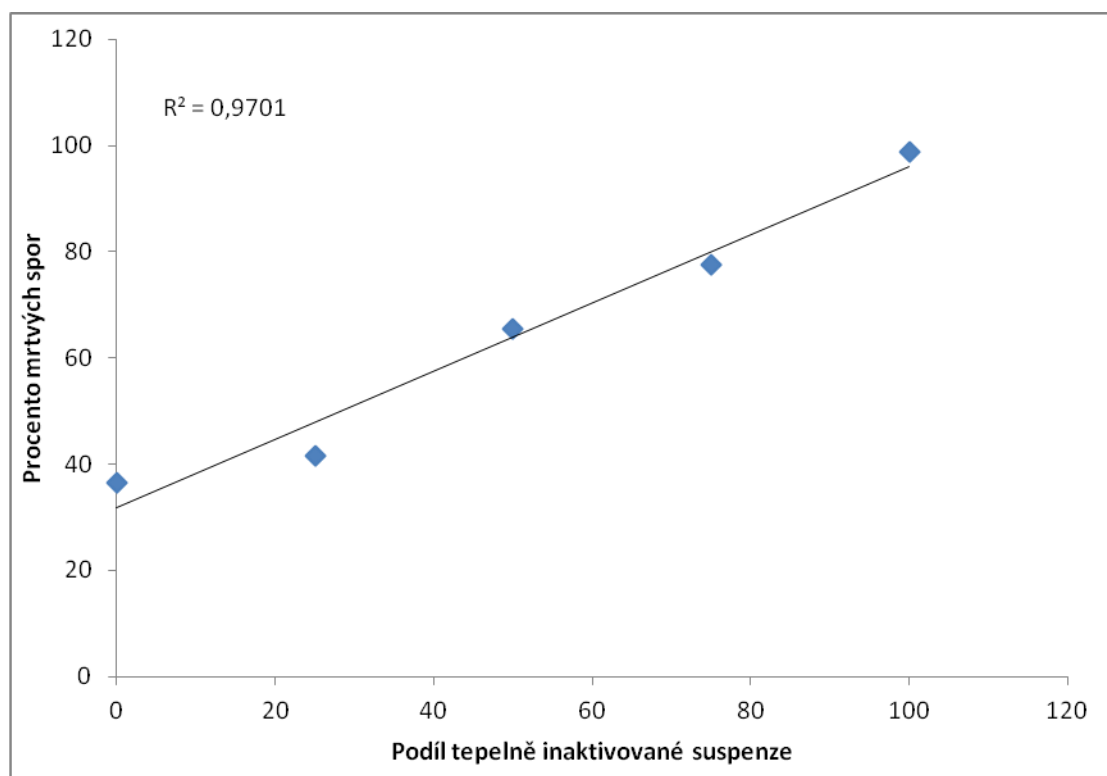
4.2. Srovnání průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie

4.2.1. Fluorescenční mikroskopie

Bylo testováno, zda je mezi zjištěným procentuálním zastoupením mrtvých spor a procentem tepelně inaktivované suspenze ve vzorku lineární závislost. K obarvení suspenze bylo použito barvení DAPI.

Podíl tepelně inaktivované suspenze (%)	Mrtvé spory (%)
0	36,6 ± 4,7
25	41,5 ± 11,5
50	65,4 ± 4,3
75	77,5 ± 2,8
100	98,8 ± 3,4

Tabulka č. 1: Fluorescenční mikroskopie. Procentuální zastoupení mrtvých spor, naměřené v jednotlivých směsích. Hodnoty představují průměr ± SEM.



Graf č. 2: Fluorescenční mikroskopie. Závislost mezi podílem tepelně inaktivované suspenze ve vzorku a naměřenými hodnotami (% usmrcených spor).

Mezi podílem mrtvých spor, napipetovaných v jednotlivých suspenzích a zjištěnými hodnotami byla lineární závislost ($R^2 = 0,97$) (graf č. 2). Absolutní hodnoty (tabulka č. 1) neodpovídaly přesně podílu tepelně inaktivované suspenze ve směsi, jelikož v suspenzi spor, vyizolované ze včel, se již může určité procento mrtvých spor vyskytovat. Například Sánchez (2014) ve své studii uvádí, že před začátkem experimentů byla bazální mortalita spor pouze po použití Percollu již průměrně 28,26% u spor *N. apis* a 14,65% u spor *N. ceranae*.

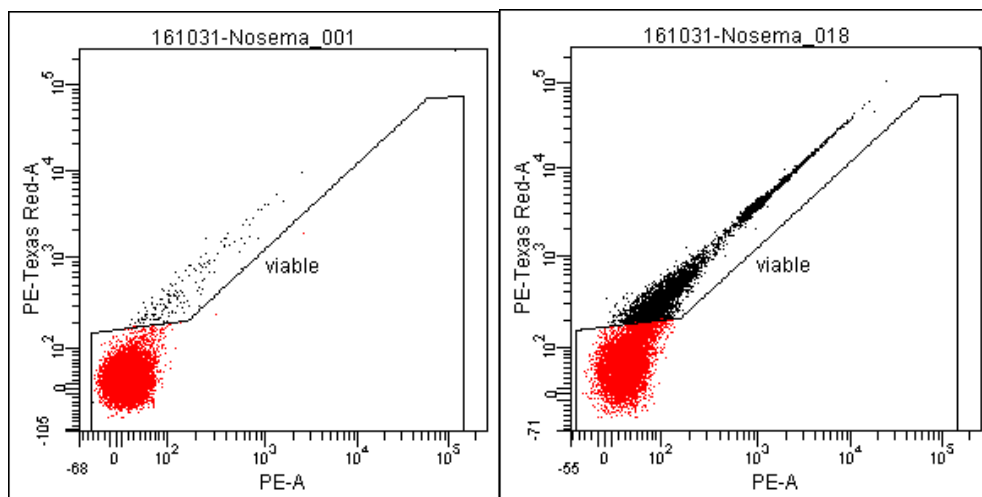
Vysoká lineární závislost ukazuje na vysokou přesnost, navzdory původnímu předpokladu, že přesnost bude nižší kvůli malému počtu vyhodnocených spor. Pro každý vzorek bylo vyhodnoceno minimálně 200 spor. Tento počet se tedy pro vyhodnocení životnosti ukázal jako dostatečný.

4.2.2. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je vysoce citlivá metoda ke sledování řady vlastností buněk v suspenzi (Toman a kol. 2009). Hlavní předností FCM je vysoká frekvence analýzy jednotlivých buněk. Moderní analyzátoři i sortery dokáží zpracovat za vteřinu tisíce buněk (nebo jiných mikroskopických objektů) unášených v okamžiku analýzy rychlostí několika metrů za vteřinu (Šinkorová a Zárybnická, 2008). Průtoková cytometrie je hojně využívána i při analýzách mikrosporidií, např. *Encephalitozoon cuniculi* (Franzen, 2014) nebo *Microsporidium ovoideum* (Amigó, 1994) a úspěšně byla použita v několika studiích zabývajících se přímo rozlišením živých a mrtvých buněk u *Nosema* spp. Podle Penga (2014), který ve své studii testoval využití průtokové cytometrie při zjišťování životnosti spor *Nosema apis* je to velmi spolehlivá a vhodná metoda. Rovněž Sánchez (2014) udává úspěšné využití průtokové cytometrie při zjišťování viability u spor *N. apis* a *N. ceranae*.

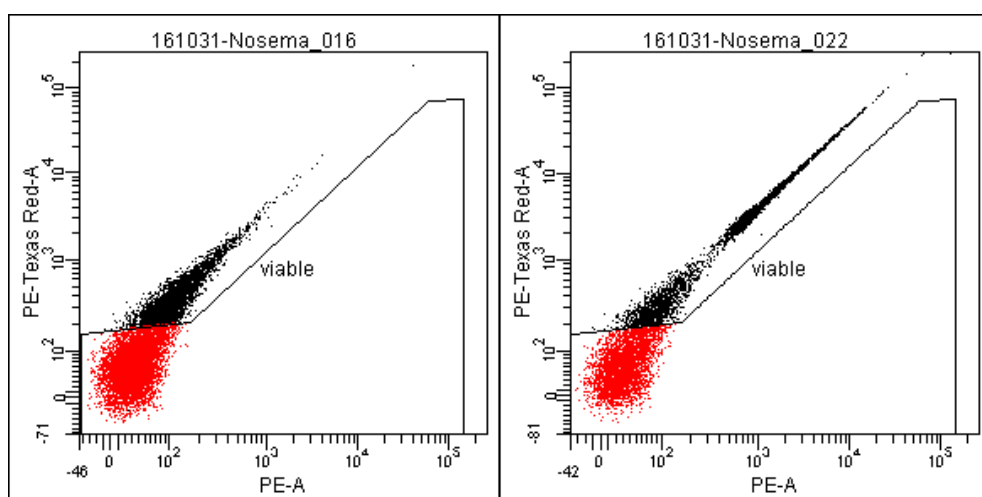
Stejně jako u fluorescenční mikroskopie bylo zjišťováno, zda je mezi naměřeným procentem mrtvých spor a procentem tepelně inaktivované suspenze ve vzorku lineární závislost.

Na následujících dot plotech lze vidět rozložení populací živých a mrtvých spor. Procenta znázorňují podíl mrtvých spor v suspenzi.



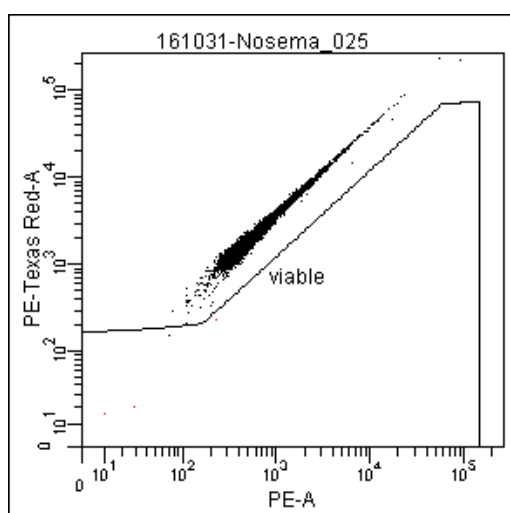
Obrázek č. 6: Suspenze 0%

Obrázek č.7: Suspenze 25%



Obrázek č. 8: Suspenze 50%

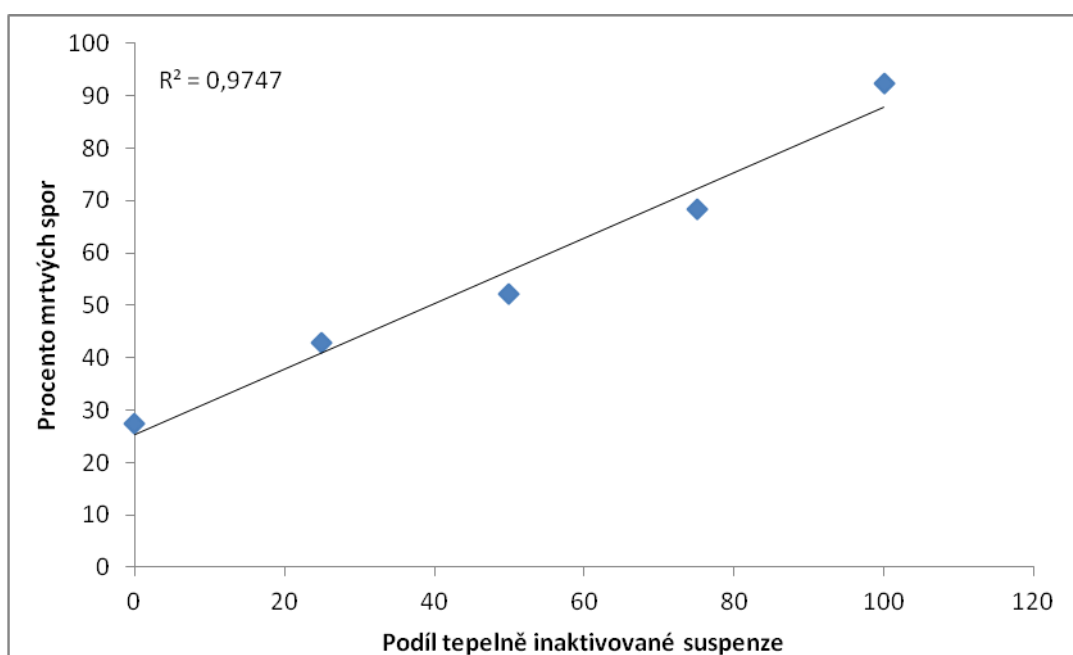
Obrázek č. 9: Suspenze 75%



Obrázek č. 10: Suspenze 100%

Podíl tepelně inaktivované suspenze (%)	Mrtvé spory (%)
0	27,3 ± 3,8
25	42,9 ± 1,3
50	52,1 ± 0,4
75	68,5 ± 1,3
100	92,5 ± 4,4

Tabulka č. 2: Průtoková cytometrie. Procentuální zastoupení mrtvých spor, naměřené v jednotlivých směsích. Hodnoty představují průměr ± SEM.



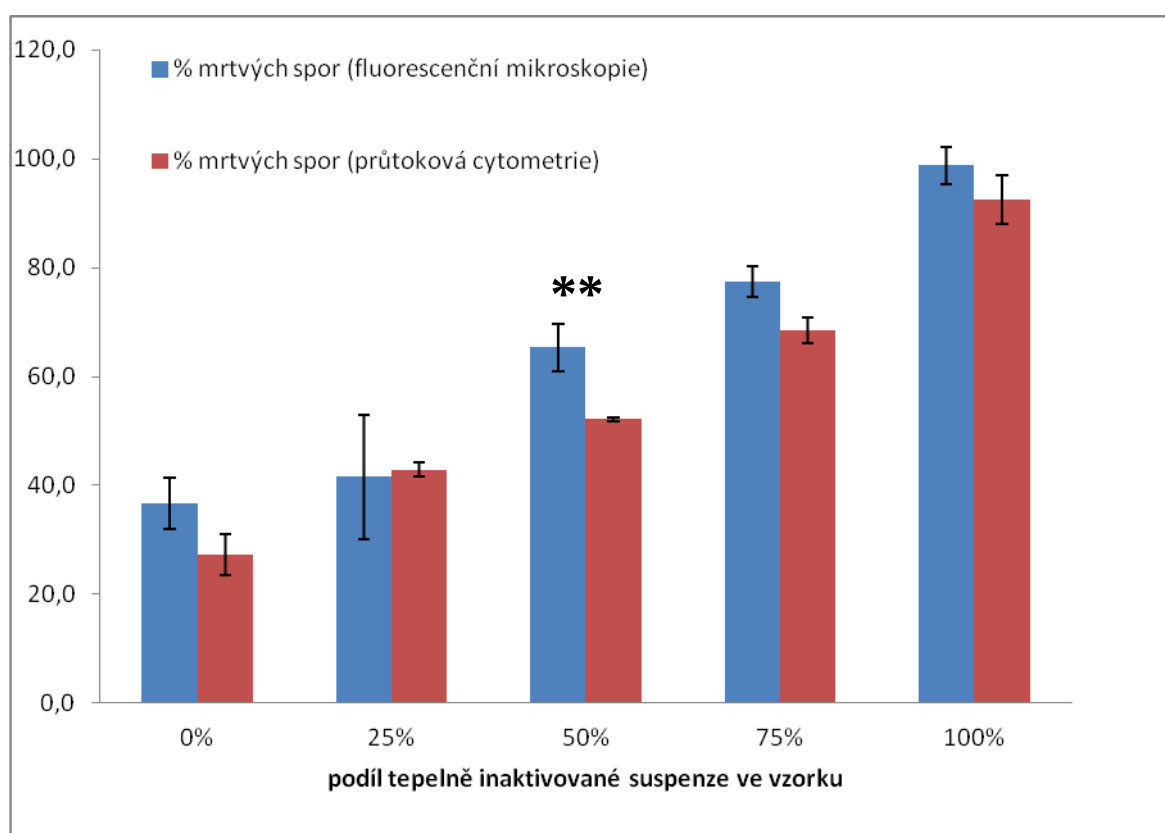
Graf č. 3: Průtoková cytometrie. Závislost mezi podílem tepelně inaktivované suspenze ve vzorku a naměřenými hodnotami (% usmrčených spor).

Byla zjištěna lineární závislost a vysoký stupeň korelace ($R^2 = 0,974$) mezi podílem tepelně inaktivované suspenze, napipetované ve směsi a mezi zjištěným procentem PI – pozitivních spor (Graf č. 3).

Výhodou této metody je již zmiňovaná velká rychlost měření, vyhodnocujeme vysoký počet částic s vysokou přesností. Dále je na dot plotu možné odlišit nežádoucí objekty (nečistoty, prach, pylová zrna). Pro úspěšné měření je potřeba mít suspenzi spor o vysoké čistotě. Měření také vyžaduje zkušenost, pro správné vymezení oblasti, ve které se na dot plotu vyskytují živé a mrtvé spory (gate).

Podíl tepelně inaktivované suspenze	% mrtvých spor (fluorescenční mikroskopie)	% mrtvých spor (průtoková cytometrie)	Statistická významnost (p)
0%	36,6 ± 4,7	27,3 ± 3,8	0,135
25%	41,5 ± 11,5	42,9 ± 1,3	0,630
50%	65,4 ± 4,3	52,1 ± 0,4	0,002
75%	77,5 ± 2,8	68,5 ± 2,3	0,233
100%	98,8 ± 3,4	92,5 ± 4,4	0,282

Tabulka č. 3: Srovnání výsledků, zjištěných pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie. Data představují průměr ± SEM.



Graf č. 4: Srovnání výsledků, zjištěných pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Data představují průměr ± SEM. Statisticky významné rozdíly mezi výsledky jsou dvěma hvězdičkami ($p < 0,01$).

Životnost spor v jednotlivých suspenzích, zjištěná pomocí fluorescenční mikroskopie, byla mírně nižší než životnost, zjištěná průtokovou cytometrií. Statisticky významný rozdíl však byl zjištěn pouze v suspenzi s 50% mrtvých spor. Peng (2014) uvádí, že fluorescenční mikroskopie má ve srovnání s průtokovou cytometrií sklon podhodnocovat viabilitu spor (tj. více spor je zařazeno mezi mrtvé). Důvodem by mohlo

být použití vyšší koncentrace PI, který může vliv na životaschopnost spor, a při delší expozici (než jsme stihli spory vyfotografovat pod fluorescenčním mikroskopem) může část spor usmrtit, jak rovněž Peng (2014) udává ve své studii. Z našich výsledků vyplývá, že obě metody jsou vhodné k použití pro zjišťování životnosti spor *Nosema* spp., ovšem průtoková cytometrie je mnohem rychlejší a méně náročná.

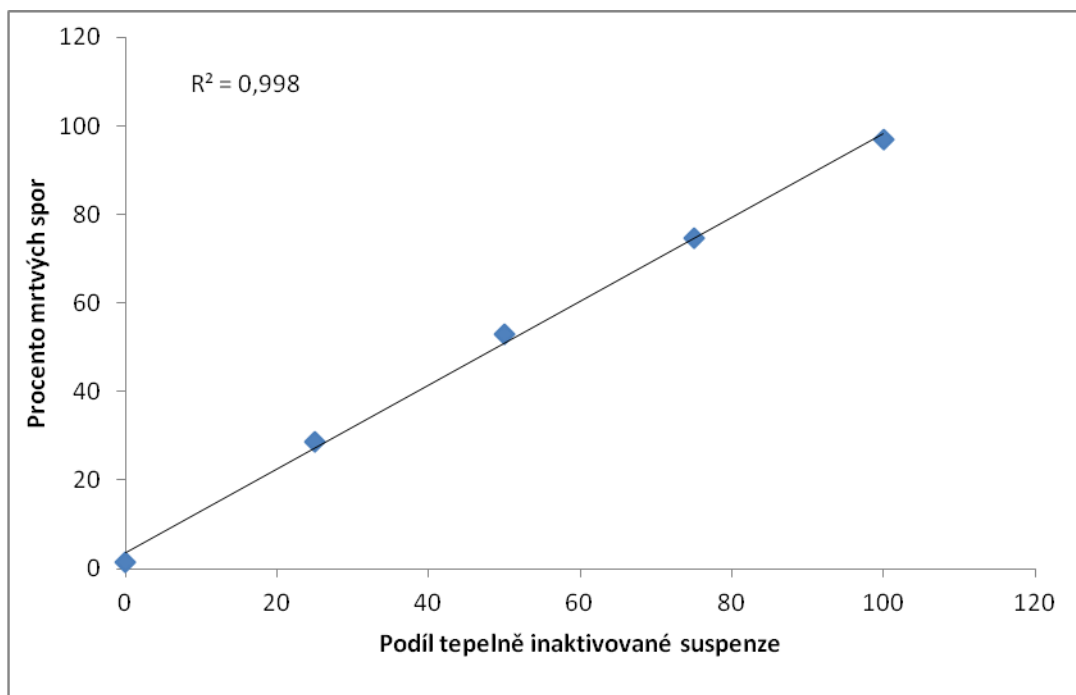
4.3. Srovnání fluorimetrie a fluorescenční mikroskopie

4.3.1. Fluorescenční mikroskopie

Stejně jako u předchozího měření bylo testováno, zda zjištěný poměr živých a usmrcených spor odpovídá skutečnému poměru, přítomnému ve vzorku. K obarvení suspenze bylo rovněž použito barvení DAPI.

Podíl tepelně inaktivované suspenze (%)	Mrtvé spory (%)
0	1,6 ± 17,8
25	28,6 ± 4,9
50	53,0 ± 18,0
75	74,6 ± 5,8
100	97,0 ± 0,9

Tabulka č. 4: Fluorescenční mikroskopie. Procentuální zastoupení mrtvých spor, naměřené v jednotlivých směsích. Hodnoty představují průměr ± SEM.

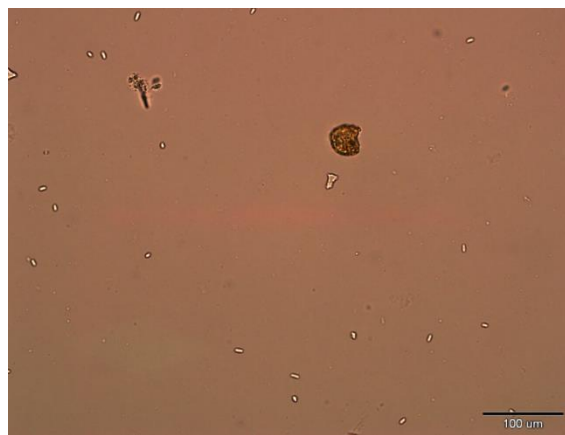
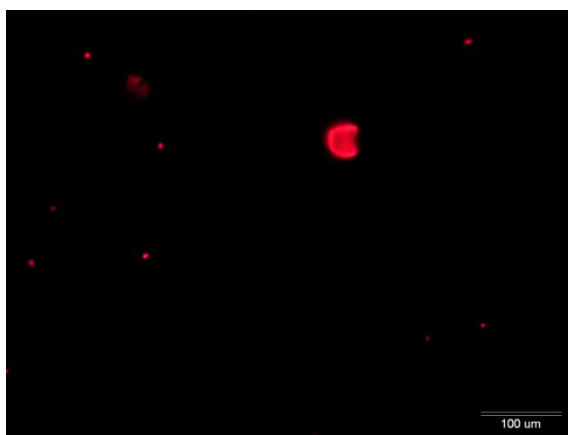


Graf č. 5: Fluorescenční mikroskopie. Závislost mezi podílem tepelně inaktivované suspenze ve vzorku a naměřenými hodnotami (% usmrčených spor).

Podobně jako u předchozího experimentu byl u fluorescenční mikroskopie zjištěn vysoký stupeň korelace ($R^2 = 0,998$) mezi zjištěnými hodnotami a podílem usmrčených spor, přítomných ve vzorku (Graf 5). Také absolutní hodnoty se shodovaly (Tabulka 5).

4.3.2. Fluorimetrie

Využití fluorimetrie k rozlišení živých a mrtvých spor zmiňuje jako alternativu k mikroskopickému vyšetření například Sánchez a kol. (2014). Výhoda této metody spočívá především ve vysoké rychlosti měření. Hodnotí fluorescenci všech spor, přítomných v jamce, což dává předpoklady pro vysokou přesnost. Nevýhodou je, že suspenzi spor je potřeba mít čistou, aby nebyly výsledky zkresleny fluorescencí nežádoucích objektů. To se v případě spor nosemy, izolovaných z homogenátu trávicího traktu týká hlavně pylových zrn, která jsou většinou mnohanásobně větší než spory a mají výraznou fluorescenci.



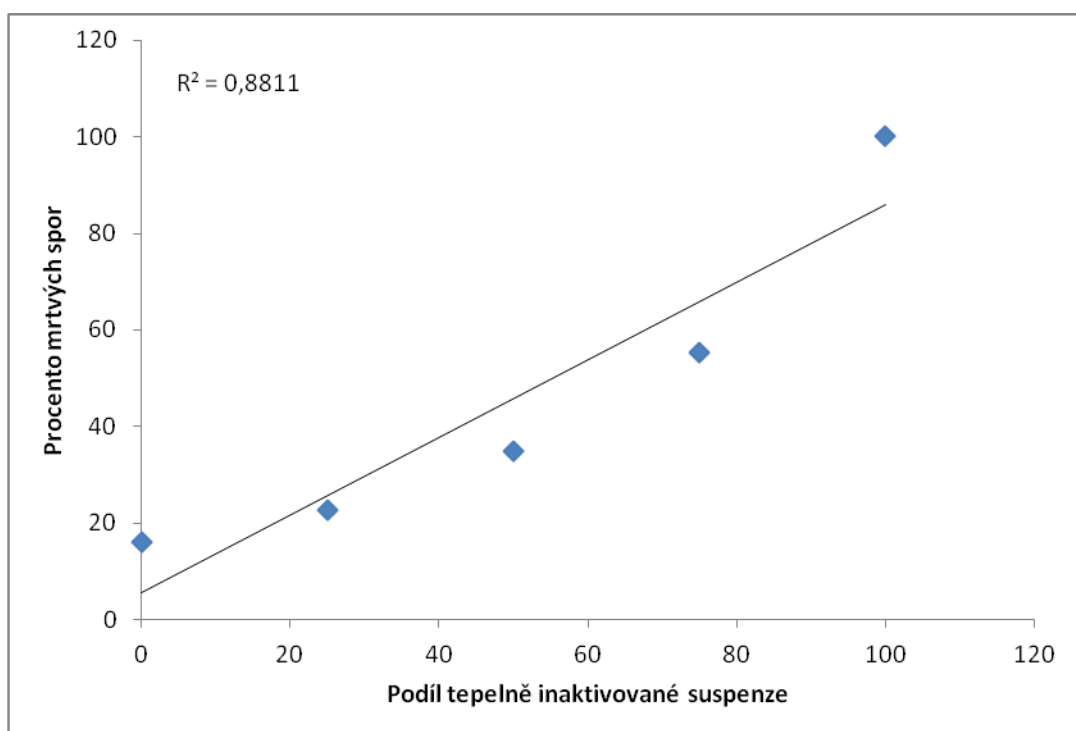
Obrázky č. 11, 12: Pylové zrno v suspenzi spor, obarvené propidium iodidem. Vlevo foto pod foto pod fluorescenčním filtrem, vpravo foto téhož zorného pole bez filtru (zvětšení 200x)

U předchozích metod bylo výsledkem měření % živých a mrtvých spor ve vzorku. U fluorimetrie je výsledkem bezrozměrné číslo (fluorescence, vyjádřená v relativních fluorescenčních jednotkách). Pokud chceme zjistit podíl živých a mrtvých spor ve vzorku, je potřeba výsledky vyjádřit jako % fluorescence inaktivovaného vzorku (suspenze usmrcených spor). Další podstatnou nevýhodou je, že pokud měříme různě koncentrované suspenze spor, je potřeba přepočítat fluorescence například na množství proteinů, obsažených ve vzorku, aby výsledky nebyly ovlivněny rozdílnými počty spor ve vzorcích. Spory je potřeba zlyzovat, v lyzátu změřit koncentraci proteinů a získanými hodnotami potom vydělit naměřenou fluorescenci. To zvyšuje nároky na lidskou práci. Další možností by bylo využít místo koncentrace proteinů přímou absorbanci vzorků, podobně jako u bakteriálních suspenzí (absorbance je přímo úměrná koncentraci suspendovaných částic).

Při našem testování jsme dbali na to, aby byla ve všech jamkách stejná koncentrace spor a předpokládali jsme, že poté otestujeme způsoby, jak překonat rozdíly způsobené různou koncentrací spor ve vzorcích. Vzhledem k dosaženým výsledkům jsme však už k tomuto kroku nepřistoupili.

Podíl tepelně inaktivované suspenze (%)	Mrtvé spory (%)
0	15,9 ± 3,2
25	22,8 ± 2,5
50	34,8 ± 2,7
75	55,4 ± 3,3
100	100,1 ± 1,3

Tabulka č. 5: Fluorimetrie. Procentuální zastoupení mrtvých spor, naměřené v jednotlivých směsích. Hodnoty představují průměr ± SEM.

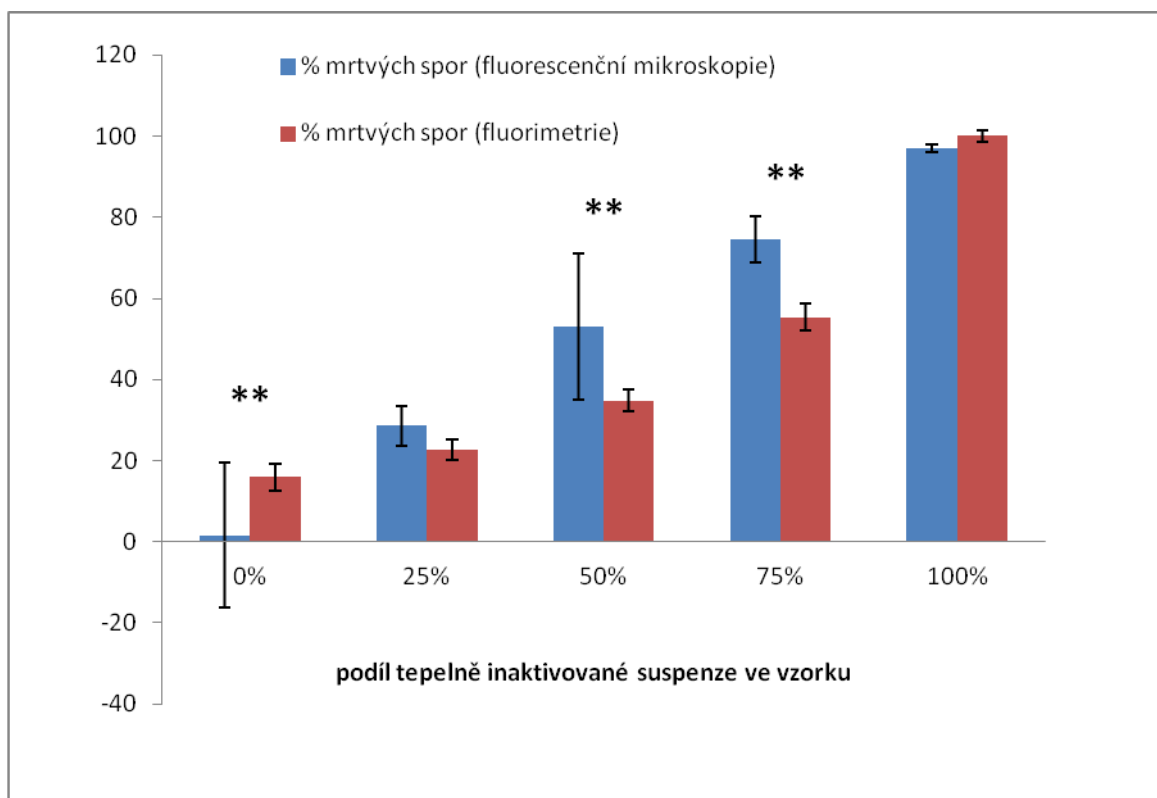


Graf č. 6: Fluorimetrie. Závislost mezi podílem tepelně inaktivované suspenze ve vzorku a naměřenými hodnotami (% usmrcených spor).

Mezi podílem usmrcených spor, naměřeným pomocí fluorimetrie a podílem tepelně inaktivované suspenze ve vzorku byla zjištěna lineární závislost, ale nižší stupeň korelace ($R^2 = 0,881$) než u fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie (graf č. 6). Lišily se i absolutní hodnoty (tabulka č. 6).

Podíl tepelně inaktivované suspenze	% mrtvých spor (fluorescenční mikroskopie)	% mrtvých spor (fluorimetrie)	Statistická významnost (p)
0%	1,6 ± 17,8	15,9 ± 3,2	0,005
25%	28,6 ± 4,9	22,8 ± 2,5	0,173
50%	53,0 ± 18,0	34,8 ± 2,7	0,004
75%	74,6 ± 5,8	55,4 ± 3,3	0,004
100%	97,0 ± 0,9	100,1 ± 1,3	0,191

Tabulka č. 6: Srovnání výsledků, zjištěných pomocí fluorescenční mikroskopie a fluorimetrie. Data představují průměr ± SEM.



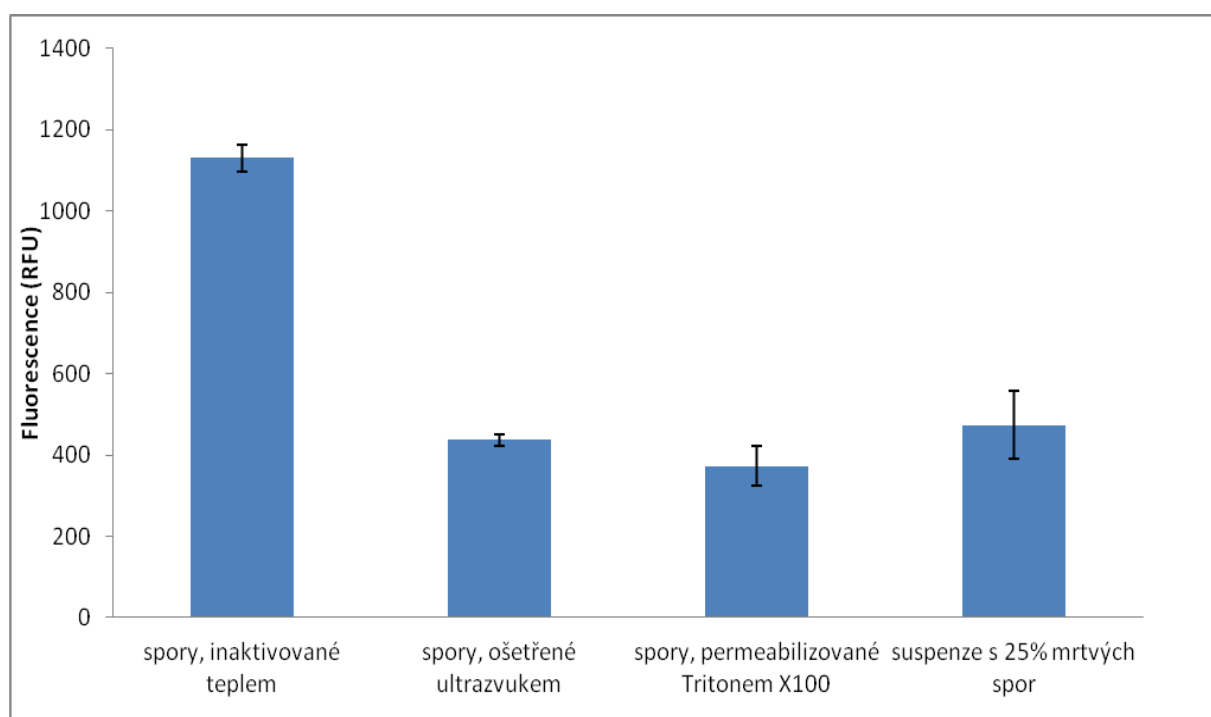
Graf č. 7: Srovnání výsledků, zjištěných pomocí fluorimetrie a fluorescenční mikroskopie. Data představují průměr ± SEM. Statisticky významný rozdíl mezi výsledky je označen dvěma hvězdičkami ($p < 0,01$).

Mezi výsledky, získanými měřeními na fluorimetru a výsledky z fluorescenční mikroskopie nebyla zjištěna dobrá shoda. Statisticky významné rozdíly se vyskytovaly dokonce ve třech suspenzích (s 0%, 50% a 75% mrtvých spor). Rozdíly byly pravděpodobně způsobeny nečistotami, přítomnými ve vzorcích, které kvůli vysoké citlivosti metody zkreslily výsledky.

V porovnání s fluorimetrií se fluorescenční mikroskopie ukázala být přesnější a vhodnější metodou pro analýzu životnosti spor *Nosema* spp.

4.4. Srovnání účinnosti různých způsobů permeabilizace spor

Cílem této části experimentu bylo získat metodu k permeabilizaci spor pro molekulu propidium iodidu za účelem získání pozitivní kontroly pro fluorimetrii. Jednou z možností bylo sporu usmrtit teplem. Dále jsme se pokusili pouze permeabilizovat plazmatickou membránu pomocí organického rozpouštědla Triton X100. Triton X100 se běžně využívá k permeabilizaci plazmatické membrány například u genetické modifikace buněk (Křížková a kol. 2003). Třetím způsobem permeabilizace bylo ošetření suspenze spor v ultrazvukové lázni. Desintegrace buněk pomocí ultrazvuku je rovněž hojně používána u celé řady mikroorganismů (Šafařík, 1982).



Graf č. 8: Srovnání různých typů permeabilizace spor

V grafu je znázorněna intenzita fluorescence vzorků, ošetřených teplem, ultrazvukem a Tritonem X100. Ve čtvrtém sloupečku je pro srovnání fluorescence směsi s 25% podílem mrtvých spor. Ze získaných výsledků vyplývá, že ošetření ultrazvukem ani permeabilizace Tritonem X100 nebyla dostatečně účinná, jelikož

získané signály jsou podstatně nižší a nejsou srovnatelné se signálem u tepelně inaktivovaných spor.

Fenoy a kol. (2009) popisuje ve své studii velkou odolnost *N. ceranae* vůči vysoké teplotě (při vystavení spor *N. ceranae* teplotě 60°C po dobu 6h, která jiné intracelulární parazity běžně eliminuje, došlo k zachování životaschopnosti zhruba u 90% spor), každopádně náš způsob tepelné inaktivace (95°C po dobu 30 min.) byl dostatečně účinný. Spolehlivou účinnost srovnatelné tepelné inaktivace spor dokládá ve své práci například Peng (2014).

4.5. Vyhodnocení

Metoda	Výhody	Nevýhody
Fluorescenční mikroskopie	Možnost odlišení nečistot při pozorování	Menší množství vyšetřených spor, časová náročnost a pracnost
Průtoková cytometrie	Rychlost, přesnost, spolehlivost	Náročnost na přístrojové vybavení a zkušenosti
Fluorimetrie	Rychlost	Náročnost na čistotu suspenze, menší přesnost

Tabulka č. 7: Výhody a nevýhody použitých metod

Jako nejvhodnější metoda k rozlišení živých a devitalizovaných spor rodu *Nosema* se ukázala průtoková cytometrie, a v obou případech též fluorescenční mikroskopie. Obecně je za nevýhodu fluorescenční mikroskopie považováno menší množství vyšetřovaných objektů a tím tedy nižší přesnost (i když v našem případě vycházela v obou případech lineární závislost s vysokým stupněm korelace) a velká náročnost na lidskou práci a čas. Při počítání spor je však dobře možné odlišit případné nečistoty v suspenzi a neovlivnit jimi potom konečné výsledky.

V případě průtokové cytometrie je možné analyzovat velké množství spor vysokou rychlostí až tisíce buněk za sekundu (Toman a kol. 2009) a s velkou přesností, avšak je nutná větší investice do přístrojového vybavení (1- 12 milionů korun), (Šinkorová a Zárybnická, 2008) a k obsluze cytometru je zapotřebí školený personál (Bursová, 2014).

Stejně výsledky popisuje ve své práci při porovnání těchto dvou metod i Peng (2014). Uvádí, že vyhodnocení životnosti spor *Nosema* spp. bylo při použití průtokové cytometrie ve výsledku 45krát rychlejší než vyhodnocení stejného množství vzorků fluorescenční mikroskopií. Dále uvádí, že rychlé měření životaschopnosti individuálních spor poskytlo množství dodatečných výhod. Průtoková cytometrie operuje v takovém časovém rámci, že ztráta fluorescenčního signálu (fotovybělování) je zanedbatelná a nemá žádný vliv na fluorescenční signály vydávané spory. Metoda

poskytuje velmi přesné měření fluorescenčních signálů pro každou sporu a výsledkem je jasná separace mezi živými a mrtvými populacemi spor *Nosemy*. Dále díky zvýšené citlivosti a rychlejšímu zpracování, které umožňuje průtokový cytometr v porovnání s lidským okem může být podstatně sníženo množství barviva potřebného na vyhodnocení jednoho vzorku. I v našem případě jsme při fluorescenční mikroskopii museli použít desetinásobně větší množství PI než při měření na průtokovém cytometru či fluorimetru. Kromě snížení ceny vzorku, nižší koncentrace barviva také minimalizuje potenciální negativní efekt, které by barvivo mohlo mít na životaschopnost spor, což může být důležité pokud vzorky spor mají být po čase znovu přeměřeny.

Sánchez (2014) udává, že analýza spor obarvených PI pomocí průtokové cytometrie byla využita nejen u spor rodu *Nosema*, ale je úspěšně používána i u ostatních druhů mikrosporidií a představuje nástroj k rychlému rozlišení mrtvých a živých buněk a k určení délky života a životaschopnosti spor.

Nejméně vhodná je podle našich výsledů fluorimetrie. Její vysoké nároky na absolutní čistotu suspenze jsou v případě hodnocení životnosti spor *Nosemy* velkým problémem. V roce 2011 byla vyvinuta metoda kultivace *N. apis* a *N. ceranae* na buněčných kulturách (Gisder, 2011). Z buněčné kultury by bylo možné získat suspenzi spor s minimálním podílem nečistot. Kultivace se však zatím využívá pouze výjimečně. Spory *Nosema* spp. jsou pro experimentální účely většinou izolovány z trávicího traktu infikovaných včel, případně z jejich výkalů. Ve vyizolované suspenzi se vždy vyskytuje určitý podíl nežádoucích objektů, které se mohou barvit fluorescenčními barvivami. Nejčastěji jsou přítomna pylová zrna, která jsou mnohem větší než spory *Nosema* spp. a vydávají tedy mnohonásobně vyšší fluorescenční signály než samotné obarvené spory. Do každé jamky na mikrotitrační destičce můžeme náhodně napipetovat kromě spor i různé množství těchto nežádoucích objektů. Jelikož výsledkem fluorimetrie je bezrozměrné číslo, které je zapotřebí dále přepočítat (např. vyjádřit jako % fluorescence tepelně inaktivovaného vzorku), zkreslený signál se potom promítne do všech výsledků a metoda se stává nepřesnou.

5. Závěr

Z našich výsledků vyplývá, že k rozlišení živých a devitalizovaných spor lze úspěšně využít jak průtokovou cytometrii tak fluorescenční mikroskopii. Nevýhodou fluorescenční mikroskopie jsou vysoké nároky na čas a lidskou práci a obecně udávaná menší přesnost kvůli menšímu počtu vyšetřovaných spor, i když v naší práci se toto tvrzení nepotvrdilo, jelikož v obou případech vycházela vysoká linearita i vysoký stupeň korelace. Průtoková cytometrie je několikanásobně rychlejší, přesná a kromě relativně vysoké pořizovací ceny samotného cytomeru a potřeby školeného personálu nemá žádné další nevýhody. Díky tomu je to nejvíce využívaná metoda k odlišení živých a devitalizovaných spor nejen u *Nosemy* spp., ale i u ostatních mikrosporidií. Nejméně vhodná je podle našich výsledků fluorimetrie. Jelikož se ve vyizolovaných sporách i po důkladném přečištění vždy vyskytuje určité množství nežádoucích objektů (např. pylová zrna), které se rovněž jako spory mohou barvit fluorescenčními barvivami, výsledky u tak citlivé metody, jako je fluorimetrie jsou těmito signály velmi ovlivněny. U obou dalších metod můžeme tomuto zkreslení předejít. V případě fluorescenční mikroskopie lze ostatní nečistoty odlišit pouhým okem a jednoduše je nezapočítat, v průtokové cytometrii zase na začátku měření oddělíme nežádoucí objekty správným vymezením oblasti, ve které se na dot plotu vyskytuje žádaná populace. I když je jinak fluorimetrie velmi rychlou a přesnou metodou, u *Nosemy* spp. zatím nejsme schopni současnými metodami získat dostatečně čistou suspenzi pro její využití.

Získané výsledky bude možné využít při vyhodnocování odolnosti spor mikrosporidií rodu *Nosema* ve vnějším prostředí i při testování jejich odolnosti vůči dezinfekčním postupům.

6.Seznam literatury

- AMIGÓ, J.M.: Comparative Study of Microsporidian Spores by Flow Cytometric Analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* [online]. 1994, 41(3), 210 - 214 [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1994.tb01499.x. ISSN 15507408.
- BAHREINI R, CURRIE RW.: The influence of *Nosema* (Microspora: Nosematidae) infection on honey bee (Hymenoptera: Apidae) defense against *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). *J Invertebr Pathol*. 2015;132:57–65. doi: 10.1016/j.jip.2015.07.019. pmid:26283465
- BAUMGARTNER U., LORITZ H.: Cesty ke kvetoucí krajině *in Včely jinak – alternativy v chovu včel a přístupu k nim*. Fabula, 2014, s. 267-268
- BIGLIARDI E.: Current focus: Microsporidia, intracellular parasites causing emerging diseases. *Microbes and Infection* [online]. 2001, 3(5), 373-379 [cit. 2016-02-19]. DOI: 10.1016/S1286-4579(01)01393-4. ISSN 12864579.
- BRÁNSKÁ B. A KOL.: Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chem. Listy* 105, 586–593 (2011)
- BREEUWER P.: Abee T.: *Int. J. Food Microbiol.* 55, 193 (2000)
- BRYCHTOVÁ S., HLOBILKOVÁ A.: *Histopatologický atlas*. Grada Publishing, a.s., Praha, 2008, s. 112
- BURSOVÁ Š. A KOL.: *Mikrobiologické laboratorní metody . Veterinární a farmaceutická univerzita Brno* 2014, ISBN 978-80-7305-676-6, s. 84
- CORRADI N.: Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews* [online]. 2009, 23(1/2), 1-8 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.1016/j.fbr.2009.05.001. ISSN 17494613.
- FALUGI C. A KOL.: (2015) Micronuclei Induction and Neurotoxic Effect in C6 Glioma Cells Exposed to Low Concentrations of Diazinon, an Organophosphorus Compound. *J Toxicol Risk Assess* 1:002
- FEDR R. A KOL.: Analýza buněčných populací pomocí průtokové cytometrie [online] CZ.1.07/2.4.00/31.0245. (2013)
- FENOY S. A KOL.: Highlevel resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6886-6889.s (2009)

FORSGREN, E.: Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports* [online]. 2013, 5(1), 78-82 [cit. 2017-01-08]. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2012.00386.x. ISSN 17582229.

FRANZEN C.: Quantitation of microsporidia in cultured cells by flow cytometry. *Cytometry. Part A: The Journal Of The International Society For Analytical Cytology* [online]. 2004, 60(1), 107-114 [cit. 2017-03-12]. ISSN 15524922.

FRIES, I. A KOL.: (2013) Standard methods for nosema research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK : Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 51 (5):<http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>

GIERSCH, T. A KOL.: *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*. 40: 117-123. (2009)

GISDER, S. A KOL.: FiveYear Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl Environ Microbiol* 2010;76(9):3032-3038.

GISDER, S. A KOL.: (2011), A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology*, 13: 404–413. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x

GREEN, L.C.: Discrimination between viable and dead *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidian) spores by dual staining with Sytox Green and Calcofluor White M2R. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2000, 38(10), 3811 - 3814 [cit. 2017-03-07]. ISSN 00951137.

HÁSLBACHOVÁ H.: *Včelařství (cvičení)*. Vysoká škola zemědělská v Brně, 1992, s. 93

HERNÁNDEZ, R. M. A KOL.: Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(20):6331-6338.

HERNÁNDEZ, R. M. A KOL.: Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 2554-2557.(2009)

HIGES, M., A KOL.: *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 2010;41:3. (a)

- HIGES, M., A KOL.: (2010). The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environmental Microbiology Reports*. 2: 745-748. (b)
- HUANG W., SOLTER F. L.: *Nosema apis* a *nosema ceranae*: Srovnávací studie u hostitele včely medonosné, Odborné včelařské překlady, Praha, Český včelařský svaz, 2013 s. 24 – 26.
- HUGHES D., MEHMET H.: *Cell proliferation and apoptosis*. Garland Science, 2003, s. 392
- CHEN Y. P.: Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera*. *Journal of eukaryotic microbiology* [online]. 2009, 56, no. 2(2) [cit. 2016-03-27]. ISSN 10665234.
- CHEN Y. P.: *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia / *Nosema ceranae*, un agent pathogène d'*Apis mellifera* nouvellement identifié aux États-Unis et en Asie *Nosema ceranae*, ein neu entdecktes Pathogen von *Apis mellifera* in den USA und Asien. *Apidologie* [online]. 2010, 41, no. 3(3) [cit. 2016-08-31]. ISSN 00448435.
- CHROUST K. A KOL.: *Veterinární protozoologie*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 1998, s. 113
- ILJASOV R. A KOL.: *Metody diagnostiky, prevence a léčby klasické noseμόzy a noseμόzy typu C*. Odborné včelařské překlady, 2014/2, Praha, Český včelařský svaz, s 45-47
- JEŽ, M.: The hazards of DAPI photoconversion: effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem. *Histochemistry* [online]. 2013, 139(1), 195-204 [cit. 2016-09-05]. DOI: 10.1007/s00418-012-1039-8. ISSN 09486143.
- JÍLEK P.: *Imunologie stručně, jasně, přehledně*. Grada, 2014, s. 96
- KAMLER F. A KOL.: *Získávání a zpracování včelích produktů*. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství, Praha, 1999, s. 48
- KAMLER F.: Rozšíření, patogeneze a návrh opatření v chovech včel ohrožených mikrosporidii *Nosema ceranae* - Závěrečná zpráva za rok 2011. VUVč Dol, 2011.
- KAMLER, F.: Nosematóza - opomíjené onemocnění včel. *Moderní včelař* 2012;9(4):137-139.
- KAMLER F. A KOL.: *Správná praxe v chovu včel*. Výzkumný ústav včelařský s.r.o., Dol, 2014, s. 20

- KANOATOV, M.: Analysis of DNA in Phosphate Buffered Saline Using Kinetic Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* [online]. 2016, 88(14), 7421 - 7428 [cit. 2017-03-01]. DOI:10.1021/acs.analchem.6b02117. ISSN 15206882.
- KÁŠ J. A KOL.: Laboratorní techniky biochemie. Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, vydavatelství VŠCHT, 2006, S. 257
- KILANI M.: Nosemosis. In : Colin M.E. (ed.), Ball B.V. (ed.), Kilani M. (ed.). *Bee disease diagnosis*. Zaragoza : CIHEAM, 1999. p. 99-106. (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 25). Course on Bee Disease Diagnosis, 1997/05/19-30, Tunis(Tunisia).
- KLÍMA Z., BABINCOVÁ E.: Trávicí trakt včel, jeho stavba a funkce - vliv kyseliny mravenčí na výstelku mesenteronu cév in Věda a výzkum včelařské praxi - sborník přednášek. Univerzita Palackého v Olomouci, 2012,s 13-15
- KOLEY, D.: *Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM)* [online]. 2015 [cit. 2017-02-28].
- KŘÍŽKOVÁ V A KOL.: Princip a příklady využití demonstrované varianty in situ hybridizace. Příručka pro studenty, UK Plzeň, 2003, s. 32
- KUBIŠOVÁ S., HÁSLBACHOVÁ H.: Včelařství. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1998, s. 101
- LAKOWICZ J.R.: Principles of fluorescence spectroscopy .Springer, 2006, s. 303. ISBN13:978-0-387-31278-1
- LUCKÝ Z.: Nemoci včel. Vysoká škola Veterinární v Brně. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1984, s. 187
- MAISTRELLO, L.: Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* [online]. 2008, 39(4), 436 - 445 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1051/apido:2008022. ISSN 00448435.
- MASIDE X, A KOL.: Population Genetics of Nosema apis and Nosema ceranae: One Host (*Apis mellifera*) and Two Different Histories. PLoS ONE 10(12): e0145609. doi:10.1371/journal.pone.0145609 (2015)
- MASCOTTI K.: HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion* [online]. 2000, 40(6), 693-6 [cit. 2017-03-12]. ISSN 00411132.

MATOUŠEK M.: Fluorimetrie *In Mezinárodní spolupráce v oblasti In vivo zobrazovacích technik* [online] 2013. Dostupné z :
http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/skoleni/58_Fluorimetrie.pdf

MC CARTHY A. D., MACEY G. M: Cytometric Analysis of Cell Phenotype and Function, Cambridge university press 2001, s 288

MCGOVAN J.: Viability Assessment and Cryopreservation of the Honey Bee (*Apis mellifera*) Parasite, *Nosema ceranae*. Thesis, The University of Guelph, 2012.

NANETTI, A.: Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Research in Veterinary Science* [online]. 2015, **102**, 167-172 [cit. 2016-09-12]. DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.08.003. ISSN 00345288.

NEVEL V. S. A KOL.: Routine bacterial analysis with automated flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*. 2013, 94(2), 73-76. DOI:10.1016/j.mimet.2013.05.007. ISSN 01677012.

NEZBEDA M. Včelařství - opylovatelé v kontextu životního prostředí. Česká zahradnická akademie Mělník., 2012, s. 44

NOCKER A., CHEUNG C.Y., CAMPER A.K.: Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Meth.* 67: 310-320.69 (2006)

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014: Nosemosis of Honey Bees.

PAPEŽÍKOVÁ I. A KOL.: Nosematóza – přetrvávající a podceňovaný problém u včel. *Veterinářství* 2015;65:446-448.

PAPEŽÍKOVÁ I. A KOL.: Citlivost spor mikrosporidie *Nosema ceranae* k dezinfekčním činidlům *in Konference interní grantové agentury - sborník příspěvků. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*, 2016, s. 129-133

PAVLÍK, D.: Měření spektrálních charakteristik fluorescenčních napětově-citlivých barviv [online]. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. 2009.

PAXTON, R. J.: "Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)?." *Journal of Apicultural Research* 49.1 (2010): 80-84.

PENG, Y.: Quantifying spore viability of the honey bee pathogen *Nosema apis* using flow cytometry. *Cytometry Part A* [online]. 2014, 85(5), 454 - 462 [cit. 2016-09-05]. DOI: 10.1002/cyto.a.22428. ISSN 15524930.

- POSPIECH M. A KOL.: Mikroskopie potravin. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, s 150
- PŘIDAL A.: Včelí produkty. MZZLU Brno, 2003 s. 102
- PŘIDAL A.: Ekologie opylovatelů. Nakladatelství LYNX, Brno, 2005, s. 112
- PTASZYŃSKA, A. A.: Differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores under Scanning Electron Microscopy (SEM). *Journal of Apicultural Research* [online]. 2014, **53**(5), 537 - 544 [cit. 2016-09-12]. DOI: 10.3896/IBRA.1.53.5.02. ISSN 20786913.
- RADA V., HAVLÍK J., FLESAR J.: Biologicky aktivní látky ve výživě včel. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, 2009
- RITTER W.: Honey bee diseases and pests: a practical guide (FAO agricultural and food engineering technical report), 2005, ISSN 1814-1137
- SÁNCHEZ C J. G.: Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitology research* [online]. 2014, 113, no. 5(5) [cit. 2016-09-09]. ISSN 09320113.
- SHARPE P.T.: Methods of Cell Separation. Elsevier Science, 1988, s. 286
- SCHÖNFELD A.: Anatomie, morfologie a fyziologie včely medonosné. Státní zemědělské nakladatelství Praha., 1995, s. 359
- SOKÓŁ, R.: Detection of *Nosema* spp. in worker bees, pollen and bee bread during the honey flow season. *Acta Veterinaria Brno* [online]. 2016, **85**(3), 261-266 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.2754/avb201685030261. ISSN 00017213.
- STROBER W.: (2001) Trypan Blue method. Curr. Protoc. Immunology. May; Appendix 3: Appendix 3B.
- SVOBODA J. A KOL.: Nemoci a škůdci včely medonosné. Státní zemědělské nakladatelství Praha, 1968, s. 207
- ŠAFAŘÍK I.: Fyzikální způsoby dezintegrace mikrobiálních buněk VŠCHT Praha in *Chemické listy*, 1982, s. 337-356
- ŠINKOROVÁ Z., ZÁRYBNICKÁ L.: Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda 1. část In *vojenské zdravotnické listy*, 2008, s. 98 - 103
- ŠVAMBERK V.: Tajemný svět včel. Nakladatelství Víkend, 2000, s. 78
- TITĚRA D.: Včelí produkty mýtů zbavené. Nakladatelství Brázda s.r.o., Praha, 2006, s. 200
- TITĚRA D.: Přínos mezinárodní konference EurBee in *Hlavní problémy našeho včelařství (Sborník ze semináře)*. Praha, 2006, s. 4 – 9

THERMOFISHER [online]: Dostupné z :

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>

TOMAN M. A KOL.: Veterinární imunologie 2., doplněné vydání. Grada 2009, s. 392

TOPORČÁK J.: Hodnotenie rizika premorenia nozémovej nákazy včiel – *Nosema apis* a *Nosema ceranae* – v Slovenskej republike, 2015, Dostupné z:

<http://www.mpsr.sk/index.php?navID=84&id=9739>

TRAVER E. B., FELL D.R.: PCR for the Analysis of *Nosema* in Honey Bees in *Honey bee colony health- Challenges and Sustainable Solutions*, CRC Press, 2012, s. 103-114

VESELÝ V. A KOL.: Včelařství. Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha, 2009, s. 272

WEBER, R., DEPLAZES P., SCHWARTZ D.: 2000. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contributions to Microbiology*. 6: 166–192.

WEBSTER C. T., ARONSTEIN K.: *Nosema ceranae*- detection by Microscopy and Antibody tests in *Honey bee colony health- Challenges and Sustainable Solutions*, CRC Press, 2012, s. 115-120

WEISS L. M.: Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Tropica* [online]. 2001, 78(2), 89-102 [cit. 2016-02-19]. ISSN 0001706X.

7. Abstrakt

Jednou z nejrozšířenějších chorob včely medonosné (*Apis mellifera*) je nosematóza - onemocnění trávicího traktu dospělých včel, způsobované mikrosporidiiemi *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Jedná se o obligátní intracelulární parazity, kteří mimo tělo hostitele přežívají pouze v podobě spor, odolných vůči vlivům vnějšího prostředí. Jelikož se nosematóza stává v současné době stále závažnějším problémem, je zapotřebí mnoha dalších výzkumů k nalezení účinné léčby a prevence.

Ve své práci se zabývám srovnáním metod k rozlišení živých a devitalizovaných spor mikrosporidií rodu *Nosema*. Jedná se o porovnání průtokové cytometrie s fluorescenční mikroskopií a dále o srovnání fluorimetrie, rovněž s fluorescenční mikroskopií. K barvení byla použita fluorescenční barviva 4',6-diamidin-2-fenylindol a propidium iodide. Z výsledků práce vyplývá, že průtokovou cytometrii i fluorescenční mikroskopii lze úspěšně využít k rozlišování spor, nicméně průtoková cytometrie je mnohonásobně rychlejší a nabízí řadu dalších výhod. Nejméně vhodné se ukázalo být použití fluorimetrie, jelikož výsledné signály jsou zkresleny nečistotami přítomnými v suspenzi, které zatím nejsme schopni současnými metodami izolace spor kompletně odstranit.

Získané výsledky bude také možné využít při vyhodnocování odolnosti spor mikrosporidií rodu *Nosema* ve vnějším prostředí i při testování jejich odolnosti vůči dezinfekčním postupům.

Klíčová slova: *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie

8. Abstract

Nosemosis is one of the most widespread diseases of the honeybee (*Apis mellifera*). It is caused by two microsporidian species *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Both of them are obligatory intracellular parasites affecting digestive tract of adult bees. Outside the host body they are able to survive only in the form of spores which are highly resistant to influences of the outside environment. As nosemosis is nowadays becoming an increasingly serious problem, a large amount of additional research is needed to develop effective treatment and prevention.

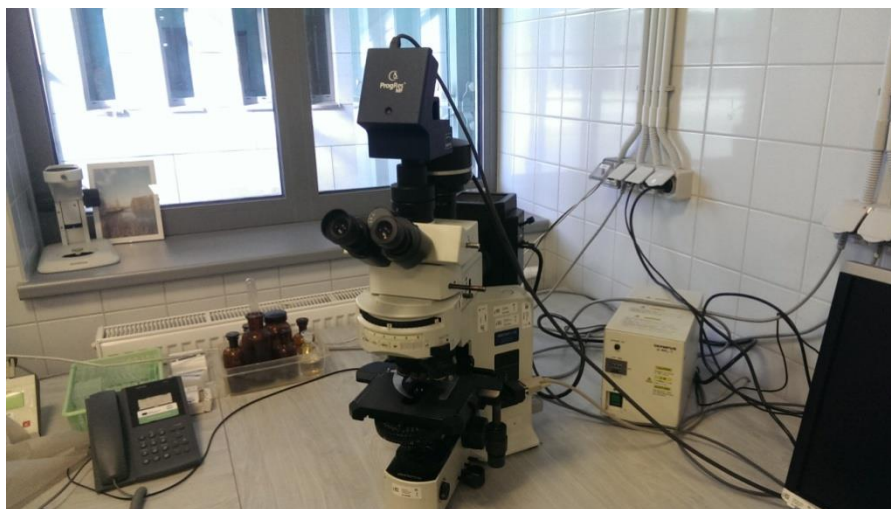
My work was aimed at comparison of methods which can be used to differentiate between living and devitalized microsporidian spores of *Nosema* spp. Fluorescence microscopy was compared to flow cytometry and fluorimetry. Two fluorescent dyes, 4',6-diamidin-2-phenylindol and propidium iodide were used for staining. Our results indicate, that both flow cytometry and fluorescence microscopy can be successfully used to distinguish between living and dead *Nosema* spores. However flow cytometry is many times faster and offers several other advantages. The least suitable method proved to be fluorimetry, because the resulting signals are affected by the impurities present in the spore suspension, that we are unable to completely remove with current methods.

The acquired results will also be usable for evaluation of resistance of the microsporidian spores of the *Nosema* spp. in the outside environment and for testing their resistance to disinfection methods.

Keywords: *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, flow cytometry, fluorescence microscopy, fluorimetry

9. Přílohy

Příloha č. 1: Fluorescenční mikroskop Olympus BX 51



Příloha č. 2: Fluorimetr Tecan Infinite M 200



Příloha č. 3: Průtokový cytometr FACScalibur



PROHLÁŠENÍ AUTORA

Jsem si vědom, že

- odevzdáním závěrečné práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby,
- moje závěrečná práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitní databázi a bude veřejně přístupná k nahlédnutí,
- na moji závěrečnou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jméno a příjmení autora, titul: Hana Peterová, Bc.

Název práce: Metody rozlišení živých a devitalizovaných spor mikrosporidií rodu *Nosema*

V Brně dne

Podpis autora:

-
-
- 1) zákon č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 47b Zveřejňování závěrečných prací:
- (1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a záznamu o průběhu a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.
- (2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.
- (3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.
- 2) zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 35 odst. 3:
- (3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní vnitřní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).
- 3) zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 60:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez závažného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

POTVRZENÍ AUTORA

Svým podpisem potvrzuji, že písemná verze odevzdané bakalářské / diplomové / rigorózní / dizertační* práce je shodná s elektronickou verzí práce, která je pod stejnojmenným názvem v pdf formě uložena v Informačním systému VFU Brno (STAG), příp. na předaném nosiči (CD, DVD).

Jméno a příjmení autora, titul:	Hana Peterová, Bc.
Název práce v češtině:	Metody rozlišení živých a devitalizovaných spor mikrosporidií rodu <i>Nosema</i>
Název práce v angličtině:	Differentiation between living and devitalized spores of microsporidia <i>Nosema</i> spp.

V Brně dne Podpis autora: