

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Biologické vlastnosti původců nákaz včel a jejich  
využití v mikrobiologické diagnostice**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

<b>Autor:</b>	<b>Jana Biová</b>
<b>Studijní program:</b>	<b>B1406 Biochemie</b>
<b>Studijní obor:</b>	<b>Biochemie</b>
<b>Forma studia:</b>	<b>Prezenční</b>
<b>Vedoucí práce:</b>	<b>MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.</b>
<b>Rok:</b>	<b>2018</b>

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

Velmi ráda bych poděkovala všem, kteří umožnili vznik této práce. Jmenovitě pak nesmí být opomenut projekt AKTION projekt 78p8, RNDr. Jan Brus, Ph.D., Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PřF UP v Olomouci a Prof. Mgr. Marek Šebela, Ph.D., Katedru biochemie, PřF UP v Olomouci, Státní veterinární ústav Olomouc, Mgr. Silvie Dostálková, v neposlední řadě také vedoucí práce MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D. a konzultant Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Biová
Název práce	Biologické vlastnosti původců nákaz včel a jejich využití v mikrobiologické diagnostice
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie; Státní veterinární ústav Olomouc
Vedoucí práce	MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Mor včelího plodu (původce *Paenibacillus larvae*) a hniloba včelího plodu (původce *Melissococcus plutonius*) jsou významná onemocnění včel, které jsou v souladu s Veterinárním zákonem č. 166/1999 Sb. ve znění pozdějších předpisů řazena mezi nebezpečné nákazy včel. Obě onemocnění jsou vyvolána bakteriálními původci a způsobují velké problémy včelařům po celém světě. V posledních letech byla zjištěna řada rozdílů v průběhu onemocnění morem včelího plodu v závislosti na genotypu původce onemocnění určeném dle ERIC primerů. Byly objeveny 4 základní genotypy *P. larvae* označené ERIC I-IV, kdy první dva genotypy jsou podle prozatím dostupných informací běžné, zatímco genotypy ERIC III a ERIC IV jsou vzácné. V současnosti využívaná diagnostika hniloby včelího plodu zahrnuje kultivaci původce tohoto onemocnění z infekčního klinického materiálu, potravin, surovin živočišného původu a prostředí. Díky pomalému růstu a nutnosti anaerobní kultivace je tento postup nejen náročný, ale hlavně velmi zdlouhavý. Doporučená doba kultivace *M. plutonius* je 7 dní. Diplomová práce zahrnuje optimalizace PCR genotypizace *P. larvae* dle primerů ERIC a také optimalizovaný protokol PCR detekce *M. plutonius* ve včelí měli a medu. Výsledky poskytují nové informace o rozšíření genotypů *P. larvae* na území České republiky. Podařilo se určit genotyp u 102 terénních kmenů *P. larvae*, z nich 20 bylo identifikováno jako ERIC I

a 82 jako ERIC II. Oblasti výskytu ERIC I jsou zejména okresy Český Krumlov a Jeseník. Nejhojnější výskyt ERIC II byl zaznamenán v okresech Olomouc a Zlín.

Během optimalizace identifikace *M. plutonius* bylo vyzkoušeno několik přístupů, výsledné protokoly kombinují použití speciálně navržených příprav vzorku s následnou izolací DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kitu a amplifikaci vybraných úseků DNA pomocí optimalizovaného protokolu PCR s použitím FastStart Taq DNA Polymerase. Protokoly umožňují identifikaci *M. plutonius* v úlové měli a medu, přičemž je možno spolehlivě identifikovat přítomnost již  $10^5$  bakterií v gramu měli a medu, nižší množství bakterií mohou poskytovat falešně negativní výsledky. Metodika byla zavedena na laboratorně kontaminovaných vzorcích měli a medů. Výhodou PCR detekce je kratší doba při identifikaci původce v biologickém materiálu, metoda poskytuje také potenciální možnost plošného monitoringu výskytu bakterie na včelnicích bez nutnosti odběru plodových plástů. Diplomová práce dále obsahuje prvotní výsledky optimalizace kultivačního média pro *M. plutonius* s výsledkem testů dvou běžně užívaných kultivačních médií, kdy médium M110 poskytovalo lepší výsledky.

Klíčová slova

Mor včelího plodu, Hniloba včelího plodu, *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, ERIC PCR, diagnostické metody.

Počet stran

83

Počet příloh

4

Jazyk

Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jana Biová
Title	Biological properties of the causative agents of bee diseases and their using in microbiological diagnostics
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry; State veterinary institute Olomouc
Supervisor	MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.
The year of presentation	2018

### Abstract

American foulbrood (causative agent *Paenibacillus larvae*) and European foulbrood (causative agent *Melissococcus plutonius*) are important bee diseases, which are in accordance with the Veterinary Act No. 166/1999 Coll. as amended classified as dangerous bee infections. Both diseases are caused by bacterial agents and both diseases generate big issues all over the world. Recently, a number of differences were discovered depending on ERIC genotype. There are 4 ERIC genotypes of *P. larvae* named as ERIC I-IV. The first two genotypes are commonly spread, while ERIC III and ERIC IV genotypes are rare. The currently used diagnostic methods of European foulbrood are based on isolation and cultivation of the biological agent from various biological materials, e.g. food, raw materials of animal origin, hive environmental material etc. Cultivation of *M. plutonius* is slow and needs anaerobic condition. The recommended time of *M. plutonius* cultivation is 7 days. The diploma thesis includes the optimization of PCR genotyping of *P. larvae* according to ERIC primers as well as the optimized PCR detection protocol of *M. plutonius* in hive debris and honey. The results show a new information considering *P. larvae* genotypes in the Czech Republic. *P. larvae* was identified in 102 field samples. ERIC I or II genotypes were identified in 20 and 82 cases, respectively. Districts of ERIC I occurrence are Český Krumlov and Jeseník. The most cases of ERIC II were founded in Olomouc and Zlín.

Several approaches have been done during optimization of *M. plutonius* identification. Resulting protocols use specially designed sample preparation followed by DNA isolation with DNeasy Plant Mini Kit and amplification of selected DNA segments using an optimized PCR protocol with FastStart Taq DNA Polymerase. Protocols allow the identification of *M. plutonius* in hive debris and honey. It is possible reliable identify presence of  $10^5$  bacteria in 1 gram of debris or honey. Lower amount of bacteria can produce false negative results. The methodology was created on laboratory-enriched samples of debris and honey. The advantage of PCR detection without microbiological cultivation is a shorter time of bacterial identification. It also provides a potential for *M. plutonius* monitoring in a field without samplig brood frames from suspected colonies. The diploma thesis contains the initial results of the optimization of the culture medium for *M. plutonius* with the result of tests of two commonly used culture media. The M110 medium provided better results.

Keywords	American foulbrood, European foulbrood, <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Melissococcus plutonius</i> , ERIC PCR, diagnostik methods.
Number of pages	83
Number of appendices	4
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Bakteriální onemocnění včel</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Mor včelího plodu</b> .....	<b>13</b>
2.1.1	<i>Paenibacillus larvae</i> .....	13
2.1.2	Rozvoj a průběh onemocnění.....	19
2.1.3	Klinické projevy nemoci.....	21
2.1.4	Šíření, možnosti léčby a prevence .....	22
2.1.5	Diagnostické metody průkazu choroby .....	23
2.1.6	Epizootologie výskytu .....	25
<b>2.2</b>	<b>Hniloba včelího plodu</b> .....	<b>27</b>
2.2.1	<i>Melissococcus plutonius</i> .....	27
2.2.2	Rozvoj a průběh onemocnění.....	31
2.2.3	Klinické projevy nemoci.....	33
2.2.4	Epizootologický výskyt, šíření a možnosti léčby.....	33
2.2.5	Diagnostické metody choroby v klinické praxi .....	34
<b>3</b>	<b>Teoretický úvod do hlavních využívaných metod</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Izolace DNA</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Polymerasova řetězová reakce</b> .....	<b>38</b>
3.2.1	Složení reakční směsi pro standardní PCR .....	38
3.2.2	Průběh standardní PCR a vizualizace produktů na agarosovém gelu.....	39
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál</b> .....	<b>41</b>
4.1.1	Biologický materiál.....	41
4.1.2	Chemikálie .....	41
4.1.3	Komerční kity .....	42
4.1.4	Roztoky a média .....	42
4.1.5	Pomůcky a přístroje .....	43
4.1.6	Sekvence primerů .....	44
<b>4.2</b>	<b>Metody</b> .....	<b>45</b>
4.2.1	Genotypizace terénních izolátů <i>P. larvae</i> dle ERIC primerů.....	45
4.2.2	Určení přítomnosti <i>M. plutonius</i> v úlové měli .....	47
4.2.3	Určení přítomnosti <i>M. plutonius</i> v medu .....	49
4.2.4	Izolace DNA z napěstované kultury <i>M. plutonius</i> .....	49



4.2.5	Testy možností kultivace <i>M. plutonius</i> .....	50
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>51</b>
5.1	Genotypizace terénních izolátů <i>P. larvae</i> dle primerů ERIC .....	51
5.2	Vývoj metody pro určení přítomnosti bakterie <i>M. plutonius</i> v úlové měli 55	
5.2.1	Optimalizace přípravy vzorku pro izolaci a izolace DNA z úlové měli .....	56
5.2.2	Testy opakovatelnosti navržené metody .....	57
5.3	Vývoj metody pro určení přítomnosti bakterie <i>M. plutonius</i> v medu .....	59
5.3.1	Testy opakovatelnosti .....	59
5.4	Testy možností kultivace <i>M. plutonius</i> .....	61
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>62</b>
6.1	Genotypizace terénních izolátů <i>P. larvae</i> dle ERIC primerů .....	62
6.2	Určení přítomnosti <i>M. plutonius</i> v úlové měli.....	65
6.3	Určení přítomnosti <i>M. plutonius</i> v medu.....	67
6.4	Testy možností kultivace <i>M. plutonius</i> .....	68
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých symbolů a zkratk .....</b>	<b>77</b>
<b>10</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>78</b>

## Cíle práce

- zpracování poznatků o bakteriálních nákazách včel, zejména moru a hnilobě včelího plodu (AFB a EFB)
- vypracování literární rešerše zaměřené na biochemické, fyziologické a genetické vlastnosti a schopnosti původců bakteriálních nákaz včel (AFB, EFB)
- laboratorní testování schopnosti původců výše uvedených nákaz využít vybrané chemické substráty (mikrobiologické metody)
- nastínění možnosti využití výše uvedených vlastností a schopností původců bakteriálních nákaz včel při konstrukci nových živných půd a diagnostických postupů, např. kultivační metody a PCR
- ověření možnosti detekce *Melissococcus plutonius* metodou PCR přímo ze včelí měli a medu
- zmapování výskytu jednotlivých genotypů *Paenibacillus larvae* (ERIC I - ERIC IV) pomocí PCR diagnostiky na území České republiky

# 1 ÚVOD

Včela medonosná je významným hospodářským zvířetem nejen z hlediska produkce řady produktů např. medu, vosku, mateří kašičky, ale zejména z hlediska svého postavení významného opylovače v zemědělství. Proto je třeba tento druh chránit. K tomu bych ráda přispěla také touto prací zaměřenou na výzkum dvou nejvýznamnější bakteriální onemocnění včel a jejich původce.

Prvním onemocněním je mor včelího plodu a jeho původce *Paenibacillus larvae*. V rámci této práce byla kromě vytvoření literární rešerše zaměřené na toto onemocnění i jeho původce, provedena genotypizace dle primerů ERIC pomocí metody PCR u terénních izolátů *P. larvae* pocházejících z České republiky.

Druhým onemocněním je hniloba včelího plodu způsobená bakterií *Melissococcus plutonius*. Tato práce obsahuje literární rešerši zaměřenou také na toto onemocnění a jeho původce. V praktické části pak byly navrženy metody pro diagnostiku hniloby včelího plodu z úlové měli a medu. Metody jsou založené na potvrzení přítomnosti původce onemocnění v testovaném vzorku pomocí PCR. Identifikace *M. plutonius* je při obou metodách možná bez předchozí zdlouhavé kultivace této bakterie. Součástí práce jsou také výsledky se zavádění metody kultivace bakterie *M. plutonius* v tekutém médiu, která by zároveň umožňovala měření růstových křivek této bakterie.

# SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

## 2 BAKTERIÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ VČEL

Včely stejně jako ostatní hospodářská zvířata jsou ohroženy řadou onemocnění, která mají různé původce (bakterie, parazity, viry a další) čímž také způsobují nemalé ztráty včelstev (Genersch, 2008; Forsgren, 2009).

V rámci bakteriálních onemocnění včel je největší pozornost věnována dvěma onemocněním. Těmito onemocněními jsou mor včelího plodu (AFB) způsobený bakterií *Paenibacillus larvae* a hniloba včelího plodu (EFB) způsobená bakterií *Melissococcus plutonius* (Forsgren, 2009). Původně nebyly onemocnění mor včelího plodu a hniloba včelího plodu vzájemně rozlišovány a byly považovány za stejnou chorobu s jiným průběhem. Až pokusy o izolaci původce „moru včel“ odhalily dva rozdílné původce a dvě různá onemocnění včelího plodu (White, 1906).

Dalšími bakteriálními patogeny včel jsou například původci septikemie včel, která je způsobena bakteriemi a jejich toxickými produkty v hemolymfě včel (Grupta a Reybroeck, 2014). Onemocnění má více původců (Bailey a Ball, 1991), mezi nejčastěji uváděné původce tohoto onemocnění patří *Pseudomonas aeruginosa* (Papadopoulou-Karabela *et al.*, 1992) *Serratia marcescens* (Grupta a Reybroeck, 2014) nebo *Hafnia alvei* (Bailey a Ball, 1991). Také malé Gram-pozitivní bakterie rodu *Spiroplasma*, jsou označovány za patogeny včel (Grupta a Reybroeck, 2014). V souvislosti s onemocněním včel jsou pak v literatuře uváděny dva konkrétní druhy *Spiroplasma apis* a *Spiroplasma melliferum* (Mouches *et al.*, 1983; Clark *et al.*, 1985). Gram-negativní intracelulární bakterie označované jako rikettsie, jsou v některých případech také spojovány s onemocněními včel (Bailey a Ball, 1991; Grupta a Reybroeck, 2014).

## 2.1 Mor včelího plodu

Mor včelího plodu je onemocnění včel způsobené Gram-pozitivní bakterií *P. larvae* (Genersch, 2008). V anglicky psané literatuře je toto onemocnění obvykle označováno jako American Foulbrood, velmi často používaná je i zkratka odvozená z tohoto názvu AFB.

### 2.1.1 *Paenibacillus larvae*

Taxonomické zařazení organismu:

**Doména:** Bakterie

**Kmen:** Firmicutes

**Třída:** Bacilli

**Řád:** Bacillales

**Čeleď:** *Paenibacillaceae*

**Rod:** *Paenibacillus*

Po svém objevení a určení jako původce onemocnění včelího plodu byl *P. larvae* nejprve pojmenován jako *Bacillus larvae* (White, 1906) a *Bacillus pulvifaciens* (Katznelson, 1950). Následně došlo k vytvoření nového rodu *Paenibacillus*, kam byli oba předpokládání původci moru včelího plodu zařazeni. Další genotypové studie obou bakteriálních druhů pak vedlo k jejich přeřazení do jediného druhu, který však obsahoval dva poddruhy *Paenibacillus larvae* ssp. *larvae* a *Paenibacillus larvae* ssp. *pulvifaciens* (Heyndrickx *et al.*, 1996). Nedávné výzkumy genomu a patogenních vlastností obou poddruhů pak vedly k jejich definitivnímu sloučení do jediného druhu nazvaného *Paenibacillus larvae* (Genersch *et al.*, 2006).

*P. larvae* je Gram-pozitivní patogenní bakterie. Tento mikroorganismus má tyčinkovitý tvar o rozměrech přibližně 2,5-5 µm na 0,5-0,8 µm s negativní katalasovou i oxidasovou reakcí a je schopen se pohybovat pomocí peritrichních bičíků (Genersch, 2008). Dalším typickým znakem *P. larvae* je tvorba vysoce odolných endospor, které zůstávají infekční i dlouhou dobu po opuštění těla předchozího hostitele a jsou schopné odolávat řadě vnějších vlivů včetně vysokých teplot. Díky této schopnosti je velmi obtížné zcela vyčistit oblast, kde už dříve propukl mor včelího plodu, od všech endospor a zamezit tak opakovanému propuknutí choroby (Anonym, 2016a.).

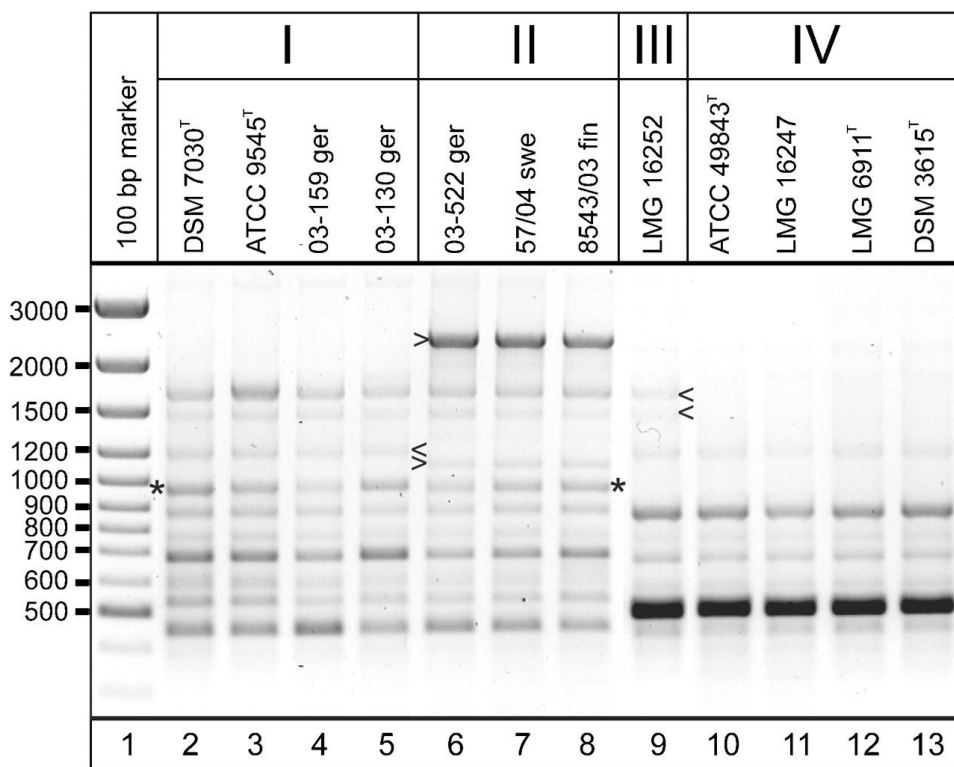
### 2.1.1.1 Růstové požadavky *P. larvae*

Mikroorganismus *P. larvae* není nutné kultivovat anaerobně (de Graaf *et al.*, 2013). Pro kultivaci *P. larvae* z terénních vzorků je často využívána dvojí selekce (de Graaf *et al.*, 2013), kde jsou nejprve pomocí tepelného ošetření vyselektovány sporulující mikroorganismy (Genersch, 2008). Následuje inhibice růstu řady kontaminujících sporulujících bakterií pomocí antibiotika kyseliny nalidixové nebo kyseliny pipemidové (de Graaf *et al.*, 2013). Existuje celá řada vhodných kultivačních médií pro *P. larvae*. Z nejběžněji využívaných médií je nutné zmínit alespoň MYPGP agar a J agar. Na MYPGP agaru pak vykazují spory *P. larvae* nejvyšší germinativní schopnost (de Graaf *et al.*, 2013).

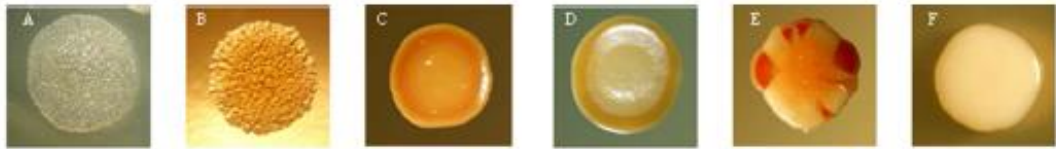
### 2.1.1.2 Genetická variabilita kmenů *P. larvae*

Nejen u eukaryotických organismů, ale i u organismů prokaryotických byly objeveny konzervované opakující se sekvence v jejich genomové DNA. Těchto sekvencí je možné využít pro genotypizaci pomocí PCR s primery navrženými na opakující se úseky, které mohou být pro různé zástupce stejného druhu rozdílné ve svém počtu i délce (Versalovic *et al.*, 1991). Také pro genotypizaci *P. larvae* bylo otestováno několik dříve vytvořených primerů na repetitivní sekvence v jeho DNA. Jako vhodné pro využití se ukázaly ERIC sekvence - ERIC1R a ERIC2 primery (navržené Versalovic *et al.*, 1991), BOX sekvence - BOXA1R primery (navržené Koeuth, nepublikovány, otištěny ve Versalovic *et al.*, 1994) a REP sekvence - MBO REP1 primery (navržené Versalovic *et al.*, 1994). BOX sekvence jsou první repetitivní sekvence DNA objevené u Gram-pozitivních bakterií (Versalovic *et al.*, 1994). Předpokládá se výskyt tří podjednotek boxA, boxB a boxC, kdy nejčastější je boxA (57 bp), který byl původně jako jediný nalezen u *P. larvae* (Genersch a Otten, 2003). Pozdější výzkum našel u *P. larvae* novou BOX podjednotku nazvanou boxD (Krongdang *et al.*, 2017). REP sekvence jsou krátké palindromické sekvence DNA, které obsahují variabilní smyčku (Krongdang *et al.*, 2017). Výsledky genotypizací pomocí REP a BOX primerů pak umožnily rozlišit 4 genotypy *P. larvae* AB, Ab, ab, aβ (Neuendorf *et al.*, 2004). Poslední ze zmíněné trojice primerů, využívaných pro genotypizaci *P. larvae*, jsou navržené na repetitivní sekvence ERIC. Tyto opakující se vysoce konzervované sekvence byly původně nalezeny v genomu enterobakterií (Hulton *et al.*, 1991). Název je zkratkou z anglického Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus. Sekvence ERIC jsou 126 bp dlouhé a vyskytují se v nekódujících transkribovaných regionech (Hulton *et al.*, 1991). Pozice

ERIC sekvencí v bakteriální DNA se však liší v závislosti na druhu a kmeni (Hulton *et al.*, 1991). Později byly ERIC sekvence objeveny i u dalších bakterií a byl vytvořen pár primerů (ERIC1R a ERIC2) pro PCR, které umožňují genotypizaci bakterií pomocí specifického vzoru vznikajícího po elektroforetickém rozdělení amplifikovaných produktů PCR s vybranou bakteriální DNA (Versalovic *et al.*, 1994). Za pomoci ERIC1R a ERIC2 primerů byly určeny 4 genotypy *P. larvae* ERIC I–ERIC IV (Obr. 1). Pro ERIC I a ERIC II je typický fragment DNA o přibližné velikosti 970 bp, ERIC I pak oproti genotypu ERIC II postrádá fragment DNA o velikosti asi 2800 bp. Pro ERIC III jsou charakteristické 2 fragmenty DNA, které svou velikostí spadají do rozmezí mezi 1500 bp a 2000 bp. Poslední z genotypů *P. larvae* ERIC IV pak poskytuje typický vzor s největším fragmentem DNA, který odpovídá velikosti přibližně 1250 bp (Genersch *et al.*, 2006). Některé z kmenů *P. larvae* byly využity pro genotypizaci nejen pomocí ERIC primerů, ale také pro genotypizaci pomocí REP a BOX primerů. Tři ze zástupců genotypu AB tak byli určeni jako ERIC II genotyp. Jako ERIC I pak byli určeni 3 zástupci genotypu ab a po dvou zástupcích genotypu Ab, aβ (Neuendorf *et al.*, 2004; Genersch *et al.*, 2005; Genersch *et al.*, 2006).



Obr. 1 Vzor vznikající po elektroforetickém rozdělení amplifikovaných produktů PCR s ERIC primery u 4 genotypů *P. larvae* (ERIC I–ERIC IV). Symboly ∇ \* označují důležité fragmenty DNA pro rozpoznání konkrétních genotypů. Převzato z Genersch *et al.*, 2006.



Obr. 2 Fotografie kolonií *P. larvae* genotypu ERIC I (označeny a a B) a genotypu ERIC II (označeny C, D, E a F). Převzato z Bassi *et al.* (2015).

Byla získána kompletní sekvence DNA zástupců dvou ERIC genotypů *P. larvae*. Kompletní genom *P. larvae* genotyp ERIC I kmen DSM 25719 obsahuje 4 579 589 bp zatímco o něco málo menší genom *P. larvae* genotyp ERIC II kmen DSM 25430 obsahuje 4 056 006 bp. Obsah GC byl 44 % u ERIC I genotypu a 45 % u ERIC II genotypu (Djukic *et al.*, 2014). V obou sekvencovaných zástupcích byl nalezen kruhový plasmid o velikosti 7,9 kbp, který se mezi oběma zástupci lišil v pouhých 49 bázích. Nicméně prohledání genomů dalších sbírkových *P. larvae* neodhalilo dalšího zástupce genotypu ERIC I, který by obsahoval plasmid. Výskyt plasmidu i u dalších sbírkových zástupců byl potvrzen pouze u *P. larvae* genotypu ERIC II (Djukic *et al.*, 2014).

### 2.1.1.3 Biochemická a morfologická variabilita kmenů *P. larvae*

Rozdíly u zástupců jednotlivých genotypů mohou být patrné už z morfologie *P. larvae* (Obr. 2). Zatímco zástupci genotypů Ab, ab, aβ tvoří bílé až našedivělé mírně se lesknoucí kolonie, zástupci genotypu AB tvoří bílé až tmavě červené kolonie, které postupem času průhlední a starší kolonie jsou proto jakoby „orámované“ (Neuendorf *et al.*, 2004). Výskyt oranžových až červených kolonií *P. larvae* byl u genotypů ERIC zaznamenán u zástupců ERIC II a ERIC III (Genersch *et al.*, 2006). Další morfologické odlišnosti u zástupců jednotlivých ERIC genotypů byly zaznamenány u spor, kdy spory zástupců ERIC I měly hladký povrch, spory zástupců ERIC II měly zvrásněný povrch a spory zástupců ERIC III a ERIC IV měly na povrchu dlouhé podélné výstupky (Genersch *et al.*, 2006). Rozdíly mezi jednotlivými ERIC genotypy byly popsány také v jejich schopnosti vyklíčit z endospor po tepelném ošetření. Zatímco klíčení spor zástupců genotypu ERIC I bylo podpořeno krátkodobým zvednutím teploty na 90-95 °C, stejné podmínky u spor zástupců genotypu ERIC II vedly ke snížení schopnosti klíčit z endospor. Při zvednutí teploty ošetření na 100 °C pak spory zástupců ERIC I stále vykazovaly schopny klíčení, ale růst zástupců genotypu ERIC II z takto ošetřených spor nebyl pozorován. U zbývajících dvou genotypů ERIC bylo zaznamenáno snížení klíčivosti spor po tepelném ošetření u zástupce genotypu ERIC IV a u zástupce genotypu ERIC III



nebylo pozorováno žádné ovlivnění klíčivosti spor tepelným ošetřením (Forsgren *et al.*, 2007).

Dalšími vlastnostmi, které se mohou lišit u různých genotypů *P. larvae*, jsou biochemické charakteristiky. V závislosti na genotypu získaném pomocí PCR s primery na BOX a REP sekvence se nejvíce odlišoval genotyp AB (Neuendorf *et al.*, 2004). Zástupci genotypu AB jako jediní vykazovali schopnost metabolizovat fruktosu. Oproti tomu, ale nebyli schopni využít glycerol, adenosin-5'-monofosfát, thymin-5'-monofosfát a uridin-5'-monofosfát, které byly většinou zástupců ostatních genotypů metabolizovány (Neuendorf *et al.*, 2004). U všech v této studii testovaných genotypů pak byla pomocí BIOLOG systému (Biolog, Hayward, USA) potvrzena schopnost metabolizovat glukosu, trehalosu, kyselinu pyrohroznovou a N-acetyl-D-glukosamin (Neuendorf *et al.*, 2004). Další výsledky byly získány při biochemické charakterizaci několika zástupců *P. larvae* (ještě rozdělených do dvou poddruhů jako *P. larvae* ssp. *larvae* a *P. larvae* ssp. *pulvifaciens*), u kterých nebyl určen genotyp (Kilwinski *et al.*, 2004). Byly použity dva různé systémy (BIOLOG a API50CH) určení metabolického profilu testovaných bakterií, které u stejných zástupců v několika případech poskytly rozdílné výsledky (Kilwinski *et al.*, 2004). Při pozdějším určení genotypů ERIC, provedeném Genersch *et al.* (2006), byly dva ze čtyř zástupců použitých při studii provedené Kilwinski *et al.* (2004) použity znovu a určeny jako ERIC I - *P. larvae* ssp. *larvae* respektive ERIC IV - *P. larvae* ssp. *pulvifaciens* genotyp. Třetí zdroj pak také využil několik kmenů *P. larvae* bez určení jejich genotypu pro testování biochemických vlastností pomocí systému BIOLOG (Bzdil, 2010). Pro snazší orientaci byla vypracována tabulka, která shrnuje vybrané výsledky všech čtyř získaných metabolických profilů *P. larvae* (Tab. 1).

Zatímco schopnost metabolizovat glukosu, trehalosu a N-acetyl-D-glukosamin vyšla ve všech případech stejně, pozitivně pro všechny nebo alespoň velkou většinu testovaných zástupců (Kilwinski *et al.*, 2004; Neuendorf *et al.*, 2004; Bzdil, 2010). Schopnost využít ribosu jako zdroj uhlíku se podle výsledků získaných v jednotlivých testech lišila (Kilwinski *et al.*, 2004; Neuendorf *et al.*, 2004; Bzdil, 2010). Při použití API50CH (Biomérieux, Lyon, Francie) systému byla určena ribosa jako vhodný zdroj uhlíku pro všechny zástupce (Kilwinski *et al.*, 2004). Naproti tomu při využití BIOLOG systému byla ribosa metabolizována jen několika zástupci z jediné studie a ve druhé studii nebyla schopnost využít ribosu prokázána u žádného použitého kmene (Kilwinski *et al.*, 2004; Bzdil, 2010). Další shodné i neshodné výsledky pak byly zaznamenány při testování fruktosy a salicinu, kdy při použití stejných sbírkových kmenů *P. larvae* byly

tyto uhlikové zdroje pozitivní u většího počtu zástupců *P. larvae* podle API50CH systému než podle BIOLOG systému (Kilwinski *et al.*, 2004; Neuendorf *et al.*, 2004). Největší rozpor ve výsledcích studií pak nastává ve schopnosti využít manosu, kdy podle Neuendorf *et al.* (2004) většina testovaných zástupců *P. larvae* kromě pár zástupců genotypu AB není schopna využít tento zdroj uhlíku, zatímco podle Kilwinski *et al.* (2004) a Bzdil (2010) všichni zástupci testování pomocí API50CH-systém a většina zástupců testovaných pomocí BIOLOG systému byla schopna manosu metabolizovat. Při charakterizaci biochemických vlastností typických pro jednotlivé ERIC genotypy (testování zástupci ERIC I, ERIC II, ERIC III, ERIC IV), jako jediný genotyp ERIC I dokázal fermentovat salicin, ale také jako jediný nedokázal fermentovat manitol (Genersch *et al.*, 2006).

Při testování aktivity vybraných enzymů se nejvíce odlišoval genotyp ERIC II, u kterého nebyla jako u jediného genotypu *P. larvae* zjištěna aktivita alkalické ani kyselé fosfatasy (Genersch *et al.*, 2006). Podle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (De Vos *et al.*, 2009) *P. larvae* obvykle vykazuje negativní katalasovou reakci. Schopnost redukovat nitráty a nitrity se u jednotlivých zástupců tohoto patogenního druhu liší. Podle

Tab. 1 Přehled výsledků metabolických profilů *P. larvae* získaných pro vybrané chemické sloučeniny (Kilwinski *et al.*, 2004; Neuendorf *et al.*, 2004; Bzdil, 2010).

Vybrané uhlikové zdroje	BIOLOG s. Neuendorf <i>et al.</i> , 2004	BIOLOG s. Kilwinski <i>et al.</i> , 2004	API50CH s. Kilwinski <i>et al.</i> , 2004	BIOLOG s. Bzdil <i>et al.</i> , 2010
Glukosa	+	± (75 %)	+	± (90 %)
Fruktosa	±	± (25 %)	± (50 %)	± (40 %)
Manosa	±	± (50 %)	+	± (80 %)
Maltosa	x	± (25 %)	± (50 %)	± (20 %)
Trehalosa	+	+	+	± (80 %)
Ribosa	x	± (50 %)	+	-
Glycerol	±	+	± (75 %)	± (80 %)
Kys. pyrohroznová	+	+	x	x
N-acetyl-D-glukosamin	+	+	+	± (80 %)
N-acetyl-β-D-manosamin	±	± (50 %)	x	± (90 %)
Salicin	x	± (25 %)	± (75 %)	± (50 %)
+/- pozitivní/negativní výsledek u všech testovaných zástupců ± pozitivní výsledek u některých testovaných zástupců hodnota v závorce doplňuje procento pozitivních izolátů, je-li uvedeno x netestováno nebo nepublikováno				

Kilwinski *et al.* (2004) většina testovaných zástupců vykazovala aktivitu gelatinasy a žádný z testovaných zástupců nevykazoval aktivitu nitrátreduktasy.

#### 2.1.1.4 Virulence kmenů *P. larvae*

Nejnižší LD<sub>50</sub> (dávka, která usmrtila polovinu testovaných larev) byla vypočítána u testovaných larev starých 24-48 h. Tato hodnota odpovídala pouhým 8,49 sporám *P. larvae* (Brødsgaard *et al.*, 1998). Pozdější výzkum poukázal na rozdílnou virulenci u různých zástupců *P. larvae* (Genersch *et al.*, 2005). Bylo určeno LD<sub>50</sub> spor zástupců jednotlivých genotypů získaných pomocí PCR s BOX A1R primery a PCR s MBO REP1 primery. Nejnižší hodnoty byly menší než 100 spor a nejvyšší hodnota dosahovala 800 spor. Při určování LD<sub>50</sub> jednotlivých zástupců nebyla patrná žádná souvislost s určeným genotypem (Genersch *et al.*, 2005). Oproti tomu výsledky naznačují vztah mezi konkrétním genotypem a dobou od podání infekční dávky do smrti infikované larvy. Kdy nejkratší čas od podání infekční dávky ke smrti infikované larvy byl zaznamenán u genotypu AB  $7,8 \pm 1,7$  dní, zatímco u ostatních genotypů (Ab  $11,2 \pm 0,8$ ; ab  $11,6 \pm 0,6$ ; aβ  $11,3 \pm 0,8$  dní) byly určeny delší časové úseky (Genersch *et al.*, 2005). Podobné výsledky byly získány také při testování délky průběhu onemocnění mor včelího plodu u jednotlivých genotypů ERIC. Kdy u ERIC I genotypu trvalo onemocnění od podání infekční dávky do smrti přibližně 12 dní. Zatímco ostatní testované genotypy (ERIC II, ERIC III a ERIC IV) vykazovaly rychlejší průběh onemocnění, kdy od podání patogenu docházelo k úhynu infikované larvy přibližně po 7 dnech (Genersch *et al.*, 2006). Také Yue *et al.* (2008) pozorovali při laboratorní infekci včelích larev spory *P. larvae* rychlejší růst ve střevě infikované larvy u zástupců genotypu ERIC II oproti genotypu ERIC I.

#### 2.1.2 Rozvoj a průběh onemocnění

Onemocnění mor včelího plodu může propuknout pouze u včelí larvy. Postižený jedinec pak obvykle uhynie. K úhynu dochází nejčastěji ve stádiu larvy. Některé larvy se ale ještě před svou smrtí stihnou zakuklit (Bailey a Ball, 1991; Anonym, 2016a).

K nákaze včelích larev morem včelího plodu dochází obvykle pomocí spor v potravě. U vegetativních buněk *P. larvae* se infekčnost nepodařilo prokázat (Hornitzky, 1998). Nejnáchylnější na propuknutí moru včelího plodu jsou nejmladší larvy (Brødsgaard *et al.*, 1998). Po pozření ze spor ve střevě larev vyklíčí vegetativní forma *P. larvae*, kterou bylo možné detekovat už 24 h po infekci (Yue *et al.*, 2008). Vegetativní buňky se následně prudce množí v celém střevě infikované larvy. V průběhu celé infekce byla určována

lokalizace výskytu buněk *P. larvae* v živých i mrtvých larvách s příznaky moru včelího plodu pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s próbou specifickou na 16S RNA gen *P. larvae*. Při všech těchto testech bylo potvrzeno protržení peritrofické membrány i střevního epitelu a výskyt patogenu v haemocoelu pouze u mrtvých larev (Yue *et al.*, 2008). Peritrofická membrána tvoří bariéru chránící střevní epitel včel a je tvořena zejména chitinem (Garcia-Gonzalez a Genersch, 2013). V průběhu infekce morem včelího plodu dochází k její degradaci. Bylo zjištěno, že *P. larvae* je schopen chitin degradovat (Garcia-Gonzalez a Genersch, 2013), a že je také schopen využít N-acetyl-D-glukosamin, který je stavební jednotkou chitinu (Neuendorf *et al.*, 2004). Zároveň výsledky naznačily, že k přesunu *P. larvae* nedocházelo pomalu, ale spíše náhle (Yue *et al.*, 2008). Při těchto pozorováních nebyl nalezen žádný zástupce *P. larvae* uvnitř buněk infikované larvy, což neodpovídá dříve vyslovenému předpokladu, že se *P. larvae* přesunuje přes střevní epitel pomocí fagocytózy. Naopak buňky *P. larvae* byly nalezeny v mezibuněčných prostorech a bylo zjištěno poškození spojení mezi buňkami střevního epitelu (Yue *et al.*, 2008). Už dřívější studie poukázala na sekreci proteas původcem moru včelího plodu (Dancer a Chantawannakul, 1997). Později byly v genomu *P. larvae* nalezeny geny pro více než 100 různých proteas a dalších degradačních enzymů, které mohou být potencionálními faktory virulence (Djukic *et al.*, 2014). Toto bylo potvrzeno u chitin-degradujícího proteinu PICBP49, který je jedním z klíčových faktorů virulence bakterie *P. larvae* (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014). Při testu virulence s mutanty *P. larvae* postrádajícími funkční gen pro PICBP49 protein došlo ke snížení poškození peritrofické membrány a zejména k výraznému snížení virulence testovaných patogenních bakterií. Ty v podstatě nebyly schopny způsobit úmrtí infikovaných larev při infekčních dávkách, které u terénní formy *P. larvae* způsobovaly po podání úhyny larev v rozmezí 75-77 % (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014). Výsledky z FISH analýzy i sekrece proteas pak vedly k vyslovení hypotézy, že se *P. larvae* dostává do haemocoelu larev spíše paracelulární cestou (Yue *et al.*, 2008). Pro FISH analýzu byli použiti zástupci *P. larvae* genotypu ERIC I a ERIC II. Průběh infekce se zdál být stejný u obou genotypů, pouze zástupce genotypu ERIC II se ve střevě infikované larvy množil rychleji (Yue *et al.*, 2008). Zároveň byla po celou dobu infekce pozorována sporulace *P. larvae*, a to včetně raných fází infekce (Yue *et al.*, 2008).

K dalším experimentálně potvrzeným faktorům virulence u *P. larvae* patří u genotypu ERIC I toxiny Plx1 a Plx2. Tyto toxiny nebyly objeveny u genotypu ERIC II (Fünfhaus *et al.*, 2013). Také v případě Plx1 a Plx2 došlo k výrazné redukci virulence u testovaných

delečních mutantů pro toxinové geny v porovnání s divokým typem *P. larvae* (Fünfhaus *et al.*, 2013). U genotypu ERIC II, ale nikoliv u genotypu ERIC I, ten má ve svém genomu pouze nefunkční gen, byl nalezen SplA protein S-vrstvy, který s největší pravděpodobností slouží k adhezi buněk patogenu ke střevním buňkám infikované larvy (Poppinga *et al.*, 2012). SplA protein má vliv na morfologii a virulenci bakterie. Zatímco pro ERIC II genotyp jsou typické kulaté kolonie, deleční mutant *SplA* genu genotypu ERIC II vytvářel kolonie s nepravidelným okrajem. Morfologická změna byla pozorovatelná i na úrovni bakterií, kdy mutanti tvořili protáhlejší buňky (Poppinga *et al.*, 2012). Zároveň mutant vykazoval výrazně nižší schopnost usmrtit infikovanou larvu než divoký typ, kdy při stejné infekční dávce deleční mutant *P. larvae* genu *SplA* usmrtil  $34,4 \pm 5,55$  % larev oproti  $78,9 \pm 1,13$  % usmrcených larev při infekci divokým typem (Poppinga *et al.*, 2012). Avšak delece genu *SplA* neměla vliv na zvýšenou rychlost průběhu infekce typickou pro ERIC II genotyp, kdy v případě úhynu larvy na mor včelího plodu byl čas od inokulace ke smrti srovnatelný s divokým typem (Poppinga *et al.*, 2012).

### 2.1.3 Klinické projevy nemoci

Onemocnění mor včelího plodu se projevuje změnou barvy postižené larvy nejprve na béžovou a následně na hnědou. Po úhynu dochází také ke změně konzistence, kdy se mrtvá larva rozpadá na lepkavou hmotu, která při nabrání a tažení tvoří dlouhé provazce. Rozklad může být doprovázen typickým zápachem. Po uplynutí nejméně jednoho měsíce od smrti postižené larvy dochází k jejímu vyschnutí. Pro seschlé zbytky larvy (Obr. 3), která uhynula na mor včelího plodu, je typické, že jsou silně přichyceny na stěně buňky (Bailey a Ball, 1991; Anonym, 2016a).



Obr. 3 Fotografie seschlé larvy zemřelé na mor včelího plodu (v otevřené buňce uprostřed).  
Autor Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.

### 2.1.4 Šíření, možnosti léčby a prevence

Přenos onemocnění moru včelího plodu probíhá vertikálně i horizontálně (Genersch, 2008). Vertikální přenos spor *P. larvae* byl potvrzen při oddělení nového roje z mateřského včelstva. Při nepropuknutí klinických příznaků onemocnění však množství spor ve starém i novém včelstvu postupem času klesalo (Fries *et al.*, 2006). Dále byla potvrzena infekčnost sporami *P. larvae* kontaminovaného medu, jako potencionálního zdroje onemocnění mor včelího plodu, kdy v zimě díky jeho konzumaci rostl výskyt počtu spor u dospělých včel. Takovýto růst koncentrace spor v populaci dospělých jedinců pak představuje riziko propuknutí onemocnění u jarního potomstva (Lindström *et al.*, 2008a). Jako jeden z hlavních způsobů horizontálního přenosu spor *P. larvae* u včel je považováno vylupování nemocí oslabených včelstev a odnášení sporami kontaminovaného medu (Genersch *et al.*, 2008). Byla potvrzena vysoká úspěšnost horizontálního přenosu infekce v oblasti do 1 km od včelstva s klinickými příznaky moru včelího plodu, které mělo v úlu med obsahující spory *P. larvae* (Lindström *et al.*, 2008b). K dalšímu způsobu horizontálního přenosu onemocnění mor včelího plodu přispívá sám včelař, kdy při výměně materiálu z úlu mezi různými včelstvy může dojít k zavlečení spor *P. larvae* (Genersch *et al.*, 2008).

V některých zemích (např. USA) je povolena léčba včelstva nakaženého morem včelího plodu pomocí antibiotik. K tomuto účelu je využíváno například antibiotikum hydrochlorid oxytetracyklinu (Lodesani *et al.*, 2005). Další antibiotika, která byla používána k léčbě moru včelího plodu, byla tylosin, lincomycin a sulfathiazol (Krongdang *et al.*, 2017). Avšak pro každé ze zmíněných antibiotik byly nalezeny kmeny *P. larvae*, které byly vůči tomuto antibiotiku rezistentní (Krongdang *et al.*, 2017). Dalším problémem antibiotik jsou jejich rezidua ve včelařských produktech (Lodesani *et al.*, 2005). Díky všem těmto obtížím je léčba moru včelího plodu antibiotiky v řadě evropských zemí zakázána a včelstva napadená morem včelího plodu jsou likvidována (Genersch, 2010).

V žaludku včel byly nalezeny symbiotické bakterie pocházející z rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, které inhibovaly růst *P. larvae*. Inhibiční efekt jednotlivých druhů byl různě velký, ale při kombinaci všech osmi nalezených bakterií nebyl zaznamenán žádný růst *P. larvae* na pevném růstovém médiu (Forsgren *et al.*, 2010). Jiný výzkum se zabýval pravděpodobností vypuknutí moru včelího plodu v závislosti na hygienickém chování

včel. To spočívá v detekci a vnesení nemocných larev dělnicemi ven z úlu. Bylo vybráno po 18 včelstvech, která vykazovala hygienické chování a která jej nevykazovala. Do všech vybraných včelstev pak byly vneseny spory *P. larvae*. Tato včelstva byla následně pozorována. Zatímco u všech 18 včelstev bez hygienického chování byly v průběhu výzkumu pozorovatelné klinické příznaky moru včelího plodu, pouze u 7 včelstev s hygienickým chováním se viditelně projevilo toto onemocnění. V průběhu dvou měsíců pak došlo k vymizení klinických příznaků onemocnění u 5 ze 7 včelstev s hygienickým chováním, ale pouze u 1 z 18 včelstev bez tohoto chování (Spivak a Reuter, 2001).

## 2.1.5 Diagnostické metody průkazu choroby

### 2.1.5.1 Klinické prohlídky a mikroskopická pozorování

Prvním krokem k vyslovení diagnózy moru včelího plodu u nakaženého včelstva může být zpozorování klinických příznaků tohoto onemocnění. Pro potvrzení podezření anebo odhalení propukajícího onemocnění pak slouží řada laboratorních diagnostických metod (Genersch *et al.*, 2008).

Jednou z možných diagnostických metod je kultivace spor vyextrahovaných do destilované vody na selektivním médiu s kyselinou nalidixovou a mikroskopické pozorování doplněné o barvení a pozorování spor pod skenovacím elektronovým mikroskopem (Alippi, 1991). Tuto analýzu však můžou zkomplikovat rozdíly v některých vlastnostech jednotlivých genotypů *P. larvae* (Genersch *et al.*, 2006).

### 2.1.5.2 Kultivační metody

Klasickou a hojně využívanou diagnostickou metodou, která byla vyvinuta v řadě různých provedení, je kultivace spor *P. larvae* na vybraném kultivačním médiu (Genersch, 2008). K tomuto účelu je možné spory izolovat z řady druhů materiálu např. medu, včel, úlové měli, stěrech z prostředí (Hornitzky a Karlovskis, 1989; Alippi, 1995; Schuch *et al.*, 2001; Bzdil, 2010). Všechny tyto metody jsou založené na extrakci spor z vybraného materiálu. Následné zahřátí extraktů na vyšší teplotu aktivuje spory a zároveň sníží množství ostatních mikroorganismů, které by mohly ztěžovat následující kroky analýzy. Poté jsou získané spory *P. larvae* kultivovány na vhodném selektivním médiu (Hornitzky a Karlovskis, 1989; Alippi, 1995; Schuch *et al.*, 2001; Bzdil, 2010). Jako vhodné pro zvýšení selektivity média se ukázalo například přidání antibiotik kyseliny nalidixové a kyseliny pipemidové (de Graaf *et al.*, 2013). Pro vyloučení falešně

pozitivních výsledků, které mohou být způsobeny přítomností jiných sporulujících bakterií, může následovat potvrzení narostlých kolonií jako příslušníka druhu *P. larvae* například podle biochemických charakteristik nebo molekulárně biologickými metodami (Hornitzky a Karlovskis, 1989; Alippi, 1995; Govan *et al.*, 1999; Schuch *et al.*, 2001; Genersch, 2008; Bzdil, 2010). Avšak bylo zjištěno, že schopnost spor vyklíčit po ošetření vysokou teplotou se u jednotlivých genotypů odlišuje, což může ovlivnit výsledky prováděné analýzy (Forsgren *et al.*, 2007). Také určování výskytu *P. larvae* na základě biochemického profilu v řadě případů nemusí poskytovat zcela spolehlivé výsledky a to i proto, že biochemická charakteristika se u některých kmenů *P. larvae* liší (Kilwinski *et al.*, 2004; Neuendorf *et al.*, 2004; Bzdil, 2010).

### 2.1.5.3 Imunochemické a molekulárně biologické metody

Další metody, které byly navrženy pro diagnostiku moru včelího plodu, jsou založeny na interakci *P. larvae* s protilátkou získanou z králíčího séra. Test je možné provést ve dvou provedeních, jako imunodifuzní diagnostický test nebo za využití detekce fluorescence emitované protilátkou s navázanou fluorescenční značkou (Peng a Peng, 1979). Dále je pro potvrzení přítomnosti *P. larvae* ve vzorku využívána polymerasová řetězová reakce (PCR) (Genersch *et al.*, 2008). Pro identifikaci této patogenní bakterie pomocí PCR byla navržena řada primerů, jako příklad lze uvést primery AFB a Primer 1 a Primer 2. Obě zmíněné sady primerů byly navrženy na sekvenci 16S rRNA genu *P. larvae* (Govan *et al.*, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2001). Protokoly pro identifikaci *P. larvae* byly vytvořeny pro identifikaci kolonií získaných po kultivaci spor z terénních vzorků, jako jsou včely, včelí larvy, med a úlová měl (Govan *et al.*, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2001; de Graaf *et al.*, 2013). Později byly vyvinuty také protokoly pro izolaci DNA *P. larvae* přímo z těchto vzorků (Ryba *et al.*, 2009; Forsgren a Laugen, 2013; de Graaf *et al.*, 2013). Avšak při porovnání použití kultivační metody s následným potvrzením původce *P. larvae* pomocí PCR a přímé izolace bakteriální DNA z terénního vzorku, měl protokol zahrnující přímou izolaci DNA nižší citlivost než protokol, který využíval předchozí kultivace *P. larvae* na kultivačním médiu (Forsgren a Laugen, 2013).

### 2.1.5.4 Aktuálně zavedená klinická diagnostika ve veterinárních laboratořích

Například SVÚ Olomouc, který je garantem diagnostiky moru včelího plodu v ČR, využívá pro laboratorní diagnostiku moru včelího plodu metody popsané v SOP č.3/02 HYG (2013). Ty zahrnují získání a zakoncentrování spor *P. larvae* a následné barvení



spor dle Schaefer-Fultona acidorezistentní nebo barvení spor dle Schaefer-Fultona malachitovou zelení s následným mikroskopickým pozorováním. Tento výsledek musí být potvrzen kultivační metodou. Při ní je podle typu testovaného materiálu, tento materiál zpracován. Takto vytvořený vzorek je následně nanesen na vhodné kultivační médium. Typické kolonie, které vyrostly při kultivaci, je následně nutné potvrdit např. pomocí biochemických charakteristik, technikou MALDI-TOF Biotyping nebo PCR. Kultivační metoda při vhodném provedení umožňuje nejen určení přítomnosti *P. larvae*, ale také určení množství jeho buněk v testovaném vzorku.

### 2.1.6 Epizootologie výskytu

Onemocnění mor včelího plodu se podle výročních zpráv vydávaných Státní veterinární správou (SVS, 2009; SVS, 2014; SVS, 2016; SVS, 2017a) v posledních letech pravidelně vyskytuje na území České republiky. Léčba tohoto onemocnění v České republice není povolena a všechna nemocná včelstva jsou z důvodů zamezení dalšího šíření tohoto onemocnění utracena. Počty utracených včelstev za poslední 4 roky kolísaly mezi 677 a 1943 utracenými včelstvy ročně (Tab. 2). V oblastech s výskytem moru včelího plodu jsou dále vytyčována ohniska a vyhlášována ochranná pásma moru včelího plodu, která znamenají řadu omezení pro včelaře. Výskyt ochranných pásem moru včelího plodu platných k 6. 10. 2017 je vyznačen na mapě (Obr. 4). V předchozích letech byly zaznamenány následující počty nově vzniklých ochranných pásem moru včelího plodu (Tab. 2), které poukazují na přetrvávající riziko této choroby pro české chovy včel (SVS, 2009; SVS, 2014; SVS, 2016; SVS, 2017a).



Obr. 4 Mapa ochranných pásem moru včelího plodu (žluté oblasti) platných k 6. 10. 2017 (SVS, 2017b).

Tab. 2 Tabulka ukazující počty nově vyhlášených ohnisek moru včelího plodu a počty utracených včelstev na území ČR v období let 2010–2016 (SVS, 2009; SVS, 2014; SVS, 2016; SVS, 2017a).

rok	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
nových ohnisek	164	160	179	128	332	239	242
utraceno včelstev	-	-	-	677	1943	1394	1254

Výskyt jednotlivých genotypů ERIC u *P. larvae* byl charakterizován v několika zahraničních studiích. Pouze *P. larvae* genotypy ERIC I a ERIC II, avšak ani jediný izolát genotypu ERIC III ani ERIC IV, byly detekovány při prvním genotypizaci u evropských izolátů *P. larvae*. Tyto genotypy byly nalezeny u izolátů *P. larvae*, které pocházely z Finska, Německa a Švédska (Genersch *et al.*, 2006). Při genotypizaci uruguayských a argentinských izolátů byly mezi uruguayskými izoláty nalezeny pouze genotypy ERIC I a u argentinských izolátů byly nalezeny genotypy ERIC I, ERIC II a ERIC III (Antúnez *et al.*, 2007). Zatímco mezi rakouskými izoláty *P. larvae* byly nalezeny pouze genotypy ERIC I a ERIC II. Konkrétně pak 58 % izolátů patřilo ke genotypu ERIC I a 42 % izolátů ke genotypu ERIC II. Genotypy ERIC III a ERIC IV nebyly mezi rakouskými izoláty *P. larvae* nalezeny (Loncaric *et al.*, 2009). Při genotypizaci italských izolátů *P. larvae* byly také nalezeny opět pouze izoláty patřící ke genotypům ERIC I a ERIC II. Zastoupení jednotlivých genotypů u italských izolátů *P. larvae* bylo následující: 85,5 % izolátů patřilo ke genotypu ERIC I, 12,7 % izolátů patřilo ke genotypu ERIC II a 1,8 % izolátů bylo směsí genotypu ERIC I a ERIC II (Bassi *et al.*, 2014). Mezi izoláty *P. larvae* pocházejícími ze Severní Ameriky, převážně USA, pak byli nalezeni pouze zástupci genotypu ERIC I (Krongdang *et al.*, 2017). Výskyt *P. larvae* genotypu ERIC IV byl potvrzen pouze u izolátů, které pocházely se sbírky mikroorganismů, konkrétně ze Švédské sbírky - Swedish Culture Collection, University of Gothenburg, Gothenburg, Švédsko; Německé sbírky - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Leibniz institut, Braunschweig, Německo; Belgické sbírky - Belgian Coordinated Collections of Microorganisms - BCCM/LGM, Gent, Belgie a Americké sbírky - American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginie, USA (Genersch *et al.*, 2006).

## 2.2 Hniloba včelího plodu

Hniloba včelího plodu je onemocnění včel způsobené gram-pozitivní nesporulující bakterií *M. plutonius* (Bailey, 1963b). V anglicky psané literatuře je toto onemocnění obvykle označováno jako European foulbrood, velmi často používaná je i zkratka odvozená z tohoto názvu EFB.

### 2.2.1 *Melissococcus plutonius*

Taxonomické zařazení organismu:

**Doména:** Bakterie

**Kmen:** Firmicutes

**Třída:** Bacilli

**Řád:** Lactobacillales

**Čeleď:** *Enterococcaceae*

**Rod:** *Melissococcus*

V literatuře zabývající se tímto patogenem je možné nalézt řadu názvů, které byly původně používány pro *M. plutonius*. Organismus byl nejprve pojmenován jako *Bacillus pluton* (Bailey, 1983), později došlo k přejmenování organismu na základě morfologických znaků na *Streptococcus pluton* (Bailey, 1956). Další chemické a biochemické analýzy však odhalily, že ani toto zařazení nebylo zcela správné, a proto byl *Streptococcus pluton* překlasifikován na *Melissococcus pluton* a zároveň byl vytvořen nový rod anaerobně rostoucích gram-pozitivních koků (Obr. 5), nazvaný *Melissococcus* (Bailey a Collins, 1982a). Ty je obvykle možné pozorovat pod mikroskopem ve formě různě dlouhých řetízků složených z jednotek o velikosti 0,5-1,5 μm (Allen a Ball, 1993). Dalším charakteristickým znakem této bakterie je pak negativní katalasová i oxidasová reakce (Arai *et al.*, 2012). Zatím poslední změna názvu byla provedena v roce 1998, kdy byl organismus přejmenován na *Melissococcus plutonius* (Truper a de Clari, 1998).

#### 2.2.1.1 Nutriční a růstové požadavky *M. plutonius*

Na pevných kultivačních médiích roste *M. plutonius* nejčastěji ve formě drobných bílých kolonií (Obr. 5) (Allen a Ball, 1993). Pro svůj růst potřebuje vhodné pH v rozmezí 6-7. Jako optimální pH je udávána hodnota 6,5-6,6. Teplotní optimum růstu *M. plutonius* je 35 °C (Bailey, 1957). K dalším požadavkům pro růst testovaných izolátů *M. plutonius* patří poměr Na<sup>+</sup> : K<sup>+</sup> 1:1 nebo vyšší ve prospěch draselných iontů (Bailey, 1957). Pozdější testy odhalily existenci nejméně jednoho kmene *M. plutonius*, který dodržení

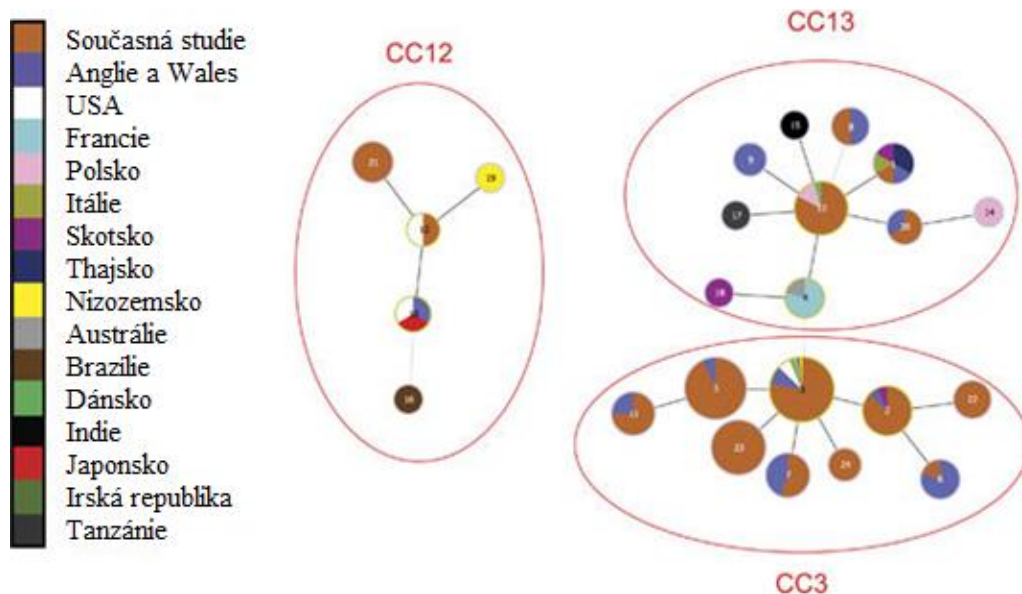
těchto poměrů sodných a draselných iontů nevyžaduje. Tyto izoláty *M. plutonius* vykazovaly schopnost růstu na půdách bez přidavku draselných solí nebo s přidavkem sodných solí (Allen a Ball, 1993; Arai *et al.*, 2012). Zároveň bakterie vyžaduje přítomnost CO<sub>2</sub> v anaerobní popřípadě mikroaerofilní atmosféře. Navíc některé testované izoláty potřebovaly pro svůj růst i přítomnost cysteinu nebo cystinu v médiu (Bailey a Collins, 1982a).

### 2.2.1.2 Genetická variabilita kmenů *M. plutonius*

První informace o složení genomu *M. plutonius* (obsah GC 29-30 %) společně s dalšími informacemi o tomto patogenu vedly k jeho vyřazení z rodu *Streptococcus* (Bailey a Collins, 1982b). Sekvence genomu vybraného zástupce *M. plutonius* (ATCC 35311) pak dříve provedenou analýzu potvrdila. Genom toho zástupce obsahuje jeden kruhový chromosom o velikosti 1 891 014 bp (obsah GC 31,4 %) a jeden plasmid o velikosti 177 718 bp (obsah GC 29,2 %). Porovnání genomu pomocí programu BLAST pak vedlo k určení nejbližšího známého příbuzného organismu *M. plutonius*. Tímto organismem je bakterie *E. faecalis* (Okumura *et al.*, 2011).



Obr. 5 Velký: kolonie *M. plutonius* na pevném médiu. Malý: mikroskopické pozorování bakterií *M. plutonius* barvených podle Grama (zvětšení: 1000x). Autor fotografií MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.



Obr. 6 MLST schéma izolátů *M. plutonius* zobrazující 3 geneticky rozdílné skupiny - clonal complex, které byly popsány u této bakterie. Převzato z Budge *et al.* (2014), upraveno. Boční legenda upřesňuje původ izolátů zobrazených v MLST schématu.

Testování vlastností izolátů *M. plutonius* z celého světa (Brazílie, Čína, Indie, USA) nejprve ukázalo velkou podobnost všech testovaných izolátů. Všechny izoláty vykazovaly sérologickou příbuznost (Allen a Ball, 1993). Také požadavky pro růst na médiu byly u všech izolátů velmi podobné. Výjimku tvořily izoláty z Brazílie, které byly schopny zpracovat více druhů substrátů a růst na větším počtu médií včetně médií s převahou sodných iontů nad draselnými (Allen a Ball, 1993). Později byl výskyt bakterií *M. plutonius* schopných metabolizovat širší spektrum substrátů a nevyžadujících přísad draselných iontů potvrzen i v Japonsku (Arai *et al.*, 2012). Tyto výsledky společně s genetickými analýzami vedly k potvrzení existence nejméně dvou geneticky rozdílných kmenů *M. plutonius*, které byly označeny jako typický a atypický *M. plutonius* (Arai *et al.*, 2012). Později byly data o DNA sekvencích izolátů *M. plutonius* z celého světa využita pro analýzu homogenity populace této bakterie. Pomocí multilokusové sekvenční typizace (MLST) bylo odhaleno 20 sekvenčních typů *M. plutonius* (Haynes *et al.*, 2013). Vytvořené MLST schéma (Obr. 6) bylo společně s nově zařazenými izoláty získanými na území Velké Británie rozděleno do tří geneticky odlišných skupin - clonal complex označených CC3, CC12 a CC13 (Budge *et al.*, 2014). Později následovala další studie zabývající se touto problematikou. Bylo nalezeno 34 sekvenčních typů *M. plutonius*, avšak všechny nově objevené sekvenční typy byly zařazeny do jedné ze tří již dříve popsaných skupin izolátů – CC3, CC12 nebo CC13 (Nakamura *et al.*, 2016). Dále bylo zjištěno, že skupiny CC3 a CC13 odpovídají

typickému *M. plutonius* a skupina CC12 atypickému *M. plutonius*, který byl popsán v Arai *et al.* (2012) (Nakamura *et al.*, 2016).

### 2.2.1.3 Biochemická charakteristika kmenů *M. plutonius*

Všechny testované kmeny metabolizují D-glukosu, D-fruktosu a D-manosu (Allen a Ball, 1993; Arai *et al.*, 2012). U vzorků *M. plutonius*, které patřily k CC12, byla navíc zjištěna schopnost zpracovat také L-arabinosu, D-celobiosu, laktosu a salicin (Arai *et al.*, 2012). Oba použité zdroje (Allen a Ball, 1993; Arai *et al.*, 2012), se ale liší v informaci o schopnosti *M. plutonius* zpracovávat sacharosu a maltosu. Allen a Ball (1993) udává, že sacharosu jsou schopny slabě metabolizovat pouze izoláty svými vlastnostmi připomínající kmeny CC12. Slabého růstu na maltose pak byly schopny všechny testované izoláty, ale atypické izoláty vykazovaly silnější růst. Zatímco Arai *et al.* (2012) udává, že žádný z testovaných kmenů nebyl schopen využít pro svůj růst ani jeden z těchto substrátů. K testovaným substrátům, které není schopen metabolizovat ani jeden z testovaných izolátů *M. plutonius* patří citrát sodný i draselný (Allen a Ball, 1993), manitol, D-xylosa, glycerol, D-melesitosa, D-rafinosa, D-sorbitol, D-rhamnosa a D-trehalosa (Arai *et al.*, 2012). Další rozdílné vlastnosti zástupců CC12 byly pozorovány při testování aktivity některých enzymů. Zatímco aktivita katalasy, oxidasy, nitrátreduktasy a ureasy nebyla zaznamenána u ani jednoho z testovaných izolátů, při testu aktivity  $\beta$ -glukosidasy byla zaznamenána aktivita pouze u zástupců atypického *M. plutonius* (Arai *et al.*, 2012). Navíc enzymy fosfatasa a  $\beta$ -galaktosidasa vykazovaly výrazně slabší aktivitu u zástupců typického *M. plutonius* oproti zástupcům atypického *M. plutonius*. Také schopnost hydrolyzovat eskulin se v testech projevila pouze u zástupců CC12 (Arai *et al.*, 2012).

### 2.2.1.4 Virulence kmenů *M. plutonius*

Další vlastností, kterou se jednotlivé kmeny *M. plutonius* liší, je virulence. Při studii provedené McKeen *et al.* (2004), pozorovali příznaky hniloby včelího plodu u larev, které byly krmeny stravou obsahující bakterie *M. plutonius* izolované přímo z nemocných jedinců. Naproti tomu při krmení larev stravou obsahující bakterie *M. plutonius*, které byly před využitím pro testování laboratorně kultivovány, nebyly pozorovány příznaky hniloby včelího plodu ani při podávání krmiva s vysokou koncentrací tohoto mikroorganismu ( $1,1 \cdot 10^9$  bakterií *M. plutonius*/ml krmiva). Tyto výsledky vedly k vyslovení podezření, že *M. plutonius* při laboratorní kultivaci může ztrácet virulenci (McKeen *et al.*, 2004). Jiné výsledky byly pozorovány při pozdějším experimentu. Byly

využity přibližně šestkrát subkultivované kmeny typického (CC3 a CC13 bez rozlišení) a atypického (CC12) *M. plutonius* o při přibližné infekční dávce  $5 \cdot 10^4$  bakterií/larvu ( $5 \cdot 10^6$  bakterií *M. plutonius*/ml krmiva, v tomto experimentu však nebyla určena minimální koncentrace nutná k propuknutí infekce) se u larev, kterým bylo podáváno krmivo s atypickým *M. plutonius*, podařilo vyvolat klinické příznaky onemocnění hniloby včelího plodu a následnou smrt. I v této studii však larvy, které byly krmeny krmivem s typickým *M. plutonius*, nevykazovaly po 5 dnech trvání experimentu vyšší úmrtnost než kontrolní skupina (Arai *et al.*, 2012). Následující studie zabývající se virulencí *M. plutonius* ve vztahu k příslušnosti testovaných bakterií k jedné ze tří skupin (clonal complex - CC) poukázala na další rozdíly ve virulenci u zástupců patřících k rozdílným skupinám (CC). Zástupce CC3 [DAT606(CC3)] stejně jako při předchozím experimentu nevyvolal do 5 dne testování výrazné příznaky hniloby včelího plodu a úmrtnost larev také nebyla nápadně zvýšená oproti kontrole. Avšak 6 den po inokulaci úmrtnost infikovaných larev výrazně vzrostla a zároveň přeživší infikované larvy vykazovaly nižší hmotnost oproti larvám kontrolním. Při 21 denním experimentu pak všichni infikovaní jedinci zahynuli, ale část infikovaných larev se stihla zakuklit (Nakamura *et al.*, 2016). Zástupce CC12 [DAT561(CC12)] opět způsobil klinické příznaky hniloby včelího plodu už do 5 dne po podání infekční dávky. Ani v tomto případě žádný z infikovaných jedinců nepřežil do konce 21 denního testování, ale na rozdíl od infekce zástupcem CC3, každý z jedinců infikovaných zástupcem CC12 uhynul před přechodem do stádia předkukly. Dalším rozdílem oproti infekci CC3 byla výrazně nižší váha larev infikovaných zástupcem CC12 (Nakamura *et al.*, 2016). Poslední testovaný kmen *M. plutonius*, zástupce CC13 [DAT585(CC13)] nezpůsobil při podávání v krmivu vyšší úmrtnost infikovaných larev oproti kontrolní skupině ani po 21 dnech testování, a to i přesto, že všichni testovaní zástupci byli původně izolováni z larev, které vykazovaly příznaky hniloby včelího plodu (Nakamura *et al.*, 2016).

### 2.2.2 Rozvoj a průběh onemocnění

Jak již název napovídá, onemocnění se projevuje u včelích larev, které se mohou nakazit kdykoliv v průběhu svého života, nejcitlivější jsou však nejmladší larvy. Nejvíce larev hyne na hnilobu včelího plodu čtvrtý až pátý den věku larvy. (Bailey a Ball, 1991; Anonym, 2016b). K infekci larvy dojde pozřením potravy, která obsahuje patogenní bakterie. *M. plutonius* se následně rozmnoží ve středním střevě infikované larvy, kde jsou vhodné podmínky pro jeho růst (Bailey a Ball, 1991). Při masivním rozšíření bakterie

bylo pozorováno proniknutí *M. plutonius* přes stěnu střeva dále do těla larvy, není však jisté, jestli k tomuto jevu dochází už před smrtí larvy (Takamatsu *et al.*, 2016). Za příhodných podmínek však nemusí dojít k masivnímu rozšíření infekce. Včelstvo je schopno se bránit šíření onemocnění pomocí vynášení mrtvých a nemocných larev ven z úlu (Bailey a Ball, 1991; Anonym, 2016b). Masivní infekce může vést až k úhynu včelstva. Období začátku léta, kdy včelstvo rychle roste, je také obdobím, kdy nakažené včelstvo přijde o největší počet larev v důsledku hniloby včelího plodu. Důležitými faktory, které ovlivňují propuknutí onemocnění, jsou počasí a potrava (Bailey a Ball, 1991; Anonym, 2016b).

Na smrti larvy se může podílet i sekundární infekce, která často doprovází onemocnění hnilobou včelího plodu (Forsgren, 2009). *Achromobacter euridice* se běžně vyskytuje u larev postižených tímto onemocněním a při laboratorních testech byla hniloba včelího plodu snáze vyvolána při podávání obou bakterií dohromady (*M. plutonius* i *A. euridice*) než při podávání pouze primárního původce onemocnění (Bailey, 1983). Na dospělé včely jsou *A. euridice* přeneseny z pylu rostlin, který sbírají. Z dospělých včel může být bakterie přenesena na včelí potomstvo při jeho krmení (Bailey, 1963a). Infekčnost fekálií včel pozitivních na *A. euridice* nebyla prokázána (Bailey, 1963a). Infekce včelstva touto bakterií obvykle kulminuje v období července a s poklesem přísunu čerstvého pylu klesá i množství *A. euridice* u studovaných včel (Bailey, 1963a). V tomto období se obvykle nejsilněji projevuje i infekce včelstva bakterií *M. plutonius* (Bailey, 1983). Další bakterií, která se běžně vyskytuje při hnilobě včelího plodu je *Enterococcus faecalis* (Forsgren, 2009). Ve vysokých dávkách je *E. faecalis* v některých případech schopen způsobit onemocnění larev, ale nemocné larvy jsou obvykle rychle vyneseny z úlu nebo infekci bez následků přežívají (Bailey, 1963b). Přeživší včely na rozdíl od včel, které přežily infekci způsobenou *M. plutonius*, nebyly při testování nadále pozitivní na bakterii, která způsobila jejich onemocnění (Bailey, 1963b). Poslední z trojice nejčastěji izolovaných bakterií z larev, které uhynuly na hnilobu včelího plodu, je *Paenibacillus alvei* (Forsgren, 2009). Avšak ani v případě této bakterie nebyly získány důkazy o schopnosti vyvolat hnilobu včelího plodu bez předchozí primární infekce *M. plutonius* (Bailey, 1963b). *P. alvei* je aerobní saprofytický organismus, kterému vyhovuje prostředí uhynulé larvy a ve střevech zdravých larev nedokáže růst (Bailey, 1963b).



### 2.2.3 Klinické projevy nemoci

K prvním vnějším projevům hniloby včelího plodu patří nižší hmotnost larvy oproti hmotnosti stejně staré zdravé larvy (Nakamura *et al.*, 2016). Včelí larva následně uhne a její barva se postupně mění z bílé, která je typická pro zdravé včelí larvy, na žlutou. Při rozkladu mrtvé larvy pak dochází k přeměně její barvy na hnědou popřípadě šedočernou. V případě, že dojde k vyschnutí mrtvé larvy v buňce, jsou tyto zbytky z buňky snadno odstranitelné. (Forsgren, 2009; Anonym, 2016b).

### 2.2.4 Epizootologický výskyt, šíření a možnosti léčby

Ne všechny larvy infikované *M. plutonius* však uhynou na hnilobu včelího plodu. Přeživší včely ale často nebývají plně vzrostlé (Bailey a Ball, 1991). Experimentem, při kterém byly larvy krmeny pomocí stravy obsahující inokulum *M. plutonius* byla stanovena minimální koncentrace buněk patogenu nutná pro propuknutí onemocnění na 200 bakterií/ml (McKee *et al.*, 2004). Také testování včelích larev na přítomnost *M. plutonius* objevilo výskyt původce hniloby včelího plodu nejen u larev z včelstev, ve kterých se vyskytovali jedinci s příznaky tohoto onemocnění, ale i u larev z klinicky zdravých včelstev (Forsgren *et al.*, 2005). Naproti tomu studie provedená ve Švýcarsku s dospělými včelami z oblastí s potvrzeným výskytem hniloby včelího plodu a z oblastí bez předchozího potvrzeného výskytu onemocnění, také objevila *M. plutonius* u včel z včelstev bez klinických příznaků hniloby včelího plodu. Počet včel ve včelstvu, které jsou pozitivní na přítomnost *M. plutonius*, klesá s rostoucí vzdáleností testovaného včelstva od oblastí s klinicky nemocnými včelstvy. Včelstva z oblastí mimo ohniska výskytu hniloby včelího plodu jsou na přítomnost *M. plutonius* negativní. (Belloy *et al.*, 2007).

*M. plutonius* může v úlu přežít řadu let v neuklizených zbytcích odpadu, který zůstal na dně buněk po vylíhnutí včel z kulek, které přežily infekci touto bakterií. Odtud se pak může dále šířit. K šíření onemocnění dochází pomocí potravy, která obsahuje bakterie *M. plutonius* (Bailey a Ball, 1991). K šíření této bakterie mezi jednotlivými včelstvy pak mohou přispívat dospělé včely, které obsahují bakterie *M. plutonius* (Belloy *et al.*, 2007).

Onemocnění včelstva hnilobou včelího plodu je možné léčit bakteriostatickými antibiotiky oxytetracyklinem. Avšak při této léčbě byl zaznamenán návrat onemocnění u 26 % léčených včelstev (Thompson a Brown, 2001). V Anglii, kde byl oxytetracyklin používán jako běžná léčba hniloby včelího plodu od roku 1967 (Waite *et al.*, 2003), nebyl při studii prováděné v letech 2000-2001 zaznamenán případ rezistence *M. plutonius* na

vybrané antibiotikum (Waite *et al.*, 2002). Byla však zjištěna vysoká pravděpodobnost znovu vzplanutí onemocnění, konkrétně 21,1 %, při léčbě hniloby včelího plodu pouze oxytetracyklinem (Waite *et al.*, 2003). Oproti tomu při přemístění všech dospělých včel do nových prostor za současné likvidace celého původního potomstva a krmení dospělých přemístěných včel cukrem s antibiotikem se v následujícím roce objevily klinické příznaky hniloby včelího plodu jen u 4,8 % zkoumaných včelstev (Waite *et al.*, 2003). V ČR ani celé EU není léčba včelstev antibiotiky legislativně povolena (Zákon č.166/1999 Sb.). Po přibližně 20 letech bylo znovu toto onemocnění diagnostikováno v roce 2015 v České republice v oblasti Pece pod Sněžkou, vedlo k vyhlášení 5 nových oblastí hniloby včelího plodu v roce 2015 a 2 nových oblastí hniloby včelího plodu v roce 2016. Dalším důsledkem znovuvypuknutí nákazy bylo utracení 38 a 24 včelstev a likvidace veškerého včelařského vybavení v ohniscích nákazy (SVS, 2015; SVS, 2016; SVS, 2017a).

## **2.2.5 Diagnostické metody choroby v klinické praxi**

### **2.2.5.1 Klinické prohlídky a mikroskopická pozorování**

Potvrdit přítomnost *M. plutonius* je možné řadou metod. Často přítomné bakterie sekundární infekce však diagnostiku této bakterie ztěžují. První diagnóza je obvykle naznačena při vizuální kontrole, kdy kontrolující osoba hledá larvy, které vykazují klinické příznaky hniloby včelího plodu (Forsgren, 2009). Podezření na přítomnost *M. plutonius* je možné potvrdit pomocí mikroskopického pozorování preparátů připravených z larev nemocných hnilobou včelího plodu (Alippi, 1991).

### **2.2.5.2 Kultivační metody**

Dále je možné využít kultivační techniky a selekci pomocí specifických podmínek, které vyhovují právě původci hniloby včelího plodu. Jedno z prvních úspěšně použitých kultivačních médií – Basal medium, které se v mnoha úpravách stále využívá, je založené na kvasničném extraktu, glukose a dihydrogenfosforečnanu draselném (Bailey, 1957). Běžně používanou úpravou tohoto média je přidání cysteinu a škrobu (Bailey a Collins, 1982a). Jako další vylepšení kultivačního média bylo navrženo použití antibiotika kyseliny nalidixové, která má zabránit růstu sekundární mikroflóry (Forsgren *et al.*, 2013).

### 2.2.5.3 Imunochemické metody

Vyvinut byl také kit (The Vita European foulbrood (EFB) Diagnostic Test Kit - Vita Bee Health, Basingstoke, UK) pro orientační diagnostiku hniloby včelího plodu, který využívá detekci pomocí monoklonální protilátky specifické na *M. plutonius*, přímo na místě odběru vzorku (Tomkies *et al.*, 2009). Pro laboratorní detekci *M. plutonius* v homogenátu vyrobeného ze vzorků včel byl vytvořen imunologický test (ELISA), který je schopen detekovat až  $10^5$  buněk *M. plutonius*/ml homogenátu (Pinnock a Featherstone, 1984).

### 2.2.5.4 Molekulárně biologické metody

Neopomenutelná je i řada metod pro detekci *M. plutonius* založená na polymerasové řetězové reakci (PCR). Govan *et al.* (1998) navrhl primery na sekvenci genu 16S rRNA *M. plutonius*, které použil pro amplifikaci DNA patogenu z nemocných larev. Při testování specifity primerů nebyla amplifikována DNA žádné z testovaných bakterií kromě *M. plutonius* (Govan *et al.*, 1998). Při pozdějším testu specifity tyto primery poskytovaly nespecifický produkt o přibližné velikosti 1,3 kbp respektive 1,5 kbp pro *P. alvei* respektive *E. faecalis* (Arai *et al.*, 2013). Djordjevic *et al.* (1998) vytvořil primery pro hemi-nested PCR, která využívá trojice primerů navržených také na sekvenci genu 16S rRNA *M. plutonius*. Při testech specifity PCR analýzy nebyl zaznamenán produkt typický pro *M. plutonius* u *E. faecalis* ani dalších testovaných bakterií. Mezi dalšími testovanými bakteriemi, které nezpůsobovaly falešnou pozitivitu při PCR analýze s navrženými primery, byly mimo jiné i *P. larvae* a *P. alvei*. I zde byl ale v některých případech zaznamenán nespecifický produkt u několika bakteriálních druhů (Arai *et al.*, 2013). Metoda, vytvořená Djordjevic *et al.* (1998), byla následně využita pro detekci *M. plutonius* ve vzorcích larev, dospělých včel, medu a pylu (McKee *et al.*, 2003). Real-time PCR pro detekci a kvantifikaci *M. plutonius*, byla vyvinuta ve Švýcarsku (Roetschi *et al.*, 2008). Předchozí PCR analýzy dokázaly určit přítomnost všech zástupců *M. plutonius* v řadě typů vzorků (nejčastěji infikované larvy), ale nebylo možné je od sebe rozlišit. Proto byla vyvinuta nová PCR analýza využívající 2 dvojice primerů, které poskytují rozdílně velké produkty při PCR pro typického (zástupci patří do skupiny CC3 a CC13) a atypického (zástupci patří do skupiny CC12) *M. plutonius*. Selektivita analýzy byla potvrzena pomocí použití DNA z řady různých bakterií včetně obou kmenů *M. plutonius*, zástupců příbuzného rodu *Enterococcus* a dalších patogenních i běžně se vyskytujících bakterií u včel jako templátu pro vytvořenou duplex-PCR (Arai

*et al.*, 2013). Novější analýza pak za pomoci amplifikace a sekvenace úseků 4 vybraných genů umožňuje zařazení testovaného izolátu do vytvořeného fylogenetického stromu zástupců *M. plutonius* (Budge *et al.*, 2014).

Další metoda využívá zlaté nanočástice s DNA próbou specifickou na DNA *M. plutonius*. Po hybridizaci vyizolované DNA patogenu s próbou přítomnou na zlatých nanočásticích dochází k jejich shlukování a to vede ke změně barvy roztoku. Tuto změnu je pak možné kolorimetricky stanovit (Saleh *et al.*, 2012).

#### 2.2.5.5 Aktuálně zavedená klinická diagnostika ve veterinárních laboratořích

SVÚ Olomouc využívá pro laboratorní diagnostiku hniloby včelího plodu diagnostické metody popsané v OIE Terrestrial Manual. Tento mezinárodní dokument obsahuje závaznou metodiku pro diagnostiku onemocnění hospodářských zvířat (Anonym, 2016b). Konkrétně pak pro orientační určení je možné využít mikroskopické vyšetření společně s barvením dle Grama nebo nigrosinem. Dále je využívána kultivace na médiu B64 (obsahujícím kvasničný extrakt, pepton, neopepton, trypton, cystein, glukosu, škrob, dihydrogenfosforečnan draselný a agar, pH 7,2) společně s biochemickými testy popřípadě identifikací pomocí MALDI Biotyping nebo PCR. Metody využívající identifikaci *M. plutonius* přímo z podezřelého materiálu zatím nejsou v ČR plošně zavedeny a vyzkoušeny. Komerční testy pro identifikaci *M. plutonius* založené na interakci vzorku s protilátkou v ČR nejsou běžně dostupné.

### 3 TEORETICKÝ ÚVOD DO HLAVNÍCH VYUŽÍVANÝCH METOD

#### 3.1 Izolace DNA

Izolaci DNA lze provádět řadou různých způsobů. Vybraná metoda obvykle závisí na typu vzorku a typu následné analýzy (Tan a Yiap, 2009). Jako první krok řady analýz je vhodně zvolená a provedená izolace DNA jedním ze stěžejních kroků vedoucích ke správnému výsledku prováděné analýzy (Olexová *et al.*, 2004).

Prvním krokem při izolaci DNA je obvykle homogenizace vzorku a lyze buněk. K ní může dojít pomocí fyzikální i chemické metody nebo za využití enzymu (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Příkladem mechanického narušení buněk je jejich drcení (Khanuja *et al.*, 1999), využití tekutého dusíku společně s drcením buněk (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008) popřípadě vystavení vzorku zvýšené teplotě (Hosek *et al.*, 2006), která může zároveň odstranit aktivitu řady nukleas přítomných ve vzorku (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Jako příklad chemické lyze buněk lze uvést využití alkalické lyze buněk (Goldenberger *et al.*, 1995; Tan a Yiap, 2009) nebo využití různých detergentů a chaotropních solí jako součást lyzačních pufrů např. guanidin isothiokyanát - GITC (Evans *et al.*, 2013), dodecylsírán sodný - SDS (Angeles *et al.*, 2005), cetrimoniumbromid - CTAB (Khanuja *et al.*, 1999) nebo Triton-X 100 (Goldenberger *et al.*, 1995). Pro enzymatickou lyzi jsou využívány například lysozym (Hosek *et al.*, 2006) nebo proteinasa K (Goldenberger *et al.*, 1995). Velmi častá je i kombinace různých způsobů lyze buňky (Goldenberger *et al.*, 1995; Khanuja *et al.*, 1999; Hosek *et al.*, 2006; van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2013).

První z nejběžněji využívaných metod izolací DNA z homogenizovaných vzorků je purifikace pomocí komerčních extrakčních kitů. Ta je obvykle založená na zachycení DNA na pevné fázi (Tan a Yiap, 2009). Bylo zjištěno, že silikátová pevná fáze nebo skleněné kuličky váží v přítomnosti chaotropních solí nukleové kyseliny (Boom *et al.*, 1990). DNA zachycená na pevné fázi je obvykle promyta a poté je vymyta z pevné fáze do elučního pufru (Tan a Yiap, 2009). Stále využívaná je také extrakce DNA pomocí fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 25:24:1 (Hosek *et al.*, 2006). Další metoda využívaná pro přečištění DNA zahrnuje její srážení pomocí isopropanolu a následné promytí 70 % ethanolem. Po vysušení je pak vzorek opět rozpuštěn ve vhodném pufru (Khanuja *et al.*, 1999).

Dále může být v protokolu pro izolaci DNA obsažena řada dalších optimalizačních kroků. Časté jsou přísady různých aditiv do lyzačních pufrů za účelem odstranění

nežádoucích látek (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Jako příklad takovýchto látek lze uvést polyvinylpyrrolidon - PVP (Khanuja *et al.*, 1999; van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008), kyselina ethylendiamintetraoctová - EDTA (Boom *et al.*, 1990; Goldenberger *et al.*, 1995; Hosek *et al.*, 2006), 2-merkapt ethanol (Khanuja *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2013).

## 3.2 Polymerasova řetězová reakce

Pod zkratkou PCR pocházející z anglického názvu Polymerase Chain Reaction se skrývá metoda, která umožňuje vytvoření velkého množství kopií vybraného úseku DNA. Za tuto široce využívanou metodu byla v roce 1993 udělena Nobelova cena za chemii (Mullis, 1997).

Metoda využívá schopnosti DNA-polymerasy syntetizovat nové vlákno DNA podle DNA předlohy (templátu). Enzym postupně přidává jednotlivé nukleotidy, které musí být přítomny ve formě nukleotidtrifosfátu (Mullis, 1990). Pořadí jednotlivých nukleotidů je pak určeno pomocí komplementárního párování bází podle DNA templátu (Mullis, 1990). Velkým vylepšením metody pak bylo využití termostabilní DNA-polymerasy, které zvýšilo citlivost, i specifitu reakce (Saiki *et al.*, 1988). První využívaná termostabilní DNA-polymerasa byla získána z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988).

### 3.2.1 Složení reakční směsi pro standardní PCR

Jak již bylo zmíněno, v reakci musí být přítomny nukleotidtrifosfáty a DNA-polymerasa. Koncentrace nukleotidtrifosfátů v reakci musí být nastavena tak, aby byla DNA-polymerasa dostatečně saturovaná, ale zároveň nesmí být ani příliš vysoká, aby nedocházelo k chybnému párování bází (Arnheim a Erlich, 1992). Množství DNA-polymerasy je nutné přizpůsobit použitému enzymu, u Taq DNA-polymerasy obvykle dostačuje množství 0,2-2 U (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Nezbytnou součástí reakce je také pufr, který utváří vhodné reakční prostředí pro správné fungování DNA-polymerasy (Arnheim a Erlich, 1992). Další důležitou součástí reakce je  $MgCl_2$ , který je zdrojem kofaktoru  $Mg^{2+}$  pro DNA-polymerasu. Obvyklá koncentrace v reakci je 0,5-5mM  $MgCl_2$  (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Podstatnou součástí reakční směsi jsou také krátké úseky jednovláknové DNA (primery), které vymezují amplifikovanou oblast (Mullis, 1990). Správně vytvořené primery jsou jednou ze základních podmínek pro správný výsledek PCR (Garibyan a Avashia, 2013). První ze základních podmínek pro tvorbu primerů je vhodný výběr

sekvence templátové DNA, na kterou budou primery navrženy. Tu je třeba přizpůsobit požadavkům na specifitu PCR. Vybraná oblast musí být dostatečně rozdílná, aby nedocházelo k tvorbě produktů s DNA mimo cílovou oblast, organismus nebo vybranou skupinu organismů a zároveň musí být tato oblast DNA dostatečně konzervovaná, aby byla zachována například u všech zástupců kmene, druhu, vybrané skupiny (Dieffenbach *et al.*, 1993). Obvyklá délka primerů je 18-30 bp a je třeba dbát, aby primery nebyly komplementární k sobě vzájemně ani netvořily 3D struktury (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Ideální teplota hybridizace primerů s templátovou DNA je v rozmezí 56-62 °C a musí být u obou primerů použitých v jedné reakci co nejbližší (Dieffenbach *et al.*, 1993). Obsah GC bází je obvykle 40-60 % a na 3'konci každého primeru je vhodné umístit tzv. „GC clamp“ - nejméně 1 až 2 poslední báze na 3'konci primeru jsou právě G nebo C (Roux, 1995). Obvyklá délka PCR produktu pak odpovídá 150-1000 bp (Dieffenbach *et al.*, 1993). Obvyklá koncentrace každého z použitých primerů jsou v rozmezí 0,1-1 μM (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Poslední standardní součástí reakční směsi je vybraný DNA templát, který je obvykle přidáván v množství 10 fg-10 μg na reakci (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

### **3.2.2 Průběh standardní PCR a vizualizace produktů na agarosovém gelu**

PCR obvykle obsahuje 3 základní periodicky se opakující kroky, které dohromady tvoří jeden cyklus. Obvyklý počet cyklů pro standardní PCR je okolo 30 (Barry a Eisenstein, 1990). Prvním krokem cyklu je denaturace DNA, která obvykle probíhá při 95-98 °C po dobu 0,5-2 min (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Ta je následována krokem, ve kterém dochází k nasednutí primerů na komplementární úseky DNA templátu (Arnheim a Erlich, 1992). Tento krok probíhá obvykle při teplotě 45-65 °C po dobu 0,5-1 min (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Teplota v tomto kroku je odvozena od teploty tání použitých primerů. Obvykle je nejprve vybrána o 2-5 °C nižší než je vypočítaná teplota hybridizace použitých primerů s templátovou DNA (Roux, 1995). V řadě případů je nutné najít vhodnou teplotu hybridizace empiricky (Roux, 1995). V závěrečném kroku pak dochází k syntéze nového vlákna DNA podle templátů v oblasti vymezené primery (Barry a Eisenstein, 1999). Tento krok probíhá při teplotě optimální pro použitou DNA-polymerasu, která je obvykle kolem 70 °C (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Doba samotné replikace DNA je závislá na velikosti produktu a rychlosti DNA-polymerasy

(van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Výsledné produkty PCR reakce jsou následně elektroforeticky separovány na 0,5-2% agarosovém gelu (Lee *et al.*, 2012).

Pro agarosovou elektroforézu nukleových kyselin se nejčastěji používá jeden z těchto dvou pufrů: TAE (Tris-acetátový pufr s EDTA) nebo TBE (Tris-borátový pufr s EDTA) (Westermeier, 2016). Ke vzorku separovanému při agarosové elektroforéze nukleových kyselin se obvykle přidávají dva typy barviv (Lee a Bahaman, 2012). Nanášecí barva dodává hustotu a barvu vybranému vzorku a usnadňuje tak práci se vzorkem (Lee *et al.*, 2012). Vizualizaci pak obvykle zajišťuje interkalační fluorescenční barva, která je následně zviditelněna pomocí UV světla v UV transiluminátoru (Garibyan a Avashia, 2013). Pro odhad velikosti separovaných fragmentů nukleových kyseliny jsou obvykle využívány komerční markery (Lee a Bahaman, 2012).



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

##### 4.1.1.1 Izoláty *P. larvae* pro genotypizaci pomocí ERIC PCR

Pro genotypizaci *P. larvae* pomocí PCR s ERIC primery bylo použito celkem 105 terénních izolátů *P. larvae*, které poskytl Státní veterinární ústav v Olomouci. Tyto izoláty byly získány ze zachycených případů výskytu onemocnění mor včelího plodu na území ČR v letech 2016-2017.

Vzorky pozitivních kontrol (izoláty *P. larvae* genotyp ERIC I a *P. larvae* genotyp ERIC II) byly připraveny pro ERIC PCR (4.2.1.3) stejně jako terénní izoláty *P. larvae* (4.2.1.2). Pozitivní kontroly byly získány ze švédského pracoviště od dr. Evy Forsgren z Uppsaly (SLU) a z Italského pracoviště od dr. Eleny Carra z Modeny (IZSLER).

##### 4.1.1.2 Vzorky pro testy detekce *M. plutonius* z komplexních matric

Vzorky medů o hmotnosti 1 g byly obohaceny o bakterii *M. plutonius*. Tyto vzorky uměle infikovaných medů byly připraveny ve Státním veterinárním ústavu v Olomouci a do použití byly skladovány při teplotě -30°C.

Dále byly použity vzorky úlových mělí o hmotnosti 1 g, které byly obohaceny o různá množství bakterií *M. plutonius*. Tyto vzorky uměle infikovaných úlových mělí byly připraveny ve Státním veterinárním ústavu v Olomouci a do použití byly skladovány při teplotě -30°C.

#### 4.1.2 Chemikálie

Pro experimenty, přípravu médií a roztoků byly použity následující chemikálie:

- 2-Log DNA Ladder (0,1 – 10,0 kb) (NEB, USA)
- Bakteriologický agar (Carl Roth GmbH, Německo)
- Bakteriologický pepton (Oxoid, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)
- EDTA (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA)
- Fruktosa (Erba Lachema, ČR)
- GelRed (Biotium, ČR)
- Glukosa (Lach-Ner, ČR)

GoTag Green Master Mix, 2x (Promega, USA)  
Guanidin isothiokyanát (Serva, Německo)  
Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)  
Hydroxid draselný (Lach-Ner, ČR)  
Chlorid sodný (PENTA, ČR)  
InstaGene Matrix (Bio-Rad, USA)  
Kvasničný extrakt (Carl Roth GmbH, Německo)  
Kyselina chlorovodíková 35 % (Lach-Ner, ČR)  
Kyselina octová ledová (Lach-Ner, ČR)  
L-cystein hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA)  
L-cystein hydrochlorid monohydrát (Carl Roth GmbH, Německo)  
LE agarosa (Lonza, ČR)  
Mueller-Hinton broth (Carl Roth GmbH, Německo)  
Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, USA)  
Škrob rozpustný bramborový (Lach-Ner, ČR)  
Trypticasa (Becton Dickinson, USA)  
Tris (Sigma-Aldrich, USA)  
Triton X-100 (Serva, Německo)  
Voda pro molekulární biologii (Sigma-Aldrich, USA)  
 $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

### 4.1.3 Komerční kity

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo)  
FastStart Taq DNA Polymerase (Roche, Švýcarsko)  
Genbox anaer (Biomedix, USA)

### 4.1.4 Roztoky a média

**0,8 % (w/v) agarosový gel** - 0,8 g agarosa, 100 ml TAE pufr.

**50× TAE** – 121 g Tris-HCl, 28,55 ml ledová kyselina octová, 7,306 g EDTA, doplněno do 500 ml, autoklávováno.

**GITC pufr** -  $5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  guanidin isothiokyanát,  $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl (pH 6,4),  $20\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA, 1,3% Triton X-100, autoklávováno, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol.

**MYPGP agar** – 10 g Mueller-Hinton broth, 15 g kvasničný extrakt, 3 g hydrogenfosforečnan draselný, 1 g pyruvát sodný, 20 g agar, doplněno do 1 l, autoklávováno.

**Basal medium** – 10 g glukosa, 10 g kvasničný extrakt, 10 g škrob, 0,25 g L-cysten, 20 g agar, 100 ml  $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dihydrogenfosforečnan draselný, upraveno  $2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydroxidem sodným na pH 6,6 doplněno do 1 l, autoklávováno.

**Basal tekuté medium** – 10 g glukosa, 10 g kvasničný extrakt, 10 g škrob, 100 ml  $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dihydrogenfosforečnan draselný, upraveno  $2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydroxidem sodným na pH 6,6 doplněno do 1 l, autoklávováno přidáno 2,5 ml 10% L-cysteinu (filtrováno), připraveno vždy až před použitím.

**M110 medium** – 10 g glukosa, 2,5 g kvasničný extrakt, 2 g škrob, 2,5 g bakteriologický pepton, 5 g neopepton, 2 g tripticasa, 21,95 ml  $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydrogenfosforečnan draselný, 28,05 ml  $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dihydrogenfosforečnan draselný upraveno  $2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydroxidem sodným na pH 7,2 doplněno do 1 l, autoklávováno přidáno 2,5 ml 10% L-cysteinu monohydrátu (filtrováno), připraveno vždy až před použitím.

**Fyziologický roztok** – 1% glukosa, 0,9% chlorid sodný, autoklávováno.

#### 4.1.5 Pomůcky a přístroje

Box dekontaminační-UV (Biosan, Lotyšsko)

Centrifuga 5418R (Ependorf, Německo)

Centrifuga Multi-Spin MSC-600 (Biosan, Lotyšsko)

Elektroforetická komůrka SafeBlue (Biotech, ČR)

Gel Doc Ez Imager (Bio-Rad, USA)

Laminární box Bioban 48 (Angelantoni Life Science, Itálie)

Míchačka MSM-300 (Biosan, Lotyšsko)

Mikrocentrifuga MS-600 (Biosan, Lotyšsko)

Reader multifunkční Synerg (Biotech, ČR)

Cytation 5 imaging reader (Biotech, ČR)

Termocykler T100 (Bio-Rad, USA)

Termostat Q-cell 60/40 (Verkon, ČR)

Třepačka TS-100 (Biosan, Lotyšsko)

Váhy 440-47 (Kern, Německo)

Váhy SI-114 (Denver Instrument, USA)

Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

#### 4.1.6 Sekvence primerů

Pro reakce PCR byly použity následující primery:

Využití	Primery	Sekvence	Velikost	Publikováno
Primery použity pro genotypizaci <i>P. larvae</i> dle ERIC primerů	ERIC1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGA TTCAC-3'	více produktů	Versalovic <i>et al.</i> (1994)
	ERIC2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGT GAGCG-3'		
Primery použity pro detekci DNA <i>M. plutonius</i>	Primer 1	5'-GAAGAGGAGTTAAAAGG CGC-3'	831 bp	Govan <i>et al.</i> (1998)
	Primer 2	5'-TTATCTCTAAGGCGTTCA AAGG-3'		

Pro PCR reakci byly použity roztoky primerů naředěné na koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## 4.2 Metody

Při přípravě vzorků byly dodržovány zásady práce ve sterilním prostředí. Pufry AP1, AP2 a AW jsou součástí kitu (DNeasy Plant Mini Kit - Qiagen) využitého pro izolaci DNA z mezu i měli. Většina centrifugačních kroků probíhala za laboratorní teploty, a proto není u každého kroku tato teplota uvedena. Pokud probíhala centrifugace při jiné než laboratorní teplotě je daná teplota uvedena u konkrétního kroku, při kterém byla použita.

### 4.2.1 Genotypizace terénních izolátů *P. larvae* dle ERIC primerů

#### 4.2.1.1 Kultivace *P. larvae*

Vzorky terénních izolátů *P. larvae* získané z SVÚ Olomouc byly přeočkovány na MYPGP médium a inkubovány po dobu nutnou k jejich růstu na tomto médiu při 37 °C. Obvykle 1-4 dny. Tyto bakteriální kultury byly následně znovu přeočkovány na MYPGP médium. V případě výskytu morfologicky rozdílných kolonií na médiu byli z každého typu kolonie přeneseni zástupci na vlastní misku s MYPGP médiem. Přeočkované bakteriální kultury pak byly inkubovány po dobu přibližně 24 h při 37 °C a následně byly využity pro izolaci DNA (4.2.1.2).

#### 4.2.1.2 Izolace DNA *P. larvae* pro genotypizaci dle ERIC primerů

Izolace DNA probíhala s drobnými úpravami podle protokolu popsánému v Bassi *et al.* (2015). Bakteriální kultury (4.2.1.1) byly rozsuspendovány v 1 ml sterilní deionizované vody a následně centrifugovány 1 min při 12 000 × g. Z každého vzorku bylo odebráno 800 µl supernatantu a ke každému peletu s 200 µl zbývajících supernatantu bylo přidáno 200 µl InstaGene matrix. Vzorky byly krátce vortexovány. Následně byly vzorky inkubovány 30 min při 56 °C a 1 400 rpm, 10 s vortexovány, poté inkubovány 8 min při 100 °C a 1 400 rpm a znovu 10 s vortexovány. Vzniklé lyzáty byly centrifugovány 3 min při 12 000 × g, jednotlivé pelety byly ponechány a z každého vzorku byla opatrně odebrána část supernatantu. Byla změřena koncentrace DNA v supernatantech a následně byly odebrané části supernatantů naředěny na 30 ng·µl<sup>-1</sup>. Vzorky naředěné DNA byly inkubovány 15 min při 65 °C a 1 400 rpm a poté byly využity jako templáty pro PCR (4.2.1.3). V případě pozdějšího použití izolovaných DNA byly získané pelety i supernatanty po centrifugačním kroku (3 min při 12 000 × g) a změření koncentrace DNA uchovány dohromady při teplotě -20 °C. Před použitím byly vzorky rozmrazeny, vortexovány a centrifugovány 3 min při 12 000 × g a část každého supernatantu byla

naředěna na 30 ng·μl<sup>-1</sup>. Naředěné vzorky byly inkubovány 15 min při 65 °C a 1400 rpm a využity pro PCR (4.2.1.3).

#### 4.2.1.3 PCR pro genotypizace *P. larvae* dle ERIC primerů

Nejprve byl připraven PCR premix, složení viz (Tab. 3). Do každé 25 μl reakce pak bylo přidáno 20 μl premixu a 5 μl jedné z připravených naředěných DNA (4.2.1.2), jedna z pozitivních kontrol (4.1.1) nebo do negativní kontroly 5 μl vody použité pro přípravu PCR premixu. Teploty a časy cyklů pak byly nastaveny podle (Tab. 4). Vizualizace vzniklých produktů probíhala pomocí elektroforézy v 1× TAE pufrem a agarosovém gelu barveném ethidium bromidem. Pro vizualizaci PCR produktů bylo nejprve připraveno 100 ml 0,8% agarosového gelu, do kterého bylo přidáno 100 μl 0,07% ethidium bromidu. Genotypy jednotlivých izolátů byly určeny podle podobnosti s jednou z pozitivních kontrol.

Tab. 3. Složení reakce pro PCR s genotypizací *P. larvae* dle ERIC primerů

PCR dle ERIC primerů	
Složení premixu pro 1 reakci	
10xPCR pufr bez MgCl <sub>2</sub>	2,50 μl
25mM MgCl <sub>2</sub>	2,50 μl
dNTPs	0,63 μl
ERIC1R primer (10μM)	2,50 μl
ERIC2 primer (10μM)	2,50 μl
voda (pro mol.bio)	8,87 μl
DNA polymerasa	0,50 μl
Využity chemikálie (kromě vody a primerů) z FastStart Taq DNA Polymerase, 5 U/μl (Roche)	

Tab. 4. Teploty a časy cyklů pro PCR pro genotypizace *P. larvae*

PCR s GoTaq Green Master Mix a Primery 1 a 2		
1.	95 °C	5 min
2.	95 °C	1 min
3.	53 °C	1 min
4.	72 °C	3 min
5.	72 °C	10 min
krok 2-4 50x opakován		

## 4.2.2 Určení přítomnosti *M. plutonius* v úlové měli

### 4.2.2.1 Příprava vzorků mělí nebo medu s přídavkem *M. plutonius*

Bakteriální kultura *M. plutonius* (získaná z SVÚ Olomouc) byla naočkována na pevné Basal medium. Kultury byly následně anaerobně kultivovány pomocí systému Genbox anaer (Biomedrix) při 37 °C 7 dní. Narostlé kolonie byly sterilně přeneseny do fyziologického roztoku do zákalu 1°Mc Farlanda. Takto připravená kultura obsahovala  $3 \cdot 10^8$  bakterií *M. plutonius* v 1 ml. Dalším ředěním, kdy bylo vždy přidáno do 9 ml fyziologického roztoku 1 ml kultury s 10 násobnou koncentrací *M. plutonius* než je koncentrace připravovaná, byly připraveny i ostatní kultury s nižšími koncentracemi bakterií *M. plutonius* ( $3 \cdot 10^7$ ;  $3 \cdot 10^6$ ;  $3 \cdot 10^5$ ;  $3 \cdot 10^4$ ; bakterií *M. plutonius* v 1 ml). Následně bylo k odváženým mělím o hmotnosti 4,5 g přidáno 0,5 ml připravené kultury s 10 násobnou koncentrací *M. plutonius* než je požadovaná koncentrace vytvářeného vzorku. Vše bylo následně pečlivě smícháno dohromady a z homogenizovaných směsí byly odváženy vzorky o hmotnosti 1 g, které byly dále využity.

### 4.2.2.2 Izolaci DNA ze vzorků úlové měli

Ke každému vzorku (4.1.1 nebo 4.2.2.1) byly přidány 3 ml GITC pufru. Vzorky byly vortexovány  $3 \times$  po 50 s a centrifugovány 3 min při  $10\,000 \times g$ . Následně bylo 400  $\mu$ l z každého supernatantu smícháno s 130  $\mu$ l AP2 pufru. Vzorky byly promíchány a inkubovány 5 min na ledu. V těchto krocích proběhl návrat k postupu, který byl doporučen výrobcem použitého komerčního kitu (DNeasy Plant Mini Kit). Další kroky pak probíhaly podle těchto doporučení až do kroku, kdy byl na kolonku podruhé nanesen AW pufr. Ten byl odstraněn centrifugací 1 min při  $6\,000 \times g$ . Následně byly kolonky přeneseny do nových mikrozkušavek, vysušeny pomocí 2 centrifugací 2 min při  $16\,900 \times g$  a přeneseny do dalších čistých mikrozkušavek. Na středy kolonek bylo opatrně nanášeno 50  $\mu$ l AE pufru a vzorky byly inkubovány 5 min při laboratorní teplotě. Kolonky byly centrifugovány 1 min při  $6\,000 \times g$ . Roztoky, které prošly přes kolonky, byly zachyceny. V takto připravených vzorcích DNA z úlové měli byla spektrofotometricky určena koncentrace DNA. Jako templát do PCR (4.2.2.3) pak bylo použito takové množství vzorku, aby při napipetování 1-6  $\mu$ l vzorku bylo do reakce přidáno 130-220 ng DNA.

### 4.2.2.3 PCR pro potvrzení přítomnosti DNA *M. plutonius* v komplexní matrici

Nejprve bylo připraveno odpovídající množství PCR premixu, složení viz tabulka (Tab. 5). Do jedné reakce pak bylo přidáno 19-24  $\mu\text{l}$  připraveného premixu podle množství vkládaného templátu (1-6  $\mu\text{l}$  vzorku 4.2.2.2 nebo 4.2.3.2), tak aby konečný objem jedné reakce odpovídal 25  $\mu\text{l}$ . Vždy byla připravena také pozitivní kontrola, kdy byl do reakce přidán místo vzorku 1  $\mu\text{l}$  DNA *M. plutonius* izolované z napěstované kultury (4.2.4) a negativní kontrola, kde byl místo vzorku použit 1  $\mu\text{l}$  vody. Termocykler byl nastaven podle tabulky (Tab. 6). Vzniklé produkty byly separovány pomocí agarosové elektroforézy v 0,8% gelu a 1 $\times$ TAE pufru a následně vizualizovány pomocí barvy GelRed (2,5  $\mu\text{l}$  barviva na 60 ml agarosového gelu).

Tab. 5. Složení reakce pro PCR potvrzující přítomnosti DNA *M. plutonius*

PCR <i>M. plutonius</i> + GC rich	
Složení premixu pro 1 reakci	
10xPCR pufr bez MgCl <sub>2</sub>	2,5 $\mu\text{l}$
25mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 $\mu\text{l}$
GC rich	5 $\mu\text{l}$
Primer 1	1,5 $\mu\text{l}$
Primer 2	1,5 $\mu\text{l}$
dNTPs	0,5 $\mu\text{l}$
DNA polymerasa	0,5 $\mu\text{l}$
Voda	5/6/7/8/9/10 $\mu\text{l}$
Templát	6/5/4/3/2/1 $\mu\text{l}$
Využity chemikálie (kromě vody a primerů) z FastStart Taq DNA Polymerase, 5 U/ $\mu\text{l}$ (Roche)	

Tab. 6. Teploty a časy cyklů pro PCR potvrzující přítomnosti DNA *M. plutonius*

PCR <i>M. plutonius</i> + GC rich		
1.	95 °C	5 min
2.	95 °C	1 min
3.	55 °C	1 min
4.	72 °C	1 min
5.	72 °C	5 min
krok 2-4 34x opakován		



### 4.2.3 Určení přítomnosti *M. plutonius* v medu

#### 4.2.3.1 Předpříprava vzorku pro izolaci DNA *M. plutonius* z medu

Vzorky medu byly připraveny analogicky jako vzorky měli (4.2.2.1). K odváženým medům o hmotnosti 4,5 g přidáno 0,5 ml připravené kultury s 10 násobnou koncentrací *M. plutonius* než je požadovaná koncentrace vytvářeného vzorku. Vše bylo následně pečlivě smícháno dohromady a z homogenizovaných směsí byly odváženy vzorky o hmotnosti 1 g, které byly dále využity. Ke každému vzorku medu s obsahem *M. plutonius* přidáno 2,25 ml autoklávované demineralizované vody. Medy s vodou byly vortexovány až do vytvoření homogenní směsi. Dále byla každá vzniklá směs centrifugována 30 min při  $16\ 000 \times g$ . Supernatanty byly opatrně odebrány a pelety byly promyty v dalších 2 ml autoklávované demineralizované vody. Po centrifugaci 30 min při  $16\ 000 \times g$  byly získány nové pelety, které byly následně využity pro izolaci bakteriální DNA (4.2.3.2).

#### 4.2.3.2 Izolace DNA z medu

Ke každému peletu (4.2.3.1) bylo přidáno 400  $\mu$ l AP1 pufru a dále bylo postupováno podle doporučení výrobce použitého kitu (DNeasy Plant Mini Kit) až do kroku, kdy byl na kolonku podruhé nanesen AW pufr. Ten byl odstraněn centrifugací 1 min při  $6\ 000 \times g$ . Následně byly kolonky vysušeny pomocí 2 centrifugací 2 min při  $16\ 900 \times g$  a přeneseny do čistých mikrozkušavek. Na střed každé kolonky bylo opatrně naneseno 50  $\mu$ l AE pufru a vzorky byly inkubovány 5 min při laboratorní teplotě. Kolonky byly centrifugovány 1 min při  $6\ 000 \times g$ . Z každého vzorku byl zachycen roztok, který protekl přes kolonku. Takto vzniklý vzorek byl následně použit pro potvrzení přítomnosti DNA *M. plutonius* pomocí PCR (4.2.2.3) Kdy bylo jako templát použito takové množství vzorku, aby při napipetování 1-6  $\mu$ l vzorku bylo do reakce přidáno 40-80 ng DNA.

#### 4.2.4 Izolace DNA z napěstované kultury *M. plutonius*

Z napěstované bakteriální kultury *M. plutonius* na Basal mediu bylo setřeno sterilní kličkou větší množství narostlých kolonií. Tyto kolonie byly přeneseny a suspendovány ve 100  $\mu$ l autoklávované demineralizované vody. Suspenze byla inkubována 10 min na třepačce nastavené na 1 400 rpm a 100 °C. Poté byl vzorek centrifugován 3 min při  $11\ 000 \times g$ . Čirý supernatant byl odebrán, naředěn na koncentraci 2 ng  $\cdot \mu$ l<sup>-1</sup> a použit jako pozitivní kontrola do PCR (4.2.2.3).

#### 4.2.5 Testy možností kultivace *M. plutonius*

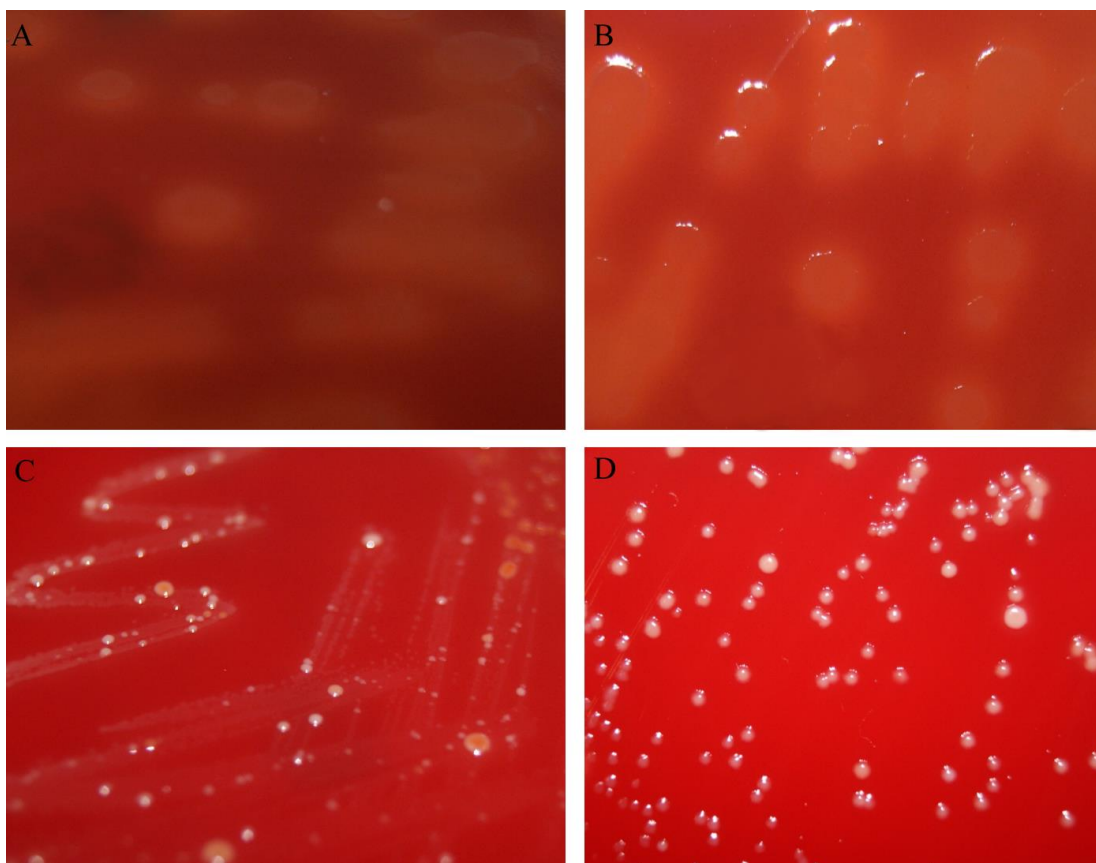
Byl testován postup kultivace *M. plutonius* v tekuté kultuře za současného měření hodnot absorbance při vlnové délce 600 nm.

K 50 ml čerstvě připraveného M100 média v uzavíratelné 50ml zkumavce bylo přidáno 5  $\mu$ l zásobní kultury *M. plutonius* (Každé použitému kmenu byla pro snazší zpracování výsledků přidělena číselná hodnota. Hodnota 1 byla přidělena primárně izolovanému kmenu z infekčního klinického materiálu. Hodnota 2 byla přidělena sekundárně reizolovanému kmenu, hodnota 3 terciárně reizolovanému kmenu atd. podle stejného principu.). Kultura byla kultivována v uzavřené zkumavce obalené parafilmem 5-6 dní při teplotě 37 °C. Po této kultivaci následovala centrifugace kultury 10 min při 8 000  $\times$  g. Většina supernatantu byla odlita a bakterie peletu ve zbytcích supernatantu byly přeneseny do čerstvě připravených kultivačních médií (složení dle experimentu) tak, aby hodnoty absorbance při 600 nm odpovídaly hodnotám 0,020-0,025. Vzniklá bakteriální suspenze pak byla přenesena do 6jamkové mikrotitrační destičky vždy po 5 ml do tří jamek. Do zbylých 3 jamek bylo pipetováno 5 ml čistého média bez bakterií o stejném složení, jako má médium ve zbylých jamkách destičky. Destička byla přelepena sterilní průhlednou folií a inkubována 18-20 h při 37 °C. Následně byly v každé jamce destičky měřeny hodnoty absorbance při 600 nm a z těchto hodnot byly získány růstové křivky.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Genotypizace terénních izolátů *P. larvae* dle primerů ERIC

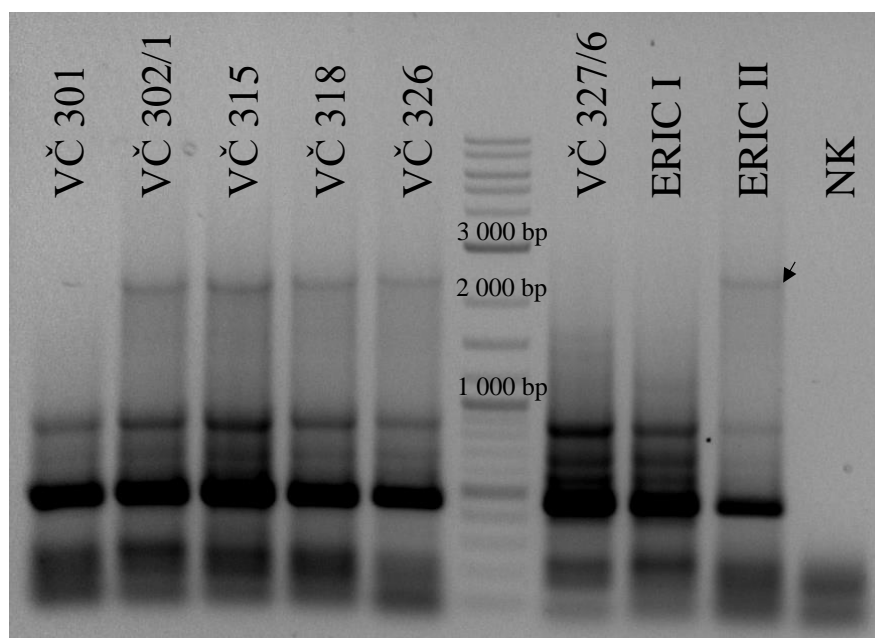
Ve spolupráci se Státním veterinárním ústavem Olomouc byla provedena genotypizace (4.2.1) terénních izolátů *P. larvae* získaných na území České republiky v letech 2016-2017 (4.1.1.1). Na krevním agaru, na kterém byly izoláty kultivovány ve Státním veterinárním ústavu Olomouc, byly při kultivaci patrné morfologické rozdíly mezi jednotlivými terénními izoláty *P. larvae*. Po určení ERIC genotypů u testovaných terénních izolátů, byl patrný vztah mezi určeným genotypem a morfologií kolonií na krevním agaru. ERIC I genotyp obvykle tvořil ploché bezbarvé kolonie s nepravidelnými okraji (Obr. 7A a 7B). V několika málo případech byly jako ERIC I určeny také izoláty, které tvořili drobné průhledné až bílé kulaté kolonie. Zástupci genotypu ERIC II pak tvořily bílé kulaté kolonie (Obr. 7C a 7D).



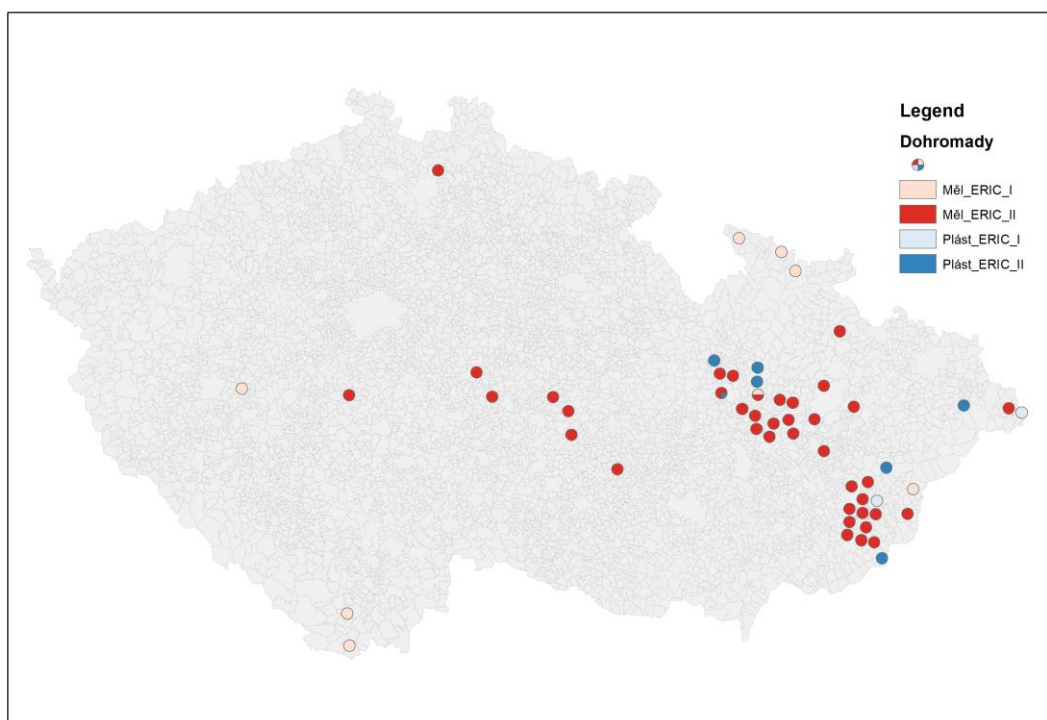
Obr. 7 Fotografie terénních izolátů *P. larvae* kultivovaných na krevním agaru, které zobrazují typické zástupce obou v ČR nalezených ERIC genotypů této bakterie. Na snímku označeném písmeny a a B jsou zástupci genotypu ERIC I při focení šikmo (A) a kolmo ke vzorku (B). Na snímku C a D jsou zástupci genotypu ERIC II při focení šikmo (C) a kolmo ke vzorku (D).

Naproti tomu, pokud se neprojevílo zbarvení některých kolonií zástupců ERIC II do oranžové nebo červené, při použití MYPGP agaru nebyly morfologické rozdíly zástupců různých ERIC genotypů *P. larvae* nijak výrazné. Při kultivacích terénních izolátů *P. larvae* na MYPGP agaru, které předcházely určení ERIC genotypu u těchto izolátů, byla přítomnost barevných kolonií pozorována velmi vzácně.

Príslušnost jednotlivých terénních izolátů *P. larvae* k ERIC genotypu, konkrétně ERIC I nebo ERIC II, byla určena podle elektroforetického vzoru (Genersch *et al.*, 2006) produktů PCR s ERIC primery (4.2.1.3). Tento vzor byl vždy porovnán se vzorem vzniklým u pozitivních kontrol (Obr. 8), u kterých byl ERIC genotyp znám díky předchozímu určení tohoto genotyp v jiných laboratořích (4.1.1.1). Pozornost byla věnována zejména amplifikovanému fragmentu DNA o velikosti přibližně 2 500 bp (Obr. 8), který je typický pro ERIC II genotyp. Takto byl určen ERIC genotyp u 102 terénních izolátů *P. larvae* z celkových 105 izolátů. U zbývajících 3 terénních izolátů *P. larvae* se ani při opakování celého experimentu (4.2.1) nepodařilo ERIC genotyp určit. Jako ERIC I genotyp bylo určeno 20 terénních izolátů *P. larvae* (19,6 % určených terénních izolátů) a jako genotyp ERIC II bylo určeno 82 terénních izolátů *P. larvae* (80,4 % určených terénních izolátů).



Obr. 8 Ukázka záznamu elektroforetického vzoru produktů PCR s ERIC primery u několika vybraných terénních izolátů *P. larvae* (označeny číslem protokolu, které bylo izolátu přiděleno v SVÚ). Jako ERIC I respektive ERIC II jsou označeny vzorky pozitivních kontrol, kdy u kontroly ERIC II je označen (šipka) také pro určení ERIC genotypu významný amplifikovaný fragment DNA o přibližné velikost 2 500 bp. Tento fragment DNA je typický pro ERIC II genotyp. NK je označena negativní kontrola.



Obr. 9 Mapa výskytu jednotlivých ERIC genotypů *P. larvae* na území ČR. Výsledky byly získány genotypizací dle ERIC primerů 102 terénních izolátů *P. larvae*, které byly izolovány z měli (červené značky) nebo stěrem z plástů (modré značky) z potvrzených ohnisek moru včelího plodu na území ČR v letech 2016-2017.

Terénní izoláty *P. larvae* byly získány dvěma způsoby. Celkem 18 terénních izolátů bylo získáno kultivací stěru z plástů - konkrétně 3 terénní izoláty byly určeny jako genotyp ERIC I a 15 izolátů jako genotyp ERIC II. To odpovídá procentuálnímu zastoupení ERIC genotypů u izolátů získaných stěrem z plástů 16,7 % pro genotyp ERIC I a 83,3 % pro genotyp ERIC II. Zbýlých 84 terénních izolátů bylo získáno izolací z úlové měli. Kdy 17 izolátů patřilo ke genotypu ERIC I a 67 izolátů ke genotypu ERIC II. To odpovídá procentuálnímu zastoupení ERIC genotypů u terénních izolátů *P. larvae* získaných izolací z úlové měli 20,2 % pro genotyp ERIC I a 79,8 % pro genotyp ERIC II.

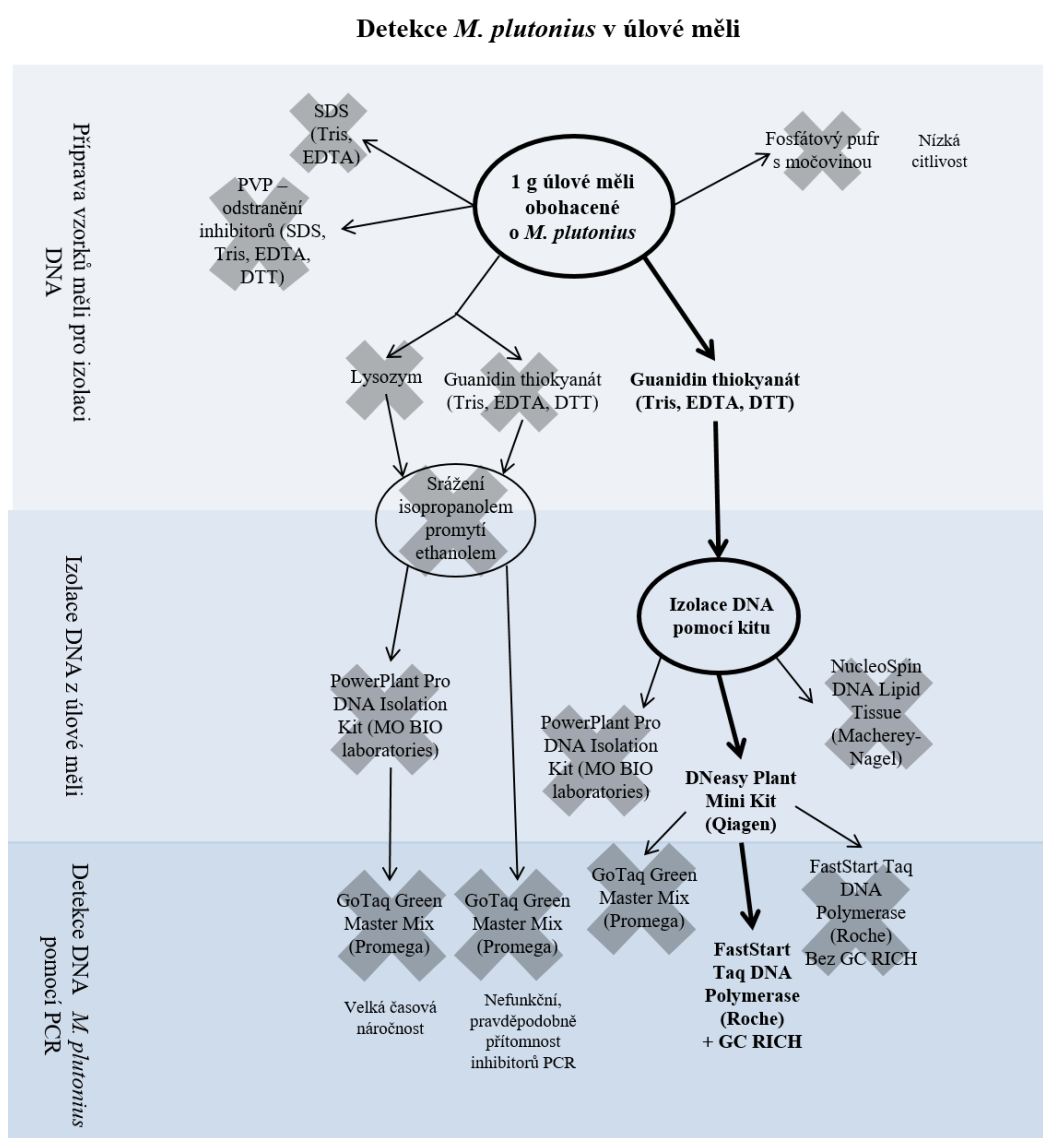
Dále byly využity také informace o místě odběru terénních izolátů *P. larvae* použitých pro ERIC genotypizaci. Výsledky genotypizace každého jednotlivého terénního izolátu *P. larvae* a bližší informace o místě odběru jsou obsaženy v přílohách (Tab. 10). Z těchto informací byly dr. Brussem z Katedry geoinformatiky PřF UP vytvořena mapa výskytu jednotlivých genotypů ERIC na území ČR s rozlišením způsobu odběru vzorku (Obr. 9). Pro snazší orientaci byla také vytvořena přehledová tabulka, která zobrazuje počty určených terénních izolátů *P. larvae* a jejich zařazení k ERIC genotypu v jednotlivých krajích respektive okresech kam byly zařazené podle místa původu izolátů (Tab. 7).

Tab. 7 Výsledky genotypizace dle ERIC primerů seřazené podle krajů respektive okresů původu jednotlivých terénních izolátů *P. larvae*. Sloupce udávají počty nalezených zástupců genotypu ERIC I/II v okresech specifikovaných v řádcích. Okresy jsou pak seřazeny podle kraje.

<b>Kraj</b>	<b>Okres</b>	<b>ERIC I</b>	<b>ERIC II</b>
<b>Jihočeský</b>	Český Krumlov	7	0
<b>Jihomoravský</b>	Hodonín	0	1
<b>Vysočina</b>	Havlíčkův Brod	0	4
	Žďár nad Sázavou	0	2
<b>Liberecký</b>	Liberec	0	2
<b>Moravskoslezský</b>	Bruntál	0	1
	Frydek-Místek	1	6
	Nový Jičín	0	1
	Ostrava	0	2
<b>Olomoucký</b>	Jeseník	3	1
	Olomouc	1	18
	Přerov	0	2
	Šumperk	1	5
<b>Pardubický</b>	Svitavy	0	4
<b>Plzeňský</b>	Rokycany	1	0
<b>Středočeský</b>	Benešov	0	1
	Kolín	1	0
	Kutná Hora	0	1
	Příbram	1	2
<b>Ústecký</b>	Litoměřice	1	0
	Most	1	1
<b>Zlínský</b>	Uherské Hradiště	0	5
	Vsetín	1	3
	Zlín	1	20

## 5.2 Vývoj metody pro určení přítomnosti bakterie *M. plutonius* v úlové měli

Díky lyzi vzorků úlových mělí s využitím GITC pufru následné izolace DNA pomocí komerčního kitu (DNeasy Plant Mini Kit – Qiagen) (4.2.2.2), amplifikaci vybraného úseku DNA *M. plutonius* pomocí PCR s přidavkem aditiva pro těžce amplifikovatelné templáty (4.2.2.3) a vizualizaci pomocí agarosové elektroforézy barvené barvivem GelRed se podařilo potvrdit přítomnost bakterie *M. plutonius* ve vzorcích s obsahem nejméně  $10^4$  bakterií v 1 g úlové měli. Tomuto výsledku předcházela řada optimalizačních kroků (Obr. 10).



Obr. 10 Schéma základních provedených kroků vývoje metody pro určení přítomnosti bakterie *M. plutonius* v úlové měli

## 5.2.1 Optimalizace přípravy vzorku pro izolaci a izolace DNA z úlové měli

Při všech testech přípravy vzorku pro izolaci a testech izolací DNA byl brán jako pozitivní výsledek (identifikace *M. plutonius* ve vzorku) amplifikovaný produkt PCR odpovídající velikostí předpokládanému produktu nebo pozitivní kontrole za použití standartního protokolu pro GoTaq Green Master Mix (Promega) a Primeru 1 a Primeru 2.

### 5.2.1.1 Optimalizace přípravy vzorku pro izolaci DNA a izolace DNA

V rámci vývoje metody detekce *M. plutonius* v úlové měli vhodné pro diagnostické účely bylo testováno využití několika lyzačních pufrů. Jako zcela nevhodné se ukázalo použití klasického Tris-HCl lyzačního pufru s SDS a EDTA i o PVP obohaceného klasického Tris-HCl lyzačního pufru s SDS a EDTA. Dále byl testován fosfátový lyzační pufr s močovinou převzatý z Rossmanith *et al.* (2007), který poskytoval výsledky, ale citlivost metody byla nižší a časová náročnost vyšší než u finální verze navržené metody (4.2.2). Jako nadějný se ukázal lyzační pufr s lysozymem, který ale poskytoval výsledky pouze při následném srážení DNA vzorku isopropanolem. Jako nejvhodnější se pak ukázalo použití GITC pufru (Evans *et al.*, 2013).

Prvotní experimenty potvrzovaly náš předpoklad o velkém množství kontaminantů v izolované DNA pocházejících z matrice. Proto byly testovány metody pro jejich odstranění. Přídavek polymeru PVP do lyzačního pufru se ukázal nevhodný. Jako vhodný krok k přečištění vzorku se ukázalo srážení DNA vzorku isopropanolem a promytí peletu ethanolom.

Byly testovány dvě metody izolace DNA ze vzorku. Izolace srážením DNA isopropanolem podle protokolu pro izolaci DNA z houby *Claviceps purpurea* (Biová, 2016), která samotná neposkytovala požadované výsledky. Postup byl následně upraven a srážení DNA bylo použito jako přečišťovací mezikrok. DNA pro PCR pak byla získána lyzí vzorku měli v GITC pufru nebo lyzačním pufru s lysozymem. Následovalo srážení DNA isopropanolem z lyzátu obohaceného o  $0,3\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  octan sodný, promytím peletu ethanolom a izolací finální DNA ze získaného peletu pomocí jednoho z kitů pro izolaci DNA z rostlinného materiálu (viz níže). Při provedení výše popsaného postupu izolace DNA z měli byla obdobná citlivost detekce *M. plutonius*, jako při finální navrhované metodě (4.2.2), ale časová náročnost provedení byla výrazně vyšší než v případě metody navrhované (4.2.2). Z důvodu velké časové náročnosti tak bylo od tohoto postupu izolace DNA z měli upuštěno.



Druhou testovanou metodou izolace DNA byla pouhá izolace DNA z části lyzátu měli pomocí komerčního kitu, která se díky své rychlosti, ukázala jako nejvhodnější. Důležitou součástí bylo také vybrání vhodného izolačního kitu. Byly testovány dva kity pro izolaci DNA z rostlinného materiálu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) a PowerPlant® Pro DNA Isolation Kit (MO BIO laboratories) a jeden kit pro izolaci DNA z materiálu bohatého na lipidy NucleoSpin DNA Lipid Tissue (Macherey-Nagel). Pro další použití byl nakonec vybrán kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Pro využití pouhé izolace DNA z lyzátu úlové měli pomocí kitu, však bylo nutné upravit nastavení PCR, která v původním nastavení popsaném prvním odstavci této kapitoly, neposkytovala vhodné výsledky.

### 5.2.1.2 Optimalizace PCR pro detekci *M. plutonius*

V rámci optimalizace nastavení PCR byly nadále používány primery Primer 1 a Primer 2. Došlo ale ke změně kitu pro PCR, kdy byl otestován kit FastStart Taq DNA Polymerase (Roche). Po přidání doplňku pro obtížně amplifikovatelné úseky DNA (GC-RICH solution, součást kitu) byly zaznamenány PCR produkty také u některých templátů, které při použití GoTaq Green Master Mix (Promega) nebyly amplifikovány. Použití kitu FastStart Taq DNA Polymerase tak umožnilo využít jako templát pro PCR vzorky DNA získané pouze lyzí v GITC pufru a izolací DNA z alikvotu lyzátu pomocí kitu (DNeasy Plant Mini Kit – Qiagen), bez dalších kroků na přečištění DNA.

Následně byla provedena optimalizace množství celkové DNA (koncentrace DNA měřena spektrofotometricky) vkládané do PCR, kdy za použití vzorků o původní koncentraci bakterií *M. plutonius* v 1 g měli  $10^4$ ,  $10^5$  a  $10^6$ , byla určena ideální koncentrace templátu jako 130-220 ng DNA do 25 $\mu$ l reakce.

### 5.2.2 Testy opakovatelnosti navržené metody

Podle protokolu popsaného v kapitole 4.2.2 bylo provedeno několik sérií pokusů o izolaci DNA z připravených vzorků o bakterie *M. plutonius* obohacené úlové měli. Výsledky každého testovaného vzorku jsou shrnuty v tabulce (Tab. 8). V případě nejnižší úspěšně testované koncentrace bakterií *M. plutonius* ve vzorcích měli -  $10^4$  bakterií v 1 g měli, byla úspěšnost opakování navržené metody 50 %. U vyšších koncentrací bakterií *M. plutonius* v úlové měli se podařilo potvrdit přítomnost DNA vybrané patogenní bakterie ve všech testovaných případech (Tab. 8).

Tab. 8 Výsledky opakování navržené metody pro identifikaci *M. plutonius* ve vzorcích úlové měli. Horní řádek odpovídá koncentraci bakterií *M. plutonius* v 1 g měli v daném sloupci. Znaménka +/- označují pozitivní/negativní výsledek vzorku při PCR identifikaci DNA *M. plutonius*. Nebyl-li vzorek v sérii testován je označen netest. Číselná hodnota pod znaménky +/- udává množství DNA po izolaci z měli, která byla vložena do PCR. Spodní řádek shrnuje počet úspěšných/testovaných vzorků celého experimentu při dané koncentraci bakterií *M. plutonius* ve vzorcích.

Datum	CFU <i>M. plutonius</i> ve vzorku měli			
	<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>7</sup></b>
17.1.	+ 128 ng	+ 130 ng	+ 220 ng	netest.
23.1.	+ 150 ng	netest.	+ 184 ng	netest.
29.1.	- 172 ng	+ 160 ng	+ 170 ng	+ 174 ng
7.2.	- 210 ng	+ 177 ng	+ 207 ng	+ 217 ng
8.2.	+ 186 ng	+ 150 ng	+ 156 ng	+ 200 ng
06.3.	- 220 ng	+ 172 ng	+ 195 ng	+ 188 ng
Opakovatelnost	<b>3/6</b>	<b>5/5</b>	<b>6/6</b>	<b>4/4</b>

### 5.3 Vývoj metody pro určení přítomnosti bakterie *M. plutonius* v medu

Pomocí postupu předpřípravy vzorku (4.2.3.1) a izolace DNA za využití komerčního kitu (DNeasy Plant Mini Kit – Qiagen) pro izolaci DNA (4.2.3.2) se podařilo získat, amplifikovat pomocí PCR (4.2.2.3) a vizualizovat pomocí agarosové elektroforézy barvené GelRed DNA *M. plutonius* ze vzorků medu, které obsahovaly  $1 \cdot 10^4$  a více bakterií v 1 g medu.

Vhodná příprava vzorku (4.2.3.1) před samotnou izolací DNA měla na vliv na citlivost navržené metody. Nejprve bylo testováno pouhé rozředění medu sterilní demineralizovanou vodou a zkoncentrování bakteriálních buněk pomocí centrifugace. Takto bylo dosaženo pozitivní identifikace *M. plutonius* v testovaném vzorku, který obsahoval nejméně  $10^6$  bakterií v 1 g medu. Následně bylo otestováno přidání kroku, kdy byly zkoncentrované bakterie promyty sterilní demineralizovanou vodou. Pomocí takto upraveného protokolu se podařilo identifikovat DNA *M. plutonius* také ve vzorku, který obsahoval o dva řády nižší koncentraci testovaných bakterií.

Pro otestování další možnosti izolace DNA byl použit pro izolaci DNA ze vzorku také jiný izolační kit NucleoSpin DNA Lipid Tissue (Macherey-Nagel), který je doporučen pro využití na izolaci DNA z na lipidy bohaté živočišné tkáně. Také při použití tohoto izolačního kitu na místo kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) se podařilo potvrdit přítomnost *M. plutonius* v testovaném vzorku, který obsahoval  $10^4$  bakterií *M. plutonius* v 1 g medu. Předpříprava vzorku – naředění, zkoncentrování a promytí, však byla ponechána beze změny jak je popsána v kapitole 4.2.3.1.

Po zkušenostech s izolací DNA z úlové měli, kdy bylo dosaženo lepších výsledků po úpravě PCR (5.2.2), bylo zvoleno nastavení PCR popsané v kapitole 4.2.2.3. Obvyklá koncentrace získané DNA ze vzorků medu byla přibližně  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ .

#### 5.3.1 Testy opakovatelnosti

Podle protokolu popsaného v kapitole 4.2.3 bylo provedeno několik sérií pokusů o izolaci DNA z připravených vzorků o bakterie *M. plutonius* obohaceného medu a následnou identifikaci DNA *M. plutonius* v těchto izolátech pomocí PCR. Výsledky každého testovaného vzorku jsou shrnuty v tabulce (Tab. 9). Kdy v případě nejnižší úspěšně testované koncentrace bakterií *M. plutonius* ve vzorcích medu, tj.  $10^4$  bakterií v 1 g vzorku, byla úspěšnost opakování navržené metody 80 % (při 5 opakováních). U vyšších

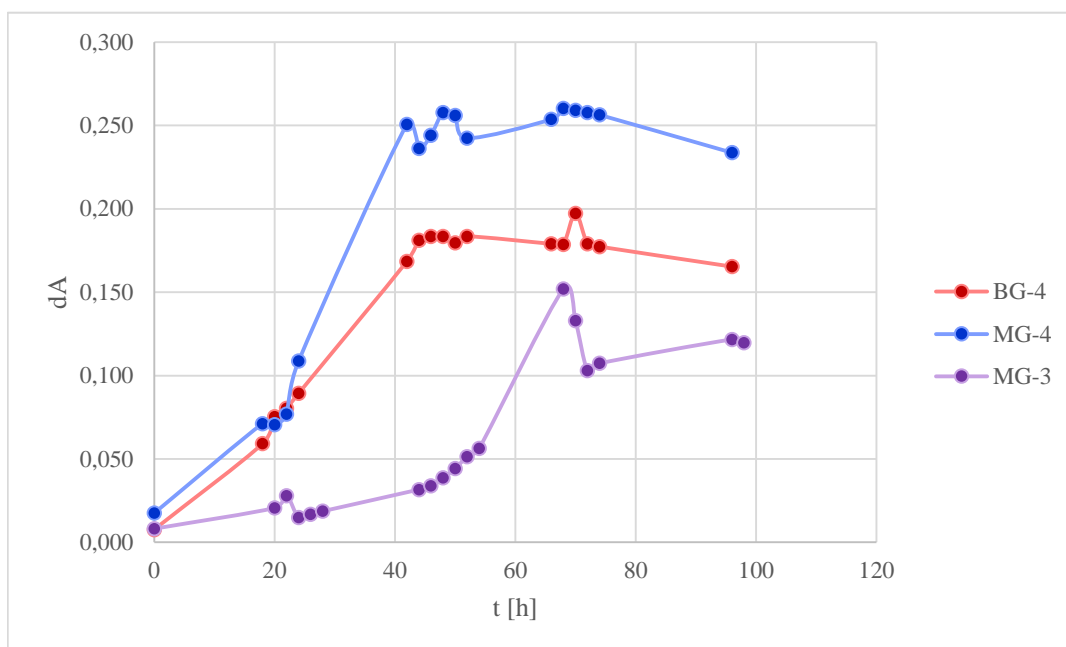
koncentrací bakterií *M. plutonius* ve vzorcích medu se podařilo potvrdit přítomnost DNA vybrané patogenní bakterie ve všech testovaných případech (Tab. 9).

Tab. 9 Výsledky opakování navržené metody pro identifikaci bakterie *M. plutonius* ve vzorcích medu. Horní řádek odpovídá koncentraci bakterií *M. plutonius* v 1 g medu v daném sloupci. Znaménka +/- označují pozitivní/negativní výsledek vzorku při PCR identifikaci DNA *M. plutonius*. Číselná hodnota pod znaménky +/- udává množství DNA, které bylo po izolaci z medu vloženo do PCR. Spodní řádek shrnuje počet úspěšných/testovaných vzorků celého experimentu při dané koncentraci bakterií *M. plutonius* ve vzorcích.

Datum	CFU <i>M. plutonius</i> ve vzorcích medu			
	<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>7</sup></b>
13.2.	+ 60 ng	+ 54 ng	+ 66 ng	+ 72 ng
14.2.	+ 60 ng	+ 60 ng	+ 60 ng	+ 72 ng
19.2.	- 72 ng	+ 60 ng	+ 42 ng	+ 60 ng
20.2.	+ 84 ng	+ 54 ng	+ 42 ng	+ 48 ng
26.2.	+ 72 ng	+ 66 ng	+ 72 ng	+ 60 ng
Opakovatelnost	<b>4/5</b>	<b>5/5</b>	<b>5/5</b>	<b>5/5</b>

## 5.4 Testy možností kultivace *M. plutonius*

Pro ověření funkčnosti metody bylo provedeno měření růstových křivek *M. plutonius* (4.2.5). Byly získány první růstové křivky (Obr. 11) pro měření v M110 médiu provedeném s terciáně (MG-3) i kvartérně (MG-4) reizolovanými kmeny *M. plutonius*. Dále bylo provedeno měření růstových křivek *M. plutonius* s kvartérně reizolovanými kmeny v Basal tekutém médiu (BG-4). Každý experiment byl proveden pouze v jednom opakování, měření absorbance probíhalo v triplicátech pro čisté médium i médium s kulturou *M. plutonius*. Konkrétní naměřené hodnoty jsou k dispozici v tabulce v přílohách (Tab. 11-13).



Obr. 11 Graf prvních růstových křivek bakterie *M. plutonius*. Hodnoty dA vynesené na ose Y byly získány odečtením průměru ( $n = 3$ ) absorbance (600 nm) čistého média od průměru ( $n = 3$ ) absorbance (600 nm) stejného média s bakteriální kulturou *M. plutonius* v daném čase kultivace. Hodnota za pomlčkou označuje počet laboratorních kultur *M. plutonius*, kdy hodnota 1 byla přidělena kmenu získanému izolací přímo z klinického infekčního materiálu. Zkratky BG/MG označují kultivaci v Basal tekutém médiu/M110 médiu.

## 6 DISKUZE

### 6.1 Genotypizace terénních izolátů *P. larvae* dle ERIC primerů

Bakterie *P. larvae* mají podle příslušnosti ke konkrétnímu ERIC genotypu různé vlastnosti. Mez jednotlivými ERIC genotypy byly nalezeny rozdíly ve virulenci (Genersch *et al.*, 2005), schopnosti metabolizovat různé substráty (Genersch *et al.*, 2006), morfologii (Genersch *et al.*, 2006) i v tepelné odolnosti spor této bakterie (Forsgren *et al.*, 2007). Právě z těchto důvodů jsou informace o výskytu a zastoupení jednotlivých ERIC genotypů ve světových chovech včel nejen velmi zajímavé, ale hlavně užitečné pro další výzkum onemocnění mor včelího plodu a jeho původce *P. larvae*.

Získání terénních izolátů *P. larvae* z oblastí s potvrzeným výskytem moru včelího plodu vyžadovalo spolupráci se Státními veterinárními ústavy po celé ČR. Při porovnání mapy výskytu moru včelího plodu na území ČR (Obr. 4) mapy ERIC genotypů z českých terénních izolátů *P. larvae* (Obr. 9), je možné pozorovat překryv většiny vyznačených oblastí na obou mapách.

Z výsledků genotypizace dle ERIC primerů u českých terénních izolátů *P. larvae* vyplývá, že zastoupení genotypu ERIC II (80 %) je v ČR neobvykle vysoké. Kdy například v sousedním Rakousku patřilo k ERIC II genotypu pouze 42 % izolátů *P. larvae* (Loncaric *et al.*, 2009). V Polsku pak bylo nalezeno jen 16 % izolátů ERIC II a 8 % izolátů smíšených (ERIC I + ERIC II) mezi terénními izoláty *P. larvae* získanými ze vzorků medu a 8 % izolátů ERIC II a 7 % izolátů smíšených (ERIC I + ERIC II) mezi terénními izoláty *P. larvae* získanými z včelího plodu (Skubida *et al.*, 2017). V USA pak dokonce nebyl nalezen jediný zástupce genotypu ERIC II, ale pouze zástupci genotypu ERIC I (Krongdang *et al.*, 2017). Důvody pro neobvykle vysoké zastoupení *P. larvae* ERIC II genotypu v České republice oproti ostatním testovaným státům si tak rozhodně zasluhují další studium této problematiky.

Dle zjištění (Skubida *et al.*, 2017) je patrné, že nejvyšší výskyt izolátů *P. larvae* ERIC II právě v okolí hranic s Českou republikou a zároveň v našem výzkumu právě v okrese Jeseník (hraničícím s Polskem v místech výskytu obou genotypů na polské straně hranice) byla zaznamenána oblast, ve které oproti většině ostatních testovaných oblastí (Tab. 7), převládal výskyt genotypu ERIC I u testovaných terénních izolátů *P. larvae*.

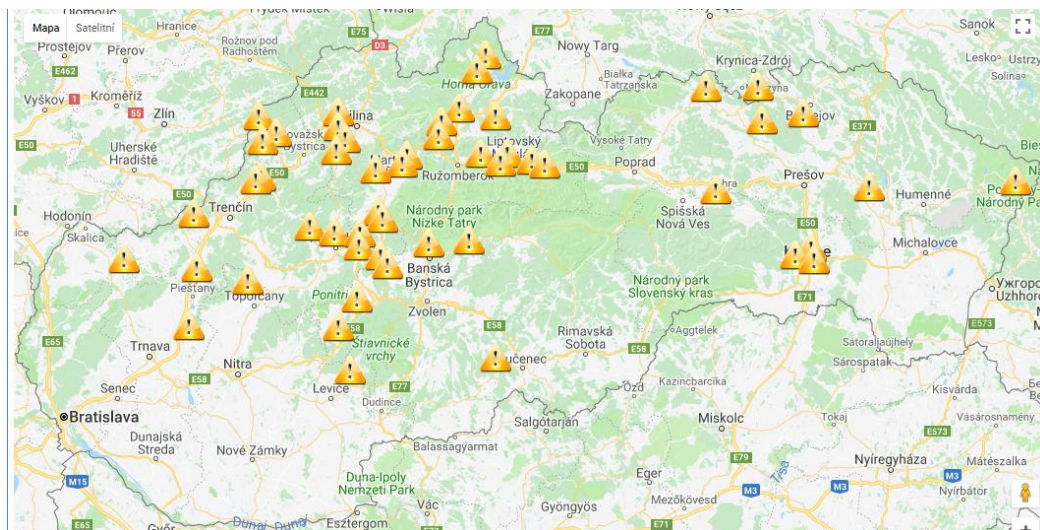
Dalšími s Polskem hraničícími oblastmi jsou okresy Moravskoslezského kraje – konkrétně Bruntál a Frýdek-Místek, kde převládá genotyp ERIC II (Tab. 7). Zároveň

v oblasti hraničící s tímto krajem má Polsko neobvykle velké zastoupení ERIC II genotypu (Skubida *et al.*, 2017).

Toto může být způsobeno již dříve zdokumentovanou schopností původce moru včelího plodu se šířit do včelstev v okolí. Při oslabení nakaženého včelstva dochází k přenosu spor z tohoto včelstva společně s uloupeným medem do dalších včelstev, která oslabené včelstvo vyloupila a tím pak k šíření onemocnění (Lindström *et al.*, 2008b). Další možností může být mezinárodní obchod s produkty a včelařským vybavením, který může vést k šíření moru včelího plodu přes státní hranice (Genersch *et al.*, 2008). V příhraničí s Polskem je přeshraniční nákup a prodej zboží i služeb velmi běžným jevem.

Zajímavé jsou také výsledky z okresu Český Krumlov (Tab. 7), ve kterém převládá *P. larvae* genotyp ERIC I. Jedná se opět o okres příhraniční. Tentokrát jde ovšem o hranici s Rakouskem. V rakouské studii (Loncaric *et al.*, 2009) byly izoláty rozděleny pouze podle spolkových zemí, kdy okres Česká Krumlov hraničí zejména s Horním, ale částečně také s Dolním Rakouskem. Zatímco v Dolním Rakousku stejně jako v okresu Český Krumlov převládá ERIC I genotyp *P. larvae*, v Horním Rakousku naopak u izolátů *P. larvae* převládá genotyp ERIC II (Loncaric *et al.*, 2009). Tato nesrovnalost může být způsobena řadou faktorů. Např. mohlo dojít k přenosu původce onemocnění do okresu Český Krumlov z jiné oblasti než z Horního Rakouska popřípadě naopak k přenosu onemocnění do Horního Rakouska z jiné oblasti než z okresu Český Krumlov. Další možností je velký časový rozestup mezi oběma studiemi, který mohl umožnit změnu epizootického výskytu jednotlivých genotypů *P. larvae* na rakouském území. V současné době totiž nebyla provedena žádná studie, která by zkoumala změnu výskytu jednotlivých ERIC genotypů *P. larvae* v čase.

Ve všech okresech hraničících se Slovenskou republikou (Hodonín, Uherské Hradiště, Zlín, Vsetín), které měly v této studii své zástupce, převládá genotyp *P. larvae* ERIC II (Tab. 7). Bohužel informace o zastoupení jednotlivých ERIC genotypů v případě slovenských ohnisek moru včelího plodu nejsou prozatím dostupné. Naše výsledky tak je možné porovnat pouze s mapou ohnisek moru včelího plodu na území Slovenské republiky ze září 2017 (Obr. 12). Kdy je patrné vysoké zamoření touto nemocí v oblastech v okolí České republiky, zejména Zlínského kraje. To odpovídá již zmiňované schopnosti moru včelího plodu se šířit (Lindström *et al.*, 2008b). Zlínský kraj patřil v roce 2016 k nejvíce morem včelího plodu postižené oblasti ČR (SVS, 2017a).



Obr. 12 Mapa slovenských ohnisek moru včelího plodu (žluté trojúhelníky) zobrazuje situaci v září 2017 (ŠVPS, 2017).



## 6.2 Určení přítomnosti *M. plutonius* v úlové měli

Úlová měl je odpadní materiál, který se hromadí na dně úlu. Obsahuje zejména zbytky vosku dále pak také zbytky mrtvých včel, pylu a další. Spolu s těmito částicemi odpadního materiálu padají na dno úlu také patogenní organismy, kterými jsou včely napadeny (Ryba *et al.*, 2009). Při detekci patogenní bakterie *P. larvae* z měli, bylo zjištěno větší množství spor *P. larvae* v zimní úlové měli než v testovaných včelách pocházejících ze stejného úlu (Forsgren a Laugen, 2014). Jako předpokládaný důvod tohoto jevu je uváděn delší časový úsek, po který jsou spory *P. larvae* v daném materiálu hromaděny (Forsgren a Laugen, 2014). Např. pro detekci patogenní bakterie *P. larvae* a diagnostiku moru včelího plodu se úlová měl už v dnešní době běžně využívá (Forsgren *et al.*, 2013; Bzdil, 2013). Zvláště zimní měl, která je v úlu postupně hromaděna po celou zimu, umožňuje neinvazivní zjištění informací o zdravotním stavu včelstva před nadcházející sezónou (Ryba *et al.*, 2009). Všechny tyto vlastnosti úlové měli, jsou důvodem pro snahy této práce o navržení potencionální metody pro diagnostiku onemocnění hniloby včelího plodu právě z tohoto materiálu.

K tomuto účelu bylo dále vybráno využití metody PCR. Tato metoda je na rozdíl od metod založených na kultivaci identifikovaného mikroorganismu výrazně méně náročná na čas nutný k průběhu celé analýzy (Forsgren a Laugen, 2014). Zvláště pak u organismu jako je *M. plutonius*, u kterého je standardně doporučována 7 denní kultivace (Forsgren *et al.*, 2013), ale byl zaznamenán případ, při kterých bylo potřeba kultivovat získaný izolát 22 dní (Allen a Ball 1993), může dojít k získání výsledků pomocí metody založené na PCR o několik dní dříve než pomocí metody založené na kultivaci patogenu. Při testování navržené metody v naší laboratoři totiž bylo možné, celou analýzu od převzetí vzorku po finální výsledek (výstup z agarosové elektroforézy) provést za přibližně 5 h. Rychlejší analýzy, která umožní rychlejší řešení problému, pak může být díky infekčnosti onemocnění výhodou. Bylo prokázáno, že počet včel pozitivních na přítomnost *M. plutonius*, klesá s rostoucí vzdáleností testovaného včelstva od oblastí, ve kterých byla nalezena klinicky nemocná včelstva (Belloy *et al.*, 2007). Navíc v ČR připadalo v roce 2016 na 1 km<sup>2</sup> 8,8 včelstva (Brodschneider *et al.*, 2017). Což je mnohem více než například v Rakousku s 4,2 včelstvy na km<sup>2</sup> (Brodschneider *et al.*, 2017). Také dříve vydaná studie mapující mimo jiné hustotu zavčelení v 27 zemích světa (26 evropských zemí a USA) poukázala na jednu z nejvyšších hustot zavčelení právě v ČR – konkrétně s 6,6 včelstvy na km<sup>2</sup> byla ČR v roce 2010 čtvrtou nejhustěji

zavčelenou zemí této studie (Chauzat *et al.*, 2013). Další výhodou rychlé diagnostické metody je větší šance na včasné objevení rizika propuknutí hniloby včelího plodu u konkrétního včelstva. V takovémto případě existují možná preventivní opatření, která mohou propuknutím tohoto onemocnění zabránit (Forsgren, 2009).

Chemické složení matrice vzorku (včelí měl) pravděpodobně vedlo k problémům s využitím izolované DNA při následné amplifikaci vybraných úseků pomocí standardního nastavení PCR. Při provedené izolaci DNA z měli se s největší pravděpodobností nepodařilo odstranit všechny inhibitory DNA-polymerasy. Je známo, že jedním z omezení PCR je citlivost této metody na přítomnost inhibitorů (Olexová *et al.*, 2004). Při dříve navržené metodě pro identifikaci taktéž bakteriálního původce onemocnění včel z úlové měli, konkrétně *P. larvae*, byl zaznamenán nižší limit detekce při použití metody založené na izolaci cílové DNA přímo z měli a její identifikaci pomocí PCR oproti metodě, která využívala nejprve kultivaci spor *P. larvae* získaných z měli (Forsgren a Laugen, 2014). Toto mohlo být způsobeno právě z důvodu přítomnosti inhibitorů PCR obsažených v izolovaném vzorku DNA (Forsgren a Laugen, 2014). Na problém způsobený použitým templátem může poukazovat také výrazné zlepšení výsledků po přidavku GC-RICH aditiva. To podle informací výrobce kitu (Roche, 2016) mění chování DNA během hybridizace a je výrobcem kitu doporučeno k využití pro PCR s obtížnými templáty (jako příklad udán templát bohatý na GC), které při standardním nastavení PCR neposkytují vyhovující výsledky a dále také lepší výsledky při izolaci DNA pomocí kitu, který je navržen pro izolaci DNA z rostlinného materiálu v kvalitě vhodné pro následnou PCR (Qiagen, 2015). Rostliny jsou známy produkcí řadou metabolitů, které mohou být zároveň inhibitory DNA-polymerasy (Schrader *et al.*, 2012).

Při testech opakovatelnosti bylo při nejnižší koncentraci bakterií *M. plutonius* ve vzorku –  $10^4$  bakterií v 1 g materiálu, prokázána opakovatelnost 50 %. To může být způsobeno řadou faktorů od chyb při přípravě a skladování vzorků, ztrát DNA při izolaci (Tan a Yiap, 2009), snížení účinností PCR kvůli inhibitorům DNA-polymerasy (Schrader *et al.*, 2012), citlivosti použitého barvení agarosové elektroforézy (Lee *et al.*, 2012). Avšak při vyšších koncentracích *M. plutonius* ve vzorku již metoda vykazovala 100% opakovatelnost (Tab. 8).

### 6.3 Určení přítomnosti *M. plutonius* v medu

U bakterie *P. larvae*, která je stejně jako *M. plutonius* původcem onemocnění včelího plodu (Forsgren, 2009), byla prokázána funkce bakteriemi kontaminovaného medu jako přirozené zásobárny tohoto patogena (Lindström *et al.*, 2008a). Takovýto med pak představuje riziko pro propuknutí onemocnění moru včelího plodu, které je tímto mikroorganismem způsobené (Lindström *et al.*, 2008a). U obou popisovaných původců onemocnění může nemoc propuknout pouze ve včelí larvě (Forsgren, 2009). K nakažení larvy pak v případě obou onemocnění dochází stejným způsobem - pozřením potravy, která obsahuje původce konkrétního onemocnění (Bailey a Ball, 1991).

Ze všech těchto důvodů je med zajímavým materiálem pro testování přítomnosti původce hniloby včelího plodu. Navíc v doporučené metodice pro diagnostiku tohoto onemocnění však metody umožňující rychlé zpracování medu chybí (Anonym, 2016b) Proto byly provedeny pokusy o vytvoření rychlé a pokud možno co nejcitlivější metody pro detekci bakteriálního patogena *M. plutonius* ze vzorků medu.

Vytvořená metoda vykazuje citlivost až  $10^4$  bakterií *M. plutonius* v 1 g medu. Výhodou metody, stejně jako v předchozí kapitole diskutované metody pro detekci stejného patogena z úlové měli (6.2), je rychlost provedení, která opět nevyžaduje několikadenní kultivaci. Díky tomu lze v případě potřeby, získat výsledky analýzy za jediný pracovní den.

## 6.4 Testy možností kultivace *M. plutonius*

Byly provedeny první experimenty, které potvrdili použitelnost navržené metody pro testování růstu *M. plutonius* v různých podmínkách.

Z pilotních experimentů však vyplývá zajímavé zjištění, které je třeba dále ověřit. Pilotní experimenty naznačily možnost změny růstových vlastností *M. plutonius* při laboratorní kultivaci (Obr. 10). Přestože experiment je pro ověření pravdivosti výsledku nutné zopakovat, odpovídá tento výsledek předchozím empirickým pozorováním. Naše experimenty poukazují na možnou změnu rychlosti růstu bakterie *M. plutonius* na laboratorním médiu v závislosti na počtu předchozích laboratorních kultivací (Obr. 10). Už několik dřívějších experimentů potvrdilo, že opakovaná laboratorní kultivace *M. plutonius* může vést k výrazným změnám vlastností této patogenní bakterie (McKeen *et al.*, 2004; Arai *et al.*, 2012; Nakamura *et al.*, 2016). Konkrétně byla zaznamenána ztráta virulence (McKeen *et al.*, 2004; Arai *et al.*, 2012; Nakamura *et al.*, 2016).

## 7 ZÁVĚR

U 102 terénních izolátů *P. larvae* pocházejících z území České republiky z let 2016-2017 byla provedena genotypizace dle ERIC primerů. V České republice se vyskytuje v převážné míře ERIC II (82,4 %) genotyp. Dále je zastoupen ERIC I (19,6 %) genotyp. Genotypy ERIC III a ERIC IV nebyly mezi použitými izoláty nalezeny.

Dále byly navrženy dvě nové metody diagnostiky hniloby včelího plodu bez nutnosti předchozí kultivace původce tohoto onemocnění, bakterie *M. plutonius*. Díky tomu je možné získat výsledky za pouhý 1 den oproti dřívějším 7 dnům nutný pro kultivaci *M. plutonius*. Obě metody jsou založeny na izolaci DNA z poskytnutého vzorku a amplifikaci vybraného úseku DNA *M. plutonius* pomocí PCR. Metody pak umožňují využít pro diagnostiku onemocnění hniloby včelího plodu jak odpadní materiál z úlu – úlovou měl, tak významný včelí produkt - med. Bakterie se podařilo spolehlivě detekovat v měli, pokud jejich koncentrace ve vzorku byla  $10^5$  v jednom gramu a vyšší. Při koncentraci  $10^4$  bakterií v jednom gramu měli byl v 50 % případů zaznamenán falešně negativní výsledek. V medu se podařilo spolehlivě detekovat bakterie při koncentraci  $10^5$  v jednom gramu a vyšší. Při koncentraci  $10^4$  bakterií v jednom gramu medu byl zaznamenán falešně negativní výsledky v 20 % případů.

Byly provedeny experimenty pro optimalizaci růstových podmínek *M. plutonius* za anaerobních podmínek v tekutém médiu. Metoda byla testována na dvou kultivačních médiích, z nichž M110 médium poskytovalo lepší výsledky. Díky možnosti spektrofotometrického měření růstu bakterie, metoda umožní testování vlivu přídavku různých substrátů a aditiv do média na růst bakterie *M. plutonius*.

## 8 LITERATURA

- Alippi A. M. (1991): a comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research* **30**, 75-80.
- Alippi A. M. (1995): Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologia* **11**, 343-350.
- Allen M.F., Ball B.V. (1993): The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research* **32**, 80-88.
- Anonym (2016a): American Foulbrood of Honey Bees (Infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Paříž, Francie, 1-17. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.02.02\\_AMERICAN\\_FOULBROOD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf) (5. 9. 2017).
- Anonym (2016b): European Foulbrood of Honey Bees (Infection of honey bees with *Melissococcus plutonius*). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Paříž, Francie, 1-8. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.02.03\\_EUROPEAN\\_FOULBROOD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.03_EUROPEAN_FOULBROOD.pdf) (5. 9. 2017).
- Antúnez K., Piccini C., Castro-Sowinski S., Rosado A. S., Seldin L., Zunino P. (2007): Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Veterinary Microbiology* **124**, 178-183.
- Arai R., Miyoshi-Akiyama T., Okumura K., Morinaga Y., Wu M., Sugimura Y., Yoshiyama M., Okura M., Kirikae T., Takamatsu D. (2013): Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *Journal of Veterinary Medical Science* **76**, 491-498.
- Arai R., Tominaga K., Wu M., Wu M., Okura M., Ito K., Okamura N., Onishi H., Osaki M., Sugimura Y., Yoshiyama M., Takamatsu D. (2012): Diversity of *Melissococcus plutonius* from Honeybee Larvae in Japan and Experimental Reproduction of European Foulbrood with Cultured Atypical Isolates. *PLOS ONE* **7**(3):<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033708>.
- Arnheim N., Erlich H. (1992): Polymerase chain reaction strategy. *Annual Review of Biochemistry* **61**, 131-156.
- Bailey L. (1956): Aetiology of European Foul Brood: a Disease of the Larval Honey-bee. *Nature* **178**, 39-48.
- Bailey L. (1957): The Isolation and Cultural Characteristics of *Streptococcus pluton* and further Observations on *Bacterium eurydice*. *Journal of General Microbiology* **17**, 39-48.
- Bailey L. (1963a): The Habitat of *Bacterium eurydice*. *Journal of General Microbiology* **81**, 147-150.
- Bailey L. (1963b): The Pathogenicity for Honey-Bee larvae of Microorganisms Associated with European Foulbrood. *Journal of insect pathology* **5**, 198-205.
- Bailey L. (1983): *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp). *Journal of Applied Bacteriology* **55**, 65-69.
- Bailey L., Ball B. V. (1991): *Honey bee pathology*. 2nd ed., Academic Press, USA, 193 stran.
- Bailey L., Collins M. D. (1982a): Reclassification of '*Streptococcus pluton*' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *Journal of Applied Bacteriology* **53**, 215-217.
- Bailey L., Collins M. D. (1982b): Taxonomic studies on '*Streptococcus pluton*'. *Journal of Applied Microbiology* **53**, 1130.
- Barry I., Eisenstein M. D. (1999): The Polymerase Chain Reaction — a New Method of Using Molecular Genetics for Medical Diagnosis. *The New England Journal of Medicine* **322**, 178-183.
- Bassi S., Formato G., Milito M., Saloqni C., Carra E. (2015): Phenotypic characterization and ERIC-PCR based genotyping of *Paenibacillus larvae* isolates recovered from American foulbrood outbreaks in honey bees from Italy. *The Veterinary quarterly* **35**, 27-32.

- Belloy L., Imdorf A., Fries I., Forsgren E., Berthoud H., Kuhn R., Charrière J. D. (2007): Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie* **38**, 136-140.
- Biová J. (2016): *Studium transkripčních faktorů v houbě Claviceps purpurea*, Bakalářská práce, Univerzita Palackého Olomouc, Česká republika.
- Boom R., Sol C. J., Salimans M. M., Jansen C. L., Wertheim-van D. P. M., van der Noordaa J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 495-503.
- Brodtschneider R., Janků M., Brus J., Crailsheim K., Danihlík J. (2017): Winter losses and renewal during beekeeping season; outcomes from four year study in the Czech Republic and Austria. [poster] In: 13th COLOSS conference, Athens, Greece. Dostupné z: <http://bienenstand.at/wp-content/uploads/2015/01/Brodtschneider-et-al-COLOSS-2017-Athens.pdf>.
- Brødsgaard C. J., Ritter W., Haansen H. (1998): Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. *Apidologie* **29**, 569-578.
- Budge G. E., Shirley M. D. F., Jones B., Quill E., Tomkies V, Feil E. J., Brown M. A., Haynes E. G. (2014): Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* **8**, 1588-1597.
- Bzdil J. (2010): *Nové metody v diagnostice moru včelího plodu*. Disertační práce, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika.
- Chauzat M. P., Cauquil L., Roy L., Franco S., Hendrikx P., Ribière-Chabert M. (2013): Demographics of the European Apicultural Industry. *PLOS ONE* , **8**(11): e79018. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0079018>.
- Clark T. B., Whitcomb R. F., Tully J. G., Mouches C., Saillard C., Bove J. M., Wroblewski H., Carle P., Rose D. L., Henegar R. B., Williamson D. L. (1985): *Spiroplasma melliferum*, a new species from the honeybee (*Apis-Mellifera*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **35**, 396-308.
- Dancer B. N., Chantawannakul P. (1997): The Proteases of American Foulbrood Scales. *Journal of invertebrate pathology* **70**, 79–87.
- de Graaf D. C., Alippi A. M., Antunez K., Aronstein K. A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D. W., Evans J. D., Foster L. J., Funfhaus A., Garcia-Gonzalez, E., Gregorc A., Human H., Murray K. D., Nguyen B. K., Poppinga L., Spivak M., Van Engelsdorp D., Wilkins S., Genersch E. (2013). Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, **52**(1): DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.11.
- De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman WB (eds)(2009): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Volume 3, Springer-Verlag, New York, USA p. 269-296.
- Dieffenbach C. W., Lowe T. M. J., Dveksler G. S. (1993): General Concepts for PCR Primer Design. *PCR Methods and Applications* **3**, 30–37.
- Djordjevitc S. P., Noone K., Smith L., Hornitzky M. A. Z. (1998): Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research* **37**, 165-174.
- Djukic M., Brzuszkiewicz E., Fünfhaus A., Voss J., Gollnow K., Poppinga L., Liesegang H., Garcia-Gonzalez E., Genersch E., Daniel R. (2014): How to Kill the Honey Bee Larva: Genomic Potential and Virulence Mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLOS ONE* **9**(3): e90914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090914>.
- Dobbelaere W., de Graaf D. C., Peeters J. E., Jacobs F. J. (2001): Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subs *P. larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* **32**, 363-370.
- Evans J. D., Schwarz R. S., Chen Y. P., Budge G., Cornman R. S., De La Rua P., De Miranda J. R., Foret S., Foster L., Gauthier L., Genersch E., Gisder S., Jarosch A., Kucharski R., Lopez D., Lun C. M., Moritz R. F. A., Maleszka R., Munoz I., Pinto M. A. (2013) Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* **52**, 10.3896/ibra.1.52.4.11.

- Forsgren E. (2009): European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 5-9.
- Forsgren E., Budge G. E., Charriere J. D., Hornitzky M. A. Z. (2013): Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* **52**, 5-9.
- Forsgren E., Laugen A. T. (2013): Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie* **45**, 10-20.
- Forsgren E., Lundhagen A. C., Imdorf A., Fries I. (2005): Distribution of *Melissococcus plutonius* in Honeybee Colonies with and without Symptoms of European Foulbrood. *Microbial Ecology* **50**, 369-374.
- Forsgren E., Stevanovic J., Fries I. (2007): Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. *Veterinary Microbiology* **129**, 342-349.
- Forsgren E., Olofsson T. C., Vásquez A., Fries I. (2010): Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* **41**, 99-108.
- Fries I., Lindström A., Korpela S. (2006) Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Microbiology* **114**, 269-274.
- Fünfhaus A., Poppinga L., Genersch E. (2013): Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Environmental Microbiology* **15**, 2951-2965.
- Garcia-Gonzalez E., Genersch E. (2013): Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus larvae*, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. *Environmental Microbiology* **15**, 2894-2901.
- Garcia-Gonzalez E., Poppinga L., Fünfhaus A., Hertlein G., Hedtke K., Jakubowska A., Genersch E. (2014): *Paenibacillus larvae* Chitin-Degrading Protein PICBP49 Is a Key Virulence Factor in American Foulbrood of Honey Bees. *PLOS ONE* **10**(7): e1004284. doi:10.1371/journal.ppat.1004284.
- Gariyban L., Avashia N. (2013): Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology* **133**, 1-4.
- Genersch E. (2008): *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood – long since known and still surprising. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **3**, 429-434.
- Genersch E., Ashiralieva A., Fries I. (2005): Strain- and Genotype-Specific Differences in Virulence of *Paenibacillus larvae* subs *P. larvae*, a Bacterial Pathogen Causing American Foulbrood Disease in Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 7551-7555.
- Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. (2006): Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subs *P. larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(1):<http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.12>.
- Genersch E., Otten Ch. (2003): The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subs *P. larvae*. *Apidologie* **34**, 195-206.
- Goldenberger D., Perschil I., Ritzler M., Altwegg M. (1995) a simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR methods and applications* **4**, 368-370.
- Govan V. A., Allsopp M. H., Davison S. (1999): a PCR Detection Method for Rapid Identification of *Paenibacillus larvae*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2243-2245.
- Govan V. A., Brözel V., Allsopp M. H., Davison S. (1998): a PCR Detection Method for Rapid Identification of *Melissococcus plutonius* in Honeybee Larvae. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1983-1985.
- Grupta R. K., Reybroeck W. (2014): Honeybee pathogens and their management. In: *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security Vol. 1: Technological Aspects of Beekeeping* (Grupta R. K., Reybroeck W., van Ween J. W., Gupta A. eds.), Springer, Dordrecht, Nizozemsko, 297–320.
- Haynes E. G., Helgason T., Young J. P. V., Thwaites R., Budge G. E. (2013): a typing scheme for the honeybee pathogen *Melissococcus plutonius* allows detection of disease transmission



- events and a study of the distribution of variants. *Environmental Microbiology Reports* **5**, 525-529.
- Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., De Vos P., Logan N. A., Ali N., Berkeley R. C. (1996): Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subs *P. larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 270-279.
- Hornitzky M. (1998): The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subs *P. larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *Journal of Apicultural Research* **37**, 267-271.
- Hornitzky M. A. Z., Karlovskis S. (1989): Culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. *Journal of apicultural research* **28**, 118–120.
- Hosek J., Svastova P., Moravkova M., Pavlik I., Bartos M. (2006): Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinarni medicina* **51** 180-192.
- Hulton C. S., Higgins C. F., Sharp P. M. (1991): ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* **4**, 825-834.
- Katznelson H. (1950): *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *Journal of Bacteriology* **59**, 153-155.
- Khanuja S. P. S., Shasany A. K., Darokar M. P., Kumar S. (1999): Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* **17** 1-7.
- Kilwinski J., Peters M., Ashiralieva A., Genersch E. (2004): Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM 3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae* subs *P. larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study. *Veterinary Microbiology* **104**, 31–42.
- Krongdang S., Evans J. D., Pettis J. S., Chantawannakul P. (2017): Multilocus sequence typing, biochemical and antibiotic resistance characterizations reveal diversity of North American strains of the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLOS ONE* **12**(5): e0176831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176831>.
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Ki, Y. H. (2012): Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* (**62**):3923. doi:10.3791/3923.
- Lee S. V., Bahaman A. R. (2012): *Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis, Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (Dr. Sameh Magdeldin Ed.), Available from: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-andbasics/discriminatory-power-of-agarose-gel-electrophoresis-in-dna-fragment-analysis>.
- Lindström A., Korpela S., Fries I. (2008a) The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of invertebrate pathology* **99**, 82-86.
- Lindström A., Korpela S., Fries I. (2008b) Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie* **39**, 515-522.
- Lodesani M., Costa C., Man M. C. (2005): Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. *Bee World* **86**, 102-109.
- Loncaric I., Derakhshifar I., Oberlerchner J. T., Köglberger H., Moosbeckhofer R. (2009): Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria. *Journal of invertebrate pathology* **100**, 44-46.
- McKee B. A., Djordjevitc S. P., Goodman R. D., Hornitzky M. A. Z. (2003): The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie* **34**, 19-27.
- McKee B. A., Goodman R. D., Hornitzky M. A. Z. (2004): The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* **43**, 93-100.

- Mouches C., Bové J. M., Tully J. G., Rose D. L., McCoy R. E., Carle-Junca P., Garnier M., Saillard C. (1983): *Spiroplasma apis*, a new species from the honey-bee *Apis mellifera*. *Annals of Microbiology* **134**, 383-397.
- Mullis K. B. (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, **262**, 56-61.
- Mullis K. B. (1997): The polymerase chain reaction. In: *Nobel Lectures in Chemistry 1991-1995*. (Malström B. G. eds.), World Scientific, New Jersey, U.S.A. 103-115.
- Nakamura K., Yamazaki Y., Shiraishi A., Kobayashi S., Harada M., Yoshiyama M., Osaki M., Okura M., Takamatsu D. (2016): Virulence Differences among *Melissococcus plutonius* Strains with Different Genetic Backgrounds in *Apis mellifera* Larvae under an Improved Experimental Condition. *Scientific Reports* **14**(6):33329. doi: 10.1038/srep33329.
- Neuendorf S., Hedtke K., Tangen G., Genersch E. (2004): Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology* **150** 2381-2390.
- Okumura K., Arai R., Okura M., Kirikae T., Takamatsu D., Osaki M., Miyoshi-Akiyama T. (2011): Complete Genome Sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. *Journal of Bacteriology* **193**, 4029-4030.
- Olexova' L., Dovicovicova' L., Kuchta T. (2004): Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. *European Food Research Technology* **218**, 390-393.
- Papadopoulou-Karabela K., Iliadis N., Liakos V., Bourdzy-Hatzopoulou E. (1992): Experimental infection of honeybees by *Pseudomonas aeruginosa*. *Apidologie* **23**, 393-397.
- Peng Y., Peng K. (1979): a study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as the diagnostic methods for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology* **33**, 284-289.
- Pinnock D. E., Featherstone N. E. (1984): Detection and Quantification of *Melissococcus Pluton* Infection in Honeybee Colonies by Means of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Apicultural Research* **23**, 168-170.
- Poppinga L., Janesch B., Fünfhaus A., Sekot G., Garcia-Gonzalez E., Hertlein G., Hedtke K. (2012): Identification and Functional Analysis of the S-Layer Protein SplA of *Paenibacillus larvae*, the Causative Agent of American Foulbrood of Honey Bees. *PLOS ONE* **8**(5): e1002716. doi :10.1371/journal.ppat.1002716.
- Qiagen (2015): DNeasy® Plant Handbook. [online]. Verze červen 2015 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <file:///C:/Users/Host/Downloads/HB-1166-003-1095837-HB-DNeasy-Plant-0615-WW.pdf>.
- Sigma-AldrichRoche (2016): FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack. [online]. Verze duben 2016 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/fpcrnrobul.pdf>.
- Roetschi A., Berthoud H., Kuhn R., Imdorf A. (2008): Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie* **39**, 362-371.
- Rossmann P., Süß B., WagnerIngeborg M., Hein I. (2007): Development of matrix lysis for concentration of gram positive bacteria from food and blood. *Journal of Microbiological Methods* **69**, 504-511.
- Roux (1995): Optimization and Troubleshooting in PCR. *PCR Methods and Applications* **4**, 185-194.
- Ryba S., Titera D., Haklova M., Stopka P. (2009): a PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. *Veterinary Microbiology* **139**, 193-196.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saleh M., Soliman H., Sørsum H., Fauske A. K., El-Matbouli M. (2012): A novel gold nanoparticles-based assay for rapid detection of *Melissococcus plutonius*, the causative agent

- of European foulbrood. *Veterinary Record* Published Online First: 01 September 2012. doi: 10.1136/vr.101040.
- Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L. and Johne R. (2012): PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* **113**, 1014-1026.
- Schuch D. M. T., Madden R. H., Sattler A. (2001): An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subs *larvae* spores in honey. *Journal of apicultural research* **40**, 59–64.
- Skubida M., Bober A., Pohorecka K. (2017): ERIC-PCR genotyping of *Paenibacillus larvae* strains isolated from polish apiaries. [poster] In: 13th COLOSS conference, Athens, Greece.
- SOP č.3/02 HYG (2013): Průkaz bakterií *Paenibacillus larvae*., Standardní operační postup, 2. vydání, Státní veterinární ústav Olomouc, Olomouc, Česká republika, 8 stran.
- Spivak M., Reuter G. S. (2001): Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* **32**, 555-565.
- ŠVPS (2017): Mapa pásem moru včelího plodu [online]. [cit. 2018-03-07]. Dostupné z: [http://www.svsr.sk/zvierata/Mor\\_2017-september.asp](http://www.svsr.sk/zvierata/Mor_2017-september.asp).
- SVS (2009): Chráníme zdravá včelstva. Státní veterinární správa, Praha, Česká republika, 1 strana.
- SVS (2014): Zpráva o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat v roce 2013. Informační bulletin č. 2/2014, Státní veterinární správa, Praha, Česká republika, 87 stran.
- SVS (2015): V Česku byl po 20 letech opět prokázán případ hniloby včelího plodu. Státní veterinární správa [online]. 21.03.2017 [cit. 2018-10-06]. Dostupné z: [https://www.svscr.cz/v\\_cesku\\_byl\\_po\\_20\\_letech\\_opet\\_prokazan\\_pripad/](https://www.svscr.cz/v_cesku_byl_po_20_letech_opet_prokazan_pripad/).
- SVS (2016): Zpráva o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat v roce 2015. Informační bulletin č. 2/2016, Státní veterinární správa, Praha, Česká republika, 99 stran.
- SVS (2017a): Zpráva o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat v roce 2016. Informační bulletin č. 2/2017, Státní veterinární správa, Praha, Česká republika, 97 stran.
- SVS (2017b): Mapa pásem moru včelího plodu [online]. [cit. 2017-10-06]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/mapove-vystupy-ohnisek-nebezpecnych-nakaz-a-ochrannych-pasem/>.
- Takamatsu D., Sato M., Yoshiyama M. (2016): Infection of *Melissococcus plutonius* clonal complex 12 strain in European honeybee larvae is essentially confined to the digestive tract. *The Journal of Veterinary Medical Science* **38**, 29-34.
- Tan Ch. S., Yiap B. Ch. (2009): DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; 2009:574398. doi:10.1155/2009/574398.
- Thompson H. M., Brown M. A. (2001): Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood? *Bee World* **82**, 130-138.
- Tomkies V., Flint J., Johnson G., Waite R., Wilkins S., Danks Ch., Watkins M., Cuthbertson A. G. S., Carpana E., Marris G., Budge G., Brown M. A. (2009): Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. *Apidologie* **40**, 63-72.
- Truper H. G., de Clari L. (1998): Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition'. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 615.
- van Pelt-Verkuil E., and van Belkum A., and Hays J. P. (2008): *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer, Dordrecht, Nizozemsko, 330 stran.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J. R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **19**, 6823-6831.
- Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F. J., Lupski J. R. (1994): Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **5**, 25-40.
- Waite R., Brown M., Thompson H., Bew M. (2003): Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK. *Apidologie* **34**, 569-575.
- Waite R., Jacson S., Thompson H., (2002): Preliminary investigations into possible resistance to oxytetracycline in *Melissococcus plutonius*, a pathogen of honeybee larvae. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 20-24.

- Westermeier, R. (2016): *Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. 5th ed., John Wiley & Sons, New Jersey, USA 458 stran.
- White G. F. (1906): *The bacteria of the apiary with special reference to bee disease*. Government Printing Office, Washington, USA, 62 stran.
- Yue D., Nordhoff M., Lothar H. W., Genersch E. (2008): Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* **10**, 1612-1620.
- Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (Veterinární zákon) In: *Sbírka zákonů* 13.7.1999.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFB	Mor včelího plodu
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Clonal complex
CTAB	Cetrimoniumbromid
dNTPs	Směs deoxynukleotid trifosfátů
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EFB	Hniloba včelího plodu
ELISA	Fotometricky stanovená enzymoimunoanalýza - Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GC	Guanin a cytosin
GITC	Guanidin isothiokyanát
MALDI	Ionizace laserem za přítomnosti matrice
MLST	Multilokusová sekvenční typizace
PCR	Polymerasová řetězová reakce
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SDS	Dodecylsírán sodný
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

## 10 PŘÍLOHY

Tab. 10. Seznam všech terénních izolátů *P. larvae* testovaných na genotyp dle ERIC primerů a výsledky tohoto testování.

Datum záchytu	Číslo protokolu	Obec	Okres	ERIC genotyp
14.10.2016	J14098	Mohelnice	SU	II
14.10.2016	J14125/16	Želatovice	PR	II
05.12.2016	J14753/16	Velké Kunětice	JE	I
13.12.2016	J14790/72	Zlaté Hory	JE	I
18.01.2017	Vč41	Nové Sady	OL	II
18.01.2017	017-BA-104-28	Osečná	LI	II
25.01.2017	017-BA-134-30	Krásný Les u Frýdlantu	LI	II
05.02.2017	VM615/37	Nevšová	ZL	II
13.02.2017	VM1132/36	Veselí (ZO ČSV Loštice)	SU	II
13.02.2017	VM937/2	Vešky-Strážnice	HO	II
14.02.2017	017-BA-512-3	Borotice	PB	I
14.02.2017	BA2392	Havlíčková Borová	HB	II
14.02.2017	BA2388	Havlíčková Borová	HB	II
14.02.2017	017-BA-512-5	Hubenov u Borotic	PB	II
14.02.2017	BA1170/7	Chotěboř	HB	II
14.02.2017	BA1672/6	Košetice	PE	-
14.02.2017	BA29452	Křižanov	ZR	II
14.02.2017	BA1413/8	Ledeč nad Sázavou	HB	II
14.02.2017	BA102/2	Nížkov	ZR	II
14.02.2017	BA2351	Větrní	CK	I
14.02.2017	BA2352	Větrní	CK	I
14.02.2017	BA2349/10	Větrní	CK	I
14.02.2017	BA2365	Vranová Lhota	SY	II
14.02.2017	BA2356	Vranová Lhota	SY	II
14.02.2017	BA2357	Vranová Lhota	SY	II
14.02.2017	BA1340/4	Vyšší Brod	CK	I
14.02.2017	BA1341/5	Vyšší Brod	CK	I
14.02.2017	BA1339/3	Vyšší Brod	CK	I
14.02.2017	BA1343/6	Vyšší Brod	CK	I
14.02.2017	017-BA-512-1	Županovice	PB	II
15.02.2017	VM2434/16	Březůvky	ZL	II
15.02.2017	VM1233/22	Drahanovice	OL	II
15.02.2017	VM1233/77	Grygov	OL	II
15.02.2017	VM1233/24	Hněvotín	OL	II
15.02.2017	VM1233/71	Lašřany	OL	II
15.02.2017	VM1233/79	Náměšť na Hané	OL	II
15.02.2017	VM1233/48	Olomouc	OL	II
15.02.2017	VM1233/98	Pohořany	OL	-
15.02.2017	VM2434/12	Provodov	ZL	II
15.02.2017	VM1170/3	Rudice	UH	II
15.02.2017	VM1233/47	Slatinice	OL	II

15.02.2017	VM1233/23	Štěpánov	OL	II
15.02.2017	VM1233/78	Vilémov	OL	II
16.02.2017	017-BA-578-23	Zbraslavice	KH	II
21.02.2017	VM3017/1	Bohuňovice	OL	II
21.02.2017	VM3361/24	Daskabát	OL	II
21.02.2017	VM3408/17	Horní Životice	BR	II
21.02.2017	VM2655/37	Litovel	OL	II
21.02.2017	VM2466/52	Luhačovice	ZL	II
21.02.2017	VM2860/5	Olomouc	OL	II
27.02.2017	VM3179/135	Návsi	FM	II
03.03.2017	017-BA-1073-38	Most	MO	I
08.03.2017	VM5279/205	Březnice	ZL	II
08.03.2017	VM5279/235	Hvozdná	ZL	II
08.03.2017	VM5279/96	Kudlov	ZL	II
08.03.2017	VM6198	Míkovice nad Olšavou	UH	II
08.03.2017	VM5677/5	Újezd u Val. Klobouk	VS	II
08.03.2017	017-BA-933-16	Vyžlovka	KO	I
08.03.2017	VM5279/43	Zlín - Příluk	ZL	II
08.03.2017	VM5279/8	Želechovice - Paseky	ZL	II
10.03.2017	017-BA-1186-11	Rokycany	RO	I
13.03.2017	VM7319/45	Fryšták	ZL	II
13.03.2017	VM6245/12	Luhačovice	ZL	II
13.03.2017	VM6648/13	Město Libavá	OL	II
13.03.2017	VM7118/86	Mírov	SU	II
13.03.2017	VM6425/11	Ostrava Plesná	OV	II
13.03.2017	VM7118/42	Podolí - Mohelnice	SU	II
13.03.2017	VM6481/77	Poteč	ZL	II
13.03.2017	VM6245/16	Pozlovice	ZL	II
14.03.2017	Vč145	Červenka	OL	II
14.03.2017	VM7044/1	Kašava	ZL	II
14.03.2017	VM7044/25	Lukov	ZL	II
17.03.2017	VM7319/45	Dolní Ves	ZL	II
20.03.2017	017-BA-1388-1	Hořany	MO	II
21.03.2017	VM8086/123	Bojkovice	UH	II
21.03.2017	VM8352/50	Brumov - Bylnice	ZL	-
21.03.2017	VM7488/46	Dolní lhota	OV	II
21.03.2017	VM8211/9	Kelníky	ZL	II
21.03.2017	VM7787/10	Trnava u Zlína	ZL	II
27.03.2017	Vč154	Vnorovy	UH	II
29.03.2017	Vč160	Vizovice	ZL	I
03.04.2017	Vč170/3	Starý Hrozenkov	UH	II
04.04.2017	017-BA-1851	Divišov u Benešova	BN	II
06.04.2017	017-BA-1750	Štětí	LT	I
24.04.2017	VM8558	Partutovice	PR	II
26.04.2017	Vč242	Štípa	ZL	II
28.04.2017	Vč243/1	Hynčína	SU	II
28.04.2017	Vč249/2	Vranová Lhota	SY	II

02.05.2017	Vč255	Burešov	ZL	II
02.05.2017	Vč253	Semetín	VS	II
11.05.2017	Vč302/1	Ondřejovice	JE	II
11.05.2017	Vč301	Písečná	FM	I
11.05.2017	Vč300	Raškovice	FM	II
11.05.2017	Vč299	Ratiboř	VS	II
11.05.2017	Vč315	Droždín	OL	II
17.05.2017	Vč319	Kozlovice	NJ	II
18.05.2017	Vč327/6	Nová Hradečná	SU	I
18.05.2017	Vč326	Troubelice	OL	II
15.02.2017	VM2065	Javorník	JE	I
15.02.2017	VM2225/25	Lubno	FM	II
15.02.2017	VM2225/26	Lubno	FM	II
15.02.2017	VM2225/27	Lubno	FM	II
15.02.2017	VM2225/56	Lubno	FM	II
15.02.2017	VM2335	Zděchov	VS	I
15.02.2017	VM2665	Litovel	OL	I

---



Tab. 11. Výsledky měření absorbance při vlnové délce 600 nm při testu kultivace terciárně reizolovaného kmene *M. plutonius* v M110 médiu. Jako B1-B3 jsou označeny měření v čistém médiu a V1-V3 měření média s bakteriální kulturou v čase od začátku kultivace (hodnoty sloupce t). Ve sloupcích Prům. a Odch. je vždy průměr hodnot z předcházejících 3 sloupců a odpovídající směrodatná odchylka tohoto průměru. dA je hodnota rozdílu průměru kultivovaných bakterií v médiu a průměru čistého média.

t [h]	B1	B2	B3	Prům. B	Odch. B	V1	V2	V3	Prům. V	Odch. V	dA
0	0,111	0,115	0,116	0,114	0,003	0,123	0,121	0,121	0,122	0,001	0,008
20	0,123	0,125	0,125	0,124	0,001	0,144	0,145	0,145	0,145	0,001	0,021
22	0,131	0,138	0,140	0,136	0,005	0,186	0,152	0,152	0,163	0,020	0,028
24	0,115	0,120	0,122	0,119	0,004	0,134	0,133	0,133	0,133	0,001	0,015
26	0,117	0,122	0,122	0,120	0,003	0,136	0,137	0,136	0,136	0,001	0,017
28	0,126	0,132	0,134	0,130	0,004	0,149	0,148	0,149	0,149	0,001	0,019
44	0,118	0,121	0,122	0,120	0,002	0,153	0,153	0,149	0,152	0,002	0,032
46	0,117	0,121	0,122	0,120	0,003	0,154	0,155	0,151	0,153	0,002	0,034
48	0,117	0,121	0,123	0,120	0,003	0,161	0,160	0,155	0,159	0,003	0,039
50	0,114	0,119	0,120	0,117	0,003	0,164	0,162	0,158	0,161	0,003	0,044
52	0,115	0,126	0,123	0,119	0,006	0,169	0,176	0,166	0,170	0,005	0,051
54	0,116	0,130	0,120	0,118	0,007	0,174	0,182	0,167	0,174	0,008	0,056
68	0,114	0,319	0,122	0,118	0,116	0,214	0,369	0,227	0,270	0,086	0,152
70	0,127	0,208	0,145	0,136	0,043	0,249	0,286	0,272	0,269	0,019	0,133
72	0,114	0,142	0,120	0,125	0,015	0,220	0,248	0,217	0,228	0,017	0,103
74	0,116	0,172	0,132	0,140	0,029	0,237	0,257	0,248	0,247	0,010	0,107
96	0,119	0,128	0,123	0,123	0,005	0,248	0,250	0,237	0,245	0,007	0,122
98	0,114	0,122	0,119	0,118	0,004	0,239	0,242	0,233	0,238	0,005	0,120

Tab. 12. Výsledky měření absorbance při vlnové délce 600 nm při testu kultivace kvartérně reizolovaného kmene *M. plutonius* v Basal tekutém médiu. Jako B1-B3 jsou označeny měření v čistém médiu a V1-V3 měření média s bakteriální kulturou v čase od začátku kultivace (hodnoty sloupce t). Ve sloupcích Prům. a Odch. je vždy průměr hodnot z předcházejících 3 sloupců a odpovídající směrodatná odchylka tohoto průměru. dA je hodnota rozdílu průměru kultivovaných bakterií v médiu a průměru čistého média.

t [h]	B1	B2	B3	Prům. B	Odch. B	V1	V2	V3	Prům. V	Odch. V	dA
0	0,154	0,155	0,152	0,153	0,002	0,158	0,164	0,160	0,161	0,003	0,008
18	0,132	0,140	0,143	0,138	0,006	0,196	0,207	0,187	0,197	0,010	0,059
20	0,139	0,159	0,147	0,143	0,010	0,212	0,241	0,202	0,218	0,020	0,075
22	0,153	0,159	0,165	0,159	0,006	0,241	0,254	0,223	0,239	0,016	0,080
24	0,161	0,170	0,165	0,163	0,005	0,256	0,271	0,230	0,252	0,021	0,089
42	0,139	0,147	0,142	0,141	0,004	0,325	0,368	0,234	0,309	0,068	0,169
44	0,142	0,159	0,151	0,147	0,009	0,343	0,387	0,253	0,328	0,068	0,181
46	0,147	0,165	0,157	0,152	0,009	0,348	0,397	0,261	0,335	0,069	0,183
48	0,142	0,159	0,155	0,149	0,009	0,347	0,396	0,253	0,332	0,073	0,184
50	0,154	0,172	0,164	0,159	0,009	0,356	0,398	0,262	0,339	0,070	0,180
52	0,147	0,168	0,166	0,157	0,012	0,354	0,398	0,268	0,340	0,066	0,184
66	0,143	0,154	0,153	0,148	0,006	0,343	0,391	0,247	0,327	0,073	0,179
68	0,137	0,149	0,145	0,141	0,006	0,341	0,382	0,236	0,320	0,075	0,179
70	0,139	0,153	0,150	0,145	0,007	0,349	0,405	0,271	0,342	0,067	0,197
72	0,145	0,164	0,154	0,154	0,010	0,347	0,393	0,260	0,333	0,068	0,179
74	0,156	0,172	0,158	0,162	0,009	0,358	0,398	0,262	0,339	0,070	0,177
96	0,143	0,161	0,158	0,154	0,010	0,337	0,379	0,242	0,319	0,070	0,165

Tab. 13. Výsledky měření absorbance při vlnové délce 600 nm při testu kultivace kvartérně reizolovaného kmene *M. plutonius* v M110 médiu. Jako B1-B3 jsou označeny měření v čistém médiu a V1-V3 měření média s bakteriální kulturou v čase od začátku kultivace (hodnoty sloupce t). Ve sloupcích Prům. a Odch. je vždy průměr hodnot z předcházejících 3 sloupců a odpovídající směrodatná odchylka tohoto průměru. dA je hodnota rozdílu průměru kultivovaných bakterií v médiu a průměru čistého média.

t [h]	B1	B2	B3	Prům. B	Odch. B	V1	V2	V3	Prům. V	Odch. V	dA
0	0,128	0,131	0,119	0,124	0,006	0,139	0,143	0,141	0,141	0,002	0,018
18	0,138	0,144	0,139	0,139	0,003	0,220	0,221	0,188	0,210	0,019	0,071
20	0,169	0,171	0,166	0,168	0,003	0,252	0,257	0,205	0,238	0,029	0,071
22	0,166	0,165	0,169	0,168	0,002	0,258	0,264	0,211	0,244	0,029	0,077
24	0,167	0,173	0,171	0,169	0,003	0,287	0,299	0,247	0,278	0,027	0,109
42	0,125	0,130	0,129	0,127	0,003	0,413	0,446	0,274	0,378	0,091	0,251
44	0,161	0,168	0,166	0,164	0,004	0,450	0,452	0,297	0,400	0,089	0,236
46	0,158	0,176	0,167	0,163	0,009	0,445	0,448	0,327	0,407	0,069	0,244
48	0,160	0,178	0,174	0,167	0,009	0,450	0,489	0,335	0,425	0,080	0,258
50	0,149	0,161	0,161	0,155	0,007	0,431	0,476	0,326	0,411	0,077	0,256
52	0,160	0,181	0,176	0,168	0,011	0,411	0,487	0,333	0,410	0,077	0,242
66	0,124	0,135	0,130	0,127	0,006	0,412	0,440	0,290	0,381	0,080	0,254
68	0,147	0,167	0,130	0,139	0,019	0,428	0,469	0,299	0,399	0,089	0,260
70	0,163	0,183	0,161	0,162	0,012	0,436	0,483	0,344	0,421	0,071	0,259
72	0,163	0,184	0,163	0,170	0,012	0,450	0,494	0,339	0,428	0,080	0,258
74	0,132	0,144	0,133	0,136	0,007	0,419	0,452	0,307	0,393	0,076	0,256
96	0,174	0,182	0,197	0,184	0,012	0,455	0,478	0,321	0,418	0,085	0,234