



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Využití kombinace laboratorních metod pro
včasnou diagnostiku hniloby včelího plodu
(původce *Melissococcus plutonius*)**

Tomáš Erban a kol.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., a Výzkumný ústav včelařský, s. r. o.

2017

Využití kombinace laboratorních metod pro včasnou diagnostiku hniloby včelího plodu (původce *Melissococcus plutonius*)

Tomáš Erban a kolektiv

Autorský tým:

RNDr. Tomáš Erban, Ph.D. ^π, 

Doc. Mgr. Jan Hubert, Ph.D. ^π

Ing. Bronislava Hortová, Ph.D. ^π

Ing. Marta Nesvorná ^π

MVDr. Martin Kamler ^β

Ing. Jan Tyl ^β

Ing. Dalibor Titěra, CSc. ^{β, ε}

^π Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, Praha 6-Ruzyně, 161 06

^β Výzkumný ústav včelařský, s. r. o., Máslovice-Dol 94, p. Libčice nad Vltavou, 252 66

^ε Katedra zoologie a rybářství, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha 6-Suchdol, 165 00

 RNDr. Tomáš Erban, Ph.D., arachnid@centrum.cz; erban@vurv.cz

Oponenti:

Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D., Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova

MVDr. Pavel Texl, Státní veterinární správa ČR

Ing. Petr Krejčík, Ministerstvo zemědělství ČR

Vydaly:

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2017 (ISBN 978-80-7427-212-7)

Výzkumný ústav včelařský, s. r. o., Dol, 2017 (ISBN 978-80-87196-23-6)

Financování:

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu MZe ČR č. QJ1310085 s názvem „Nové metody pro komplexní diagnostiku zdravotního stavu včelstev *Apis mellifera* pro prevenci chorob a zvýšení jejich fitness” řešeného v období 2013–2017 v rámci programu zemědělského aplikovaného výzkumu a experimentálního vývoje: Komplexní udržitelné systémy „KUS“ v zemědělství 2012–2018.



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

Určení pro využití v praxi:

Metodika je určena pro státní správu s využitím pro laboratoře zabývající se zdravím včel, může tak mít dopad na všechny včelaře.

Certifikace:

Certifikované metodice bylo uděleno osvědčení MZe ČR č. j. 21222/2017-MZE-16232.

O uplatnění metodiky byla dne 31. 5. 2016 uzavřena smlouva č. QJ1310085/2 podle ustanovení § 269 zákona č. 513/1991 Sb., obchodního zákoníku.

Oponentní posudky vypracovali Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D., MVDr. Pavel Texl a Ing. Petr Krejčík.

Prohlášení:

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Poděkování:

Autoři v první řadě děkují pracovníkům Státní veterinární správy ČR (SVS) za umožnění odběru biologických vzorků. Autorský kolektiv dále děkuje Ing. Janu Kopeckému, Ph.D., za odborné rady a připomínky k bioinformatickému zpracování dat a Martinu Markovičovi za technickou pomoc s editací rukopisu. Dále děkujeme Marii Bostlové a Janu Hubertovi ml. za pomoc se zpracováním vzorků pro molekulární analýzu a MVDr. Janě Kovářové, Ph.D., za pomoc s revizí části textu. Velký dík patří oponentům metodiky za podnětné a cenné připomínky.



Anotace:

Prokázání hniloby včelího plodu (původce *Melissococcus plutonius*) je ve srovnání s morem včelího plodu (původce *Paenibacillus larvae*) běžnými kultivačními metodami značně obtížnější. V současné době nejsou kultivační postupy této anaerobní grampozitivní bakterie dostatečně selektivní. Tento problém řeší předložená metodika, která zahrnuje kromě kultivačních postupů také metody molekulární biologie: polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a vysokokapacitní technologie sekvenování nové generace. Molekulárně genetické metody umožňují spolehlivou detekci patogena v různých vývojových stádiích včel, a to jak v plodu, tak v dospělých včelách. Takovou analýzou dospělých včel je možno predikovat přenos infekce mezi včelstvy, který hrozí zejména ze zalétávání jednotlivých včel do jiných než domovských úlů. Výhodou použití vysokokapacitní sekvenační technologie je také možnost určení vlivu infekce *M. plutonius* na symbiotické bakterie včely medonosné jako faktoru imunity včelstva. Text zahrnuje podrobně popsání postupy laboratorního zpracování vzorků a bioinformatická zpracování a interpretaci dat. Metodika je využitelná pro potřeby laboratoří zabývajících se diagnostikou onemocnění včel, je vhodná i pro potřeby výzkumné či didaktické.



Title:

Utilization of laboratory methods combination for early diagnostics of European foulbrood (causative agent *Melissococcus plutonius*)

Annotation:

Compared to the American foulbrood (AFB; causative agent *Paenibacillus larvae*), the determination of European foulbrood (EFB; causative agent *Melissococcus plutonius*) is substantially difficult. The selectivity of current cultivation methods of this anaerobic Gram-positive bacterium is low. Apart from cultivation methods, the present methodology consists of polymerase chain reaction (PCR) techniques and the high-throughput technology of next-generation sequencing. The molecular genetics methods enable reliable detection of the pathogen in different developmental stages of honeybees, including brood and adult bees, too. The analysis of adult bees also predicts the possibility of infection transmission to other colonies and apiaries; the drifting behavior of bees poses a substantial risk of disease transmission. High-throughput technology advantage is the opportunity to determine the *M. plutonius* infection impact on symbionts that represent the substantial part of honeybee colony immunity. The methodology includes laboratory sample processing of bees described in detail, bioinformatics processing and data interpretations. This methodology is useful in laboratories for honeybee diseases analyzes, and moreover it is suitable for research and didactic purposes, too.

Obsah

1. Cíl metodiky	1
2. Úvod	2
2.1. Vznik, projevy a šíření infekce hniloby včelího plodu	3
2.2. Rozpoznání a možnosti diagnostiky hniloby včelího plodu	3
2.3. Význam analýzy dospělých včel a důležitost mikrobiomu.....	4
3. Vlastní popis metodiky	7
3.1. Diagnostika v terénu a odběr vzorků.....	7
3.2. Mikrobiologické metody	9
3.2.1. Kultivační stanovení <i>M. plutonius</i> z medu a měli	9
3.2.2. Mikroskopické stanovení <i>M. plutonius</i> z narostlých kolonií.....	10
3.2.3. Ověření narostlých kolonií <i>M. plutonius</i> pomocí PCR.....	11
3.3. Přímá detekce <i>M. plutonius</i> ve vzorcích včel molekulárními metodami	13
3.3.1. Odběr vzorků včel	13
3.3.2. Extrakce DNA ze vzorků včel	13
3.3.3. Detekce <i>M. plutonius</i> ve vzorcích včel pomocí metody PCR	15
3.3.4. Detekce <i>M. plutonius</i> ve včelách pomocí metody sekvenování nové generace	18
3.3.5. Bioinformatická a statistická analýza získaných sekvencí metodou nové generace sekvenování	19
4. Srovnání novosti postupů	24
5. Popis uplatnění metodiky	24
6. Ekonomické zhodnocení metodiky	24
7. Publikace, které předcházely metodice	26
8. Seznam zkratk.....	27
9. Citovaná literatura	28



1. Cíl metodiky

Hniloba včelího plodu (HVP; anglicky European foulbrood), jejímž původcem je patogenní bakterie *Melisoccocus plutonius*, patří mezi nejnebezpečnější nákazy včely medonosné. Tento patogen, který ohrožuje včelstva na celém světě, je v současné době obtížně detekovatelný kultivačními metodami. Dle Manuálu diagnostických testů a vakcín pro terestriální zvířata, který spravuje Světová organizace pro zdraví zvířat (OIE), je detekce hniloby včelího plodu v polních podmínkách nespolehlivá a vyhovující diagnostické testy nejsou dostupné. Dle manuálu OIE je identifikace možná mikroskopickými, kultivačními, imunologickými a PCR technikami. Cílem této metodiky je předložit uživatelům metody pro spolehlivou detekci *M. plutonius* v měli, medu, včelím plodu, ale také v dospělých včelách. Kromě tradičního kultivačního přístupu jsou v metodice uvedeny také metody molekulárně biologické, jako PCR a moderní sekvenování nové generace. Dalším z cílů je předložit uživatelům rovněž postup determinace a vyhodnocení spektra ostatní bakteriální komunity asociované s vyšetřovaným vzorkem, což umožňuje určení případné doprovodné infekce a také vlivu na symbionty tvořící významnou složku imunity včel.



2. Úvod

HVP je nebezpečná bakteriální nákaza včely medonosné (*Apis mellifera* L.), postihující zejména otevřený plod. Tato nemoc včel je uvedena na seznamu nebezpečných nákaz Světové organizace pro zdraví zvířat (OIE; anglicky The World Organisation for Animal Health) (OIE 2016). Avšak na rozdíl od moru včelího plodu (MVP; anglicky American foulbrood) toto onemocnění nepodléhá povinnosti hlášení ve všech zemích včetně těch v Evropské unii (Forsgren et al. 2013), ale v Česku tato povinnost existuje dle přílohy č. 2 veterinárního zákona č. 166/1999 (ČR 1999). Legislativa Evropské unie neupravuje oznamovací povinnost pro HVP, ale zahrnuje národní programy pro konkrétní choroby včetně HVP (Defra 2013). Přestože se HVP vyskytuje v podstatě celosvětově a může přispívat signifikantně ke kolapsu včelstev, v mnoha oblastech je výskyt HVP endemický s příležitostnou sezónní epidemiologií, která se liší v jednotlivých zemích (Forsgren et al. 2013). V posledních letech se HPV v několika zemích v Evropě objevilo ve větším měřítku. Konkrétně ve Švýcarsku došlo k významnému zvýšení výskytu HVP od roku 1990 (Roetschi et al. 2008; Grangier 2011), HVP se stala nejrozšířenější chorobou plodu včel ve Velké Británii (Wilkins et al. 2007; Budge et al. 2011) a v Norsku byl evidován regionální výskyt v roce 2010 po 30 letech (Dahle et al. 2011). HVP získala na důležitosti recentně i v Česku a to díky prokázanému výskytu v roce 2015 v Krkonošském národním parku (KVSH 2015; Kamler et al. 2016). Nákaza HVP byla v této oblasti prokázána i v roce 2016, kdy došlo k rozšíření i na další katastrální území (KVSH 2015, 2016). Metody pro včasnou a spolehlivou detekci HVP jsou tedy velmi aktuální a potřebné.

Již v 18. (Schirach 1771) a 19. (Cheshire & Cheyne 1885) století byly popsány symptomy onemocnění včelího plodu, které byly charakterizovány typickým zápachem, ale až v roce 1912 bylo zjištěno, že se jedná o dvě různá onemocnění (White 1912): MVP (Genersch et al. 2006) a HVP (Bailey 1956, 1957, 1983) včelího plodu. Původce HVP je nesporeující anaerobní bakterie *Melissococcus plutonius*. Je třeba poznamenat, že tato bakterie je známá v literatuře také pod jinými dříve používanými názvy např. *Streptococcus pluton* a *Melisococcus pluton* (Bailey 1957). Uvádí se, že společně s *M. plutonius* se mohou druhotně vyskytovat ve zvýšené abundanci také další bakterie např. *Achromobacter euridice*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis* či *Paenibacillus alvei* (Forsgren 2010).



2.1. Vznik, projevy a šíření infekce hniloby včelího plodu

Za první krok infekce HVP je považovaná asymptomatická kolonizace střeva larev po infekci nakaženou potravou včelami kojičkami. Bakterie, které mohou způsobit infekci (již při velmi malém inokulu < 100 CFU) se poměrně rychle pomnožují ve střevě larev (Bailey 1960). Ačkoliv mohou být larvy infikovány v jakémkoliv stádiu, citlivější k nákaze jsou mladé larvy. Pokud najdeme v literatuře nejednotnost v čase úhynu larev dělnic, tak takovéto rozdíly můžeme vysvětlit různou virulencí patogena *M. plutonius* (Arai et al. 2012; Budge et al. 2014). Larvy obvykle umírají 1 až 2 dny před zavičkováním, někdy však i později (OIE Terrestrial Manual 2016). Forsgren (2010) uvádí, že larvy obvykle uhynou ve stáří 4 až 5 dní, což odpovídá 2 až 3 dnům před zavičkováním. Některé larvy mohou uhynout až po zavičkování (Forsgren 2010). Je popsáno, že některé infikované larvy mohou dokonce přežít až do dospělce a tito jedinci pak svými výkaly mohou přispívat k šíření infekce (Bailey 1960). Uhynulé larvy mění svou barvu z perleťově bílé na žlutou až tmavohnědou a pokud nejsou odstraněny včelami čistíčkami, vytváří se na dně buňky tzv. příškvary. V takovém příškvary zůstává *M. plutonius* životaschopný nejméně po dobu tří let (Bailey 1961; Forsgren 2010). Dalším zdrojem nákazy jsou výkaly, které zůstávají v buňkách po uhynulých larvách, při jejich čištění ulpívají na ústním ústrojí včel jednotlivé bakterie a sociálním kontaktem jsou roznášeny po celém včelstvu (Bailey 1959). Mezi včelstvy dochází k šíření nákazy nejčastěji loupežemi, kdy silné včelstvo vyloupí zásoby slabšího včelstva oslabeného v důsledku probíhající nákazy HVP. Dále dochází k nakažám při výměně plástů mezi úly, převozem včelstev nebo při osazování úlů roji neznámého původu (Kamler et al. 2016). Proto jsou včasné rozpoznání příznaků nákazy a následná opatření zabráňující jejímu šíření velmi důležité.

2.2. Rozpoznání a možnosti diagnostiky hniloby včelího plodu

Prvním viditelným příznakem HVP bývá slábnutí včelstva spojené se zvýšenou mezerovitostí plodu, které je patrné především v jarních měsících. Nejlepší vzorek pro diagnostiku představují čerstvě uhynulé larvy (OIE Terrestrial Manual 2016). Základní diagnostickou metodou při podezření na výskyt HVP je mikroskopické vyšetření uhynulých larev za použití karbolfuchsinu nebo 5% vodného roztoku nigrozinu (Forsgren et al. 2013) a lze použít i standardního Gramova barvení. *Melissococcus plutonius* vytváří oválné nebo kopinaté koky, které se vyskytují jednotlivě, případně se spojují do řetízků různé délky. Na kultivačním



médiu vytváří bakterie kruhové zrnité kolonie o velikosti 1 až 1,5 mm, které jsou bělavé lesklé barvy (Bailey 1956, 1957; OIE Terrestrial Manual 2016). Pro potvrzení původce nákazy je nezbytné také kultivační stanovení patogena, které probíhá na selektivní kultivační půdě (složení viz OIE Terrestrial Manual) za teploty 35 °C, v anaerobní atmosféře s obsahem 5–10 % CO₂ po dobu 4 dní (OIE Terrestrial Manual 2016). Kultivační metody se však jeví jako nedostatečné, detekující méně než 0,2 % bakteriálních buněk (Djordjevic et al. 1998; Hornitzky & Smith 1999). K diagnostice je také možné použít imunochemické metody jako je ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) nebo LFIA (z angl. Lateral Flow Immunoassay) (Pinnock & Featherstone 1984; Tomkies et al. 2009). Další možností detekce *M. plutonius* jsou molekulárně genetické metody založené na PCR (Govan et al. 1998), případně na jejich modifikacích jako je hemi-nested PCR (Djordjevic et al. 1998) nebo real-time PCR (Roetschi et al. 2008; Budge et al. 2010). Nejnovější a nejpokročilejší způsob pro detekci *M. plutonius* představuje vysokokapacitní sekvenační technologie – metoda sekvenace nové generace (Erban et al. 2017).

2.3. Význam analýzy dospělých včel a důležitost mikrobiomu

Analýza dospělých včel ze včelstev s projevy HVP pomocí real-time PCR ukázala, že dělnice z plodových plástů obsahovaly přibližně 20krát více bakterií *M. plutonius*, než dělnice odchycené na česně (Roetschi et al. 2008). Nicméně tento výsledek provedený z každého vzoru na 100 jedincích, nebyl opětovně prokázán jinými skupinami (Forsgren et al. 2013). Variabilita počtu bakterií *M. plutonius* se v dospělých včelách významně liší. Avšak včelstva bez příznaků HVP na stanovišti, kde se již vyskytla včelstva s klinickými příznaky HVP, vykazovala vyšší riziko pro rozvoj onemocnění (Budge et al. 2010). Studie za využití sekvenace nové generace ukázala stokrát vyšší obsah *M. plutonius* v dělnicích ze včelstev s klinickými symptomy ve srovnání s asymptomatickými včelstvy na stejném stanovišti (Erban et al. 2017).

Velký vliv na rozvoj jakéhokoliv onemocnění má stav imunity včelstva. Poměrně nově se ukazuje, že součástí imunity včelstva je jeho mikrobiom, tedy veškeré bakterie žijící v jednotlivých včelách. Studie ukazují, že střevní symbiotické bakterie mohou hrát klíčovou roli v obraně proti patogenům (Koch & Schmid-Hempel 2011, 2012; Engel et al. 2016). Střevní mikrobiom zahrnuje symbiotické, komenzální i patogenní bakterie, jejichž složení, množství a vzájemná interakce mezi sebou, může výrazně ovlivňovat zdravotní stav včelstev (Engel et al.

2016). Moran (2015) v review shrnula roli prospěšných symbiotických bakterií pro včelu medonosnou. Následuje výčet dominantních a symbiotických bakteriálních druhů, které osidlují trávicí trakt dělnic. Podle jejich aktuální taxonomie je jim také přiřazeno označení skupiny za pomlčkou

Gilliamella apicola - Gamma1

Frischella perrara - Gamma2

Snodgrassella alvi - Beta

Lactobacillus mellis, *L. mellifer* - Firm4

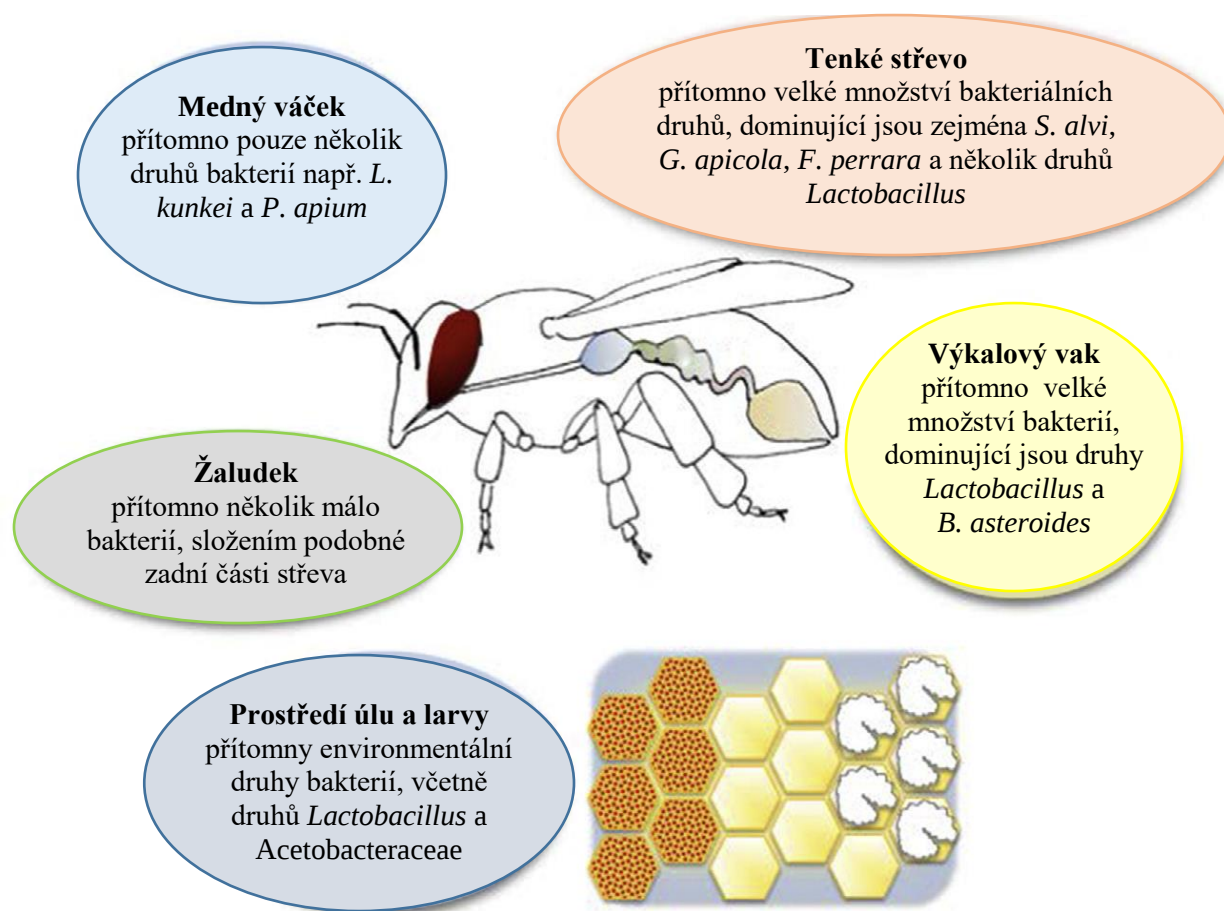
Lactobacillus helsingborgensis, *L. melliventris*, *L. kimbaldii* - Firm5

Bifidobacterium asteroides, *B. actinocolonii*forme, *B. bohemicum* - Bifido

Bartonellaceae (Rhizobiales) - Alpha1

Parasaccharibacter apium (Acetobacteraceae) - Alpha2

Zastoupení symbiotických bakterií v jednotlivých částech trávicího traktu dělnic je znázorněno na obrázku č. 1. Složení a vyváženost střevních mikrobů včel může být narušena vlivem antropogenní činnosti, mj. jednodruhovou (málo pestrou) výživou, intenzivním používáním pesticidů, ale také třeba i používáním antibiotik při léčení bakteriálních onemocnění včel (především používáním oxytetracyklinu, který se využívá v zahraničí pro potlačení *M. plutonius* i *Paenibacillus larvae*, původce MVP; v Česku je přitom používání antibiotik k tlumení včelích nemocí zakázáno) (Budge et al. 2010; Tian et al. 2012; Di Prisco et al. 2013; Engel et al. 2016). Metodami sekvenace nové generace bylo prokázáno, že kromě významného vlivu na mikrobiom larev a kukel má HVP vliv také na mikrobiom dospělých včel. Metody sekvenace nové generace lze tedy využít nejen pro detekci patogenů, ale i k určení jejich významu a vlivu na mikrobiom jako složku imunitního systému (Erban et al. 2017).



Obrázek č. 1. Zastoupení dominantních symbiotických bakterií v částech trávicího traktu dospělé dělnice včely medonosné a v larvách, ale také environmentální bakterie ve včelstvu (převzato z Moran (2015)).

3. Vlastní popis metodiky

3.1. Diagnostika v terénu a odběr vzorků

Součástí správné chovatelské praxe jsou pravidelné prohlídky včelstev s rozebráním díla. Včelař při tom kontroluje mimo jiné množství zásob, přítomnost matky a včelího plodu. Tvar a vzhled tzv. plodového tělesa by měl odpovídat roční době. Patologické změny na plodu se hodnotí metodou porovnání s objekty evidentně zdravými.

Nápadným příznakem, že ve včelstvu není něco v pořádku, je tzv. mezerovitost plodu (obrázek č. 2). Zdravý plod ve včelstvu se vyvíjí z vajíček, které matka kontinuálně klade v elipsách od středu k okrajům, přičemž rozdíl stárí sousedních buněk je v řádu minut (ve směru kladení) až hodin (sousední řady). Jako mezerovitý označujeme plod, kde vidíme v plodové ploše více než 10 % buněk prázdných, nebo stárí sousedních jedinců (vajíček, larev nebo kukel) se liší v řádu dnů. Přírozená mezerovitost v době dostatku potravy je kolem 5 % a stoupá v chladných jarních týdnech (Tautz 2010). Vysoká mezerovitost plodu (až 50 %) se může objevit u inbredních matek. Mezerovitost vzniká tím, že včely v souvislé ploše plodu rozpoznají chybně se vyvíjejícího jedince, ať už v důsledku infekce či vrozené genetické vady. Takovou larvu či kuklu včely odstraní, měkké části pozrou, zbytek spadne do měli na dno a nakonec buňku vyčistí. U matek starých, zpravidla 3 a více let, je mezerovitost způsobena již malým počtem nepravidelně kladených vajíček.

Při nálezů mezerovitého plodu se pozornost prohlížejího musí zaměřit na ty nenormální buňky, které včely ještě nestačily zcela vyprázdnit a vyčistit. Vedle zbytků plodu starých několik hodin je třeba hledat i zbytky vyschlé, tzv. příškvary.

Plásty s nálezem patologických změn (obrázek č. 3) odebíráme jako vzorky pro laboratorní vyšetření. Plásty se odebírají celé, ometené od včel, zabalené do savého materiálu (papíru). Pokud není transport do laboratoře bezprostřední, je třeba se vyvarovat použití plastových folií, ve kterých v důsledku neprodyšnosti hrozí zplesnivění.

Z podezřelých včelstev dále odebíráme vzorky měli (spad ze dna úlů) do papírových vzorkovnic. Vzorky dospělých včel se odebírají do krabiček nebo sáčků v počtu nejméně třiceti jedinců. Usmrcují se zmražením.



Obrázek č. 2. Mezerovitý plod je projevem problému ve včelstvu. (Foto: Martin Kamler)



Obrázek č. 3. Patologické změny na larvách způsobené *Melisococcus plutonius*. (Foto: Dalibor Titěra)

3.2. Mikrobiologické metody

Mikrobiologické metody detekce HVP vycházejí z doporučených diagnostických technik OIE (OIE 2016) a jsou zahrnuty ve standardním operačním postupu VÚVě Dol (Tyl 2016). Jejich využití je při stanovení *M. plutonius* v medu či měli. Při vyšetření je nezbytné provést taxonomickou identifikaci narostlé bakteriální kultury, např. PCR metodou nebo pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie:

3.2.1. Kultivační stanovení *M. plutonius* z medu a měli

Potřebné přístrojové a materiálové vybavení:

- autokláv
- systém pro anaerobní kultivaci (anaerobní box nebo anaerobní nádoby, např. McIntosh & Fildes (1916))
- termostat (je možné použít CO₂ termostat, který může zároveň udržovat hladinu CO₂)
- bakteriologická klička
- digestoř
- kahan
- předvážky
- Petriho misky 90–100 mm
- pipeta (1 a 10 ml)
- polyetylenová sterilní nádoba cca 40 ml
- sterilní nádoby cca 40 ml
- sterilní tyčinky na nabírání medu
- plastové lžičky na nabírání měli
- párátko pro jedno použití
- třepačka

Potřebné chemikálie a roztoky:

- sterilní destilovaná voda
- sterilní fyziologický roztok
- *Melissococcus plutonius* agar:
 - kvasničný autolyzát, 10 g
 - glukóza, 10 g



- rozpustný škrob, 10 g
- cystein, 2 g
- 1M KH₂PO₄, pH 6,6, 100 ml
- agar, 20 g
- destilovaná voda, 900 ml
- výsledné pH 6,6, sterilizace 20 minut při 116 °C

Postup kultivace a vyhodnocení kolonií:

1. a) Do polyetylenové sterilní nádoby se připraví navážka 10 g medu, která se rozpustí v 10 ml sterilního fyziologického roztoku.
b) Do polyetylenové sterilní nádoby se připraví navážka 1 g měli a přidá se 10 ml sterilního fyziologického roztoku.
2. Suspenze se protřepává po dobu 5 minut, nechá se usadit a poté se v objemu 0,2 ml vyočkuje na 3 Petriho misky s kultivačním médiem pro *M. plutonius*.
3. Petriho misky se poté inkubují po dobu 4 dní v anaerobním prostředí (5–10 % CO₂) za použití anaerobního boxu nebo anaerobní nádoby (McIntosh & Fildes 1916). Použití anaerobních nádob má vliv na cenu vyšetření, protože po otevření nádob je nutné vkládat systém pro vytvoření anaerobní atmosféry. Stálá teplota je udržována termostatem při teplotě 35 °C.
4. Souběžně se vzorkem se pro kontrolu provádí také kultivace laboratorního standardu *M. plutonius*.
5. Makroskopickým vyhodnocením se hodnotí růst kolonií na agaru. Kolonie *M. plutonius* jsou bílé, matné, vypouklé o průměrné velikosti 1–1,5 mm.

3.2.2. Mikroskopické stanovení *M. plutonius* z narostlých kolonií

Potřebné přístrojové a materiálové vybavení:

- mikroskop (zvětšení minimálně 1 000 x)
- podložní skla
- bakteriologická klička
- kahan

Potřebné chemikálie a roztoky:

- fyziologický roztok

- roztoky pro Gramovo barvení: krystalická violet, Lugolův roztok, etanol, safranin

Postup a hodnocení mikroskopického vyšetření:

1. Z narostlých kolonií se připraví mikroskopický preparát: na podložní sklo se kápne fyziologický roztok, ve kterém se bakteriologickou kličkou rozmíchá část kolonie, preparát se poté nechá vyschnout a fixuje se plamenem
2. Poté se preparát barví podle následujícího postupu:
 - krystalviolet 1 min oplach vodou
 - Lugolův roztok 1 min oplach vodou
 - 95% etanol 30 s vysušení preparátu
 - safranin 10 s oplach vodou, vysušení preparátu
3. Preparát se poté hodnotí mikroskopicky při 1 000x zvětšení. *M. plutonius* vytváří zašpičatělé Gram pozitivní koky o velikosti 0,5 x 1 µm.

3.2.3. Ověření narostlých kolonií *M. plutonius* pomocí PCR

Pro ověření identity *M. plutonius* se používají specifické detekční primery (EFB-F – 5' GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC 3' a EFB-R – 5' TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG 3'), které jsou navrženy na základě známé sekvence genu pro 16S rRNA podle práce Govan et al. (1998).

Potřebné přístrojové a materiálové vybavení:

- centrifuga s otáčkami minimálně 10 000 g/min
- dokumentační systém s UV transiluminátorem
- zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml)
- PCR zkumavky (0,2 ml)
- pipety (2,5, 10, 100, 1 000 µl)
- termocykler
- zařízení pro horizontální elektroforézu

Potřebné chemikálie:

- agaróza
- DNA ladder (hmotnostní marker)
- dNTP (směs deoxyribonukleotidů)

- fluorescenční barvivo SYBR
- chelex (extrakční činidlo)
- Taq polymeráza, 10x pufr MgCl_2
- Tris Acetate-EDTA pufr (TAE)
- vkladací pufr
- sterilní destilovaná voda
- sterilní párátka

Postup izolace DNA:

1. DNA je vyizolována pomocí chelexu z narostlých kultur *M. plutonius*: sterilním párátkem se přenese část kolonie *M. plutonius* do 1,5ml-zkumavek typu Eppendorf s 5% roztokem chelexu.
2. Zkumavky se poté zahřívají na termobloku při teplotě 65 °C po dobu 10 minut.
3. Po uplynutí této doby se zkumavky centrifugují při otáčkách 5 635 g/1 min.
4. DNA uvolněná v supernatantu je připravena pro další analýzu.

Postup PCR:

1. amplifikační reakce probíhají v objemu 12,5 μl a master mix obsahuje následující komponenty (2 mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, forward a revers primer 100 nM, 0,5 U Taq polymerázy a 1 μl DNA).
2. Amplifikace probíhá v termocykleru za následujících teplotních podmínek:

Počáteční denaturace:	95 °C	1 min
30 cyklů:	93 °C	1 min
	55 °C	30 s
	72 °C	1 min
Finální elongace:	72 °C	5 min
3. PCR produkty se rozdělují na 1% agarozovém gelu a poté jsou vizualizovány fluorescenčním barvivem SYBR na UV transiluminátoru.
4. Pro ověření správnosti PCR reakce je použita pozitivní (referenční kmen *M. plutonius*) a negativní kontrola.

3.3. Přímá detekce *M. plutonius* ve vzorcích včel molekulárními metodami

Molekulární metody pro mikrobiologické vyšetření vzorků napomáhají k rychlé diagnostice *M. plutonius* a vycházejí z doporučených diagnostických postupů OIE (OIE 2016). Tyto metody jsou založeny na polymerázové řetězové reakci případně na jejích modifikacích. Metoda sekvenování nové generace jako další varianta molekulární detekce, která je popsána v kap. 3.3.4, nebyla kromě autorského týmu (viz citaci Erban et al. 2017) dosud pro diagnostiku *M. plutonius* ve vzorcích včel využita.

3.3.1. Odběr vzorků včel

Pomůcky potřebné pro odběr vzorků:

- polyetylenové sáčky
- přenosný chladič box pro usmrcení a zamražení vzorků včel, ideálně se suchým ledem
- vyšetřovací rukavice
- sterilní pinzety

Postup odběru vzorků

1. Pro identifikaci patogenní bakterie *M. plutonius* se odebírají vzorky včelích dělnic v počtu 10 ks a ve třech opakováních.
2. Včelí dělnice se vzorkují z okrajových plástů a ukládají se do chladič boxu.
3. Poté jsou vzorky převezeny do laboratoře k dalšímu zpracování.

3.3.2. Extrakce DNA ze vzorků včel

Pro extrakci DNA ze vzorků včelích dělnic se používá protokol chloroform-fenolové izolace, jehož výhodou je zpracování většího objemu vzorku. Pro izolaci DNA lze alternativně použít i některé komerčně dodávané kity například od firmy Promega nebo GeneAll, ovšem jejich využití je omezeno velikostí vzorku a rovněž cena za zpracování jednoho vzorku je výrazně vyšší.

Potřebné přístrojové a materiálové vybavení:

- centrifuga s otáčkami minimálně 20 000 g/min
- centrifugační zkumavky s objemem 50 ml
- zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml)

- homogenizér
- pipety (1 a 10 ml)
- polypropylenové homogenizační flakony
- SpeedVac (koncentrátor vzorků) – vysušení vzorků

Potřebné chemikálie pro chloroform-fenolovou izolaci DNA:

- 3M octan sodný
- etanol
- fenol
- chloroform
- isopropanol
- isoamylalkohol
- GeneClean® kit (na purifikaci DNA)
- KH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan draselný)
- KCl (chlorid draselný)
- Na_2HPO_4 (hydrogenfosforečnan disodný)
- Tween® 20
- rozbíjecí skleněné kuličky a granátové ostré částěčky (gar) o velikosti 0,1–1 mm (BioSpec 11079101, 11079103gar, 11079105, and 11079110gar; 1/1/1/1 w/w/w/w)

Před vlastní izolací DNA je nutné připravit:

- PBST pufr (3,2 mM Na_2HPO_4 ; 0,5 mM KH_2PO_4 ; 1,3 mM KCl; 135 mM NaCl s 0,05% w/w detergent Tween® 20)
- směs chloroform/isoamylalkohol (24:1)
- směs fenol/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1)
- sterilní homogenizační flakony s rozbíjecími kuličkami a granátovými částěčkami (1:1:1:1)

Popis izolace DNA:

1. Vzorky včelích dělnic se nejdříve povrchově sterilizují následujícím způsobem: oplach v 96% etanolu, následně oplach v PBST pufru.
2. Do homogenizačních flakonů s rozbíjecími kuličkami se vloží 10 ks vysterilizovaných včelích dělnic.



3. Ke včelám se přidá 2 ml PBST pufru a 4 ml fenol/chloroform/isoamylalkoholu a směs je poté 4 minuty homogenizována.
4. Homogenát se přemístí do 15ml-sterilních centrifugačních flakonů a centrifuguje se (4 508 g/5 minut).
5. Supernatant se přemístí do nových 15 ml sterilních centrifugačních flakonů.
6. K supernatantu se přidá 6 ml fenol/chloroform/isoamylalkoholu, flakony jsou jemně protřepány a opět centrifugovány při 4 508 g/5 minut. Tento krok je opakován.
7. Horní vodná fáze se poté v objemu 1 ml přenese do sterilních zkumavek typu Eppendorf a přidá se 0,7 ml 3M octanu sodného a 0,5 ml isopropanolu.
8. Zkumavky typu Eppendorf se uloží do mrazicího boxu (-20 °C) na dobu 20 minut, aby došlo k vysrážení DNA.
9. Poté se zkumavky centrifugují (13 845 g/15 minut) a supernatant se odstraní.
10. Vysrážená DNA se poté přechistí podchlazeným 70% etanolem a směs se opět centrifuguje (13 845 g/15 minut).
11. Etanol se odstraní a vysrážená DNA se vysuší pomocí SpeedVac.
12. Peleta DNA se rozpustí ve 200 µl sterilní destilované H₂O a přechistí pomocí kitu GeneClean® Turbo, podle protokolu výrobce.
13. Vzorky DNA jsou skladovány při -40 °C do další analýzy.

3.3.3. Detekce *M. plutonius* ve vzorcích včel pomocí metody PCR

Pro identifikaci *M. plutonius* ve včelách se používají specifické detekční primery (EFB-F – 5' GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC 3' a EFB-R – 5' TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG 3') podle práce Govan et al. (1998). V případě pozitivní detekce je výsledkem fragment DNA o velikosti 831 pb, viz obrázek č. 4. Pokud je ve vzorcích přítomno pouze malé množství templátové DNA, lze alternativně využít i hemi-nested PCR, založenou na reamplifikaci původního PCR produktu podle protokolu Djordjevic et al. (1998), případně lze využít protokoly pro real-time PCR podle publikací Roetschi et al. (2008) nebo Budge et al. (2010). K ověření přítomnosti bakteriální DNA (a tedy i správnosti izolace DNA) ve vzorcích se použijí univerzální eubakteriální primery, např. 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'), 1492R (5' CGGTTACCTTGTTACGACTT 3') podle studie Weisburg et al. (1991), ty dávají v pozitivním výsledku produkty velikosti 1 450 pb, viz obrázek č. 5.

Vzorky, u kterých je zaznamenána bakteriální DNA, se použijí pro analýzu pomocí metody sekvenování nové generace, viz kapitola 3.3.4. V následujícím textu je uveden protokol pro PCR a specifické detekční (EFB-F, EFB-R) a univerzální eubakteriální primery (27F, 1492R).

Potřebné přístrojové a materiálové vybavení:

- centrifuga (minimálně 7 500 otáček)
- dokumentační systém s UV transiluminátorem
- zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml)
- PCR zkumavky (0,2 ml)
- pipety (2,5, 10, 100 a 1 000 μ l)
- termocykler
- zařízení pro horizontální elektroforézu

Potřebné chemikálie:

- agaróza
- DNA ladder (hmotnostní marker)
- dNTP (směs deoxyribonukleotidů)
- fluorescenční barvivo SYBR
- chelex
- Taq polymeráza, 10x pufr $MgCl_2$
- Tris Acetate-EDTA pufr (TAE)
- vkladací pufr
- sterilní destilovaná voda
- sterilní párátka

Postup PCR:

1. Pro amplifikaci jsou použity vzorky DNA získané fenol-chloroformovou extrakcí. Amplifikační reakce probíhají v objemu 12,5 μ l a master mix obsahuje následující komponenty (2 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, forward a revers primer 100 nM, 0,5 U Taq polymerázy a 1 μ l DNA).
2. Amplifikace probíhá v termocykleru za následujících teplotních podmínek:

Počáteční denaturace: 95 °C 1 min

30 cyklů: 93 °C 1 min
 55 °C 0,5 min
 72 °C 1 min
 Finální elongace: 72 °C 5 min

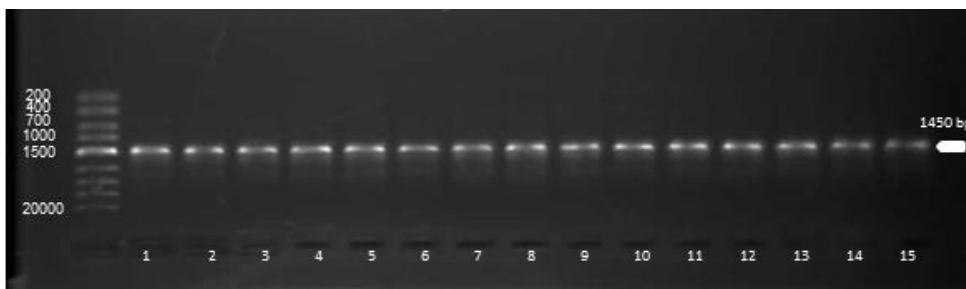
3. PCR produkty se rozdělují na 1% agarozovém gelu a poté jsou vizualizovány fluorescenčním barvivem SYBR na UV transiluminátoru, viz obrázky č. 4 a č. 5.

Pro ověření správnosti PCR reakce je použita pozitivní (referenční kmen *M. plutonius*) a negativní kontrola.

Složení master mixu pro amplifikační reakci i teplotní režim PCR byl shodný pro obě sady použitých primerů (EFB-F, EFB-R a 27F, 1492R).



Obrázek č. 4. Identifikace *M. plutonius* pomocí PCR a specifických primerů (EFB-F, EFB-R). Získaný PCR produkt o velikosti 831 pb indikuje, že z 15 testovaných vzorků je 1 vzorek (č. 2) pozitivní na *M. plutonius*, 2 vzorky (č. 3 a 4) jsou na infekci *M. plutonius* podezřelé a PCR reakce by měla být pro tyto vzorky opakována. Při analýze se používá pozitivní a negativní kontroly, které na tomto obrázku nejsou znázorněny.



Obrázek č. 5. Ověření přítomnosti bakteriální DNA pomocí PCR a eubakteriálních primerů (27F, 1492R). Získaný PCR produkt velikosti 1 450 pb potvrzuje, že z 15 testovaných vzorků je všech 15 pozitivních na bakteriální DNA, navíc intenzita získaných produktů je u všech vzorků obdobná.

3.3.4. Detekce *M. plutonius* ve včelách pomocí metody sekvenování nové generace

Metody sekvenování nové generace umožňují sekvenaci až několika milionů sekvencí současně a poskytují tak komplexní molekulární charakteristiku analyzovaného vzorku. V současnosti dominují čtyři platformy metod sekvenování nové generace – Illumina, Solid, Ion Torrent a 454 Life Technologies, které se od sebe liší použitou chemií a přístupem sekvenování. V uvedeném postupu je použita instrumentace Illumina MiSeq.

Potřebné přístrojové vybavení:

- sekvenátor nové generace – Illumina MiSeq
- termocykler
- zařízení pro horizontální elektroforézu

Potřebné chemikálie:

- agaróza
- HotStar Taq Plus Master Mix - komerční mix pro PCR
- Magnetické kuličky Ampure XP bead – přečištění PCR produktů
- MiSeq Reagent Kit v3 - komerční kit pro sekvenaci vzorků
- TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit – komerční kit pro tvorbu DNA knihovny

Postup sekvenace na přístroji Illumina MiSeq (Chiodini et al. 2015):

1. Pro analýzu jsou použity pouze vzorky, které jsou pozitivně testované na bakteriální DNA *M. plutonius*, viz kapitolu 3.3.3, obrázek č. 5.
2. V prvním kroku je provedena PCR reakce pomocí primerů 27Fmod (5' AGRGTTTGATCMTGGCTCAG 3') a ill519Rmod (5' GTNTTACNGCGGCKGCTG 3'), kdy barcodes jsou připevněny na forward primer.
3. Amplifikační reakce probíhají pomocí komerčního HotStar Taq Plus Master Mixu.
4. Amplifikace probíhá v termocykleru za následujících teplotních podmínek:

Počáteční denaturace:	94 °C 3 min
28 cyklů:	94 °C 30 s
	53 °C 40 s
	72 °C 1 min
Finální elongace:	72 °C 5 min

5. Kvalita PCR produktů je poté ověřena na 2% agarozovém gelu.
6. Poté jsou různé vzorky (např. 100 vzorků) s navázanými barcody smíchány na základně jejich molekulární hmotnosti a koncentrace DNA a přečištěny pomocí magnetických kuliček Ampure XP bead.
7. Z přečištěných PCR produktů se vytvoří DNA knihovna pomocí komerčního kitu TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit, s finální koncentrací aplikonů 100 ng.
8. Vlastní sekvenace probíhá na sekvenátoru MiSeq pomocí komerčního kitu MiSeq Reagent Kit v3, kdy délka amplifikovaného fragmentu genu 16S rRNA je cca 300 pb.

3.3.5. Bioinformatická a statistická analýza získaných sekvencí metodou nové generace sekvenování

Pro hodnocení bioinformatických dat popisující bakteriální komunitu včely medonosné se použije program MOTHUR (Schloss et al. 2009), UPARSE (Edgar 2013), případně jejich kombinace. Podrobný návod k použití programu MOTHUR je uveden na webových stránkách: http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP a v práci Kozich et al. (2013). Postup zpracování sekvencí pomocí programu UPARSE je popsán v publikaci Edgar (2013) a postup je uveden na webových stránkách http://drive5.com/usearch/manual/upp_ill_pe.html. Před vlastní analýzou je nutné získat aktuální referenční list z databáze SILVA (Quast et al. 2013), který je dostupný na webových stránkách programu MOTHUR a aktuální databázi RDP (Cole et al. 2014), jež je dostupná na webových stránkách UPARSE.

Potřebné programy:

- Codon Code Aligner – editace sekvencí, Blast
(<http://www.codoncode.com/>)
- Bioedit – editace sekvencí, Blast
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>)
- KRONA – grafické zobrazení identifikovaných OTU
(<http://mrnafreeware.com/krona.html>)
- MOTHUR – bioinformatická a statistická analýza dat
(http://www.mothur.org/wiki/Download_mothur)
- UPARSE – bioinformatická analýza dat
(<http://drive5.com/uparse/>)



- PAST – statistická analýza dat (Hammer et al. 2001)
(<http://folk.uio.no/ohammer/past/>)
- UCHIME – součást programu MOTHUR, editace sekvencí (odstranění chimér) (Edgar et al. 2011)

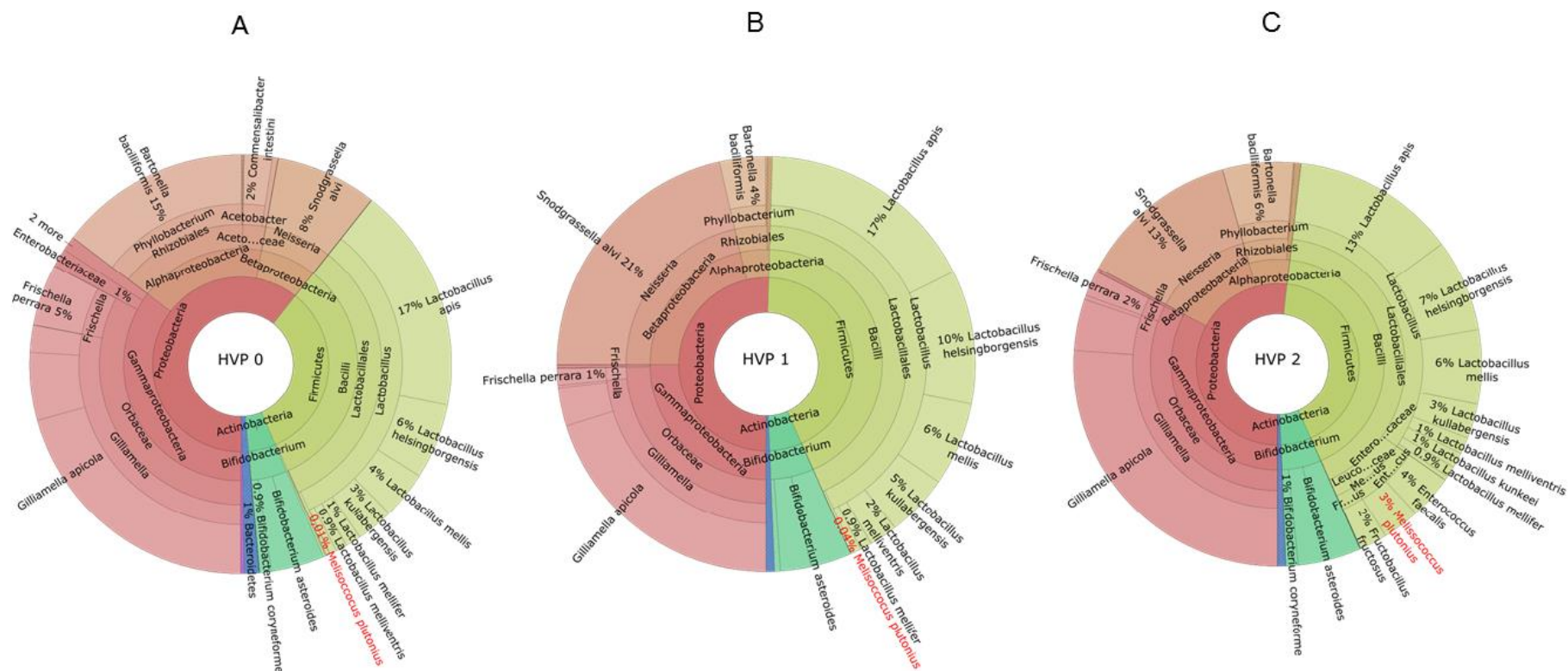
Postup zpracování sekvencí pomocí programů MOTHUR a UPARSE:

Pro bioinformatické hodnocení se používají data analyzovaná metodou sekvenace nové generace, např. data obsahující sekvence spojené do kontigů.

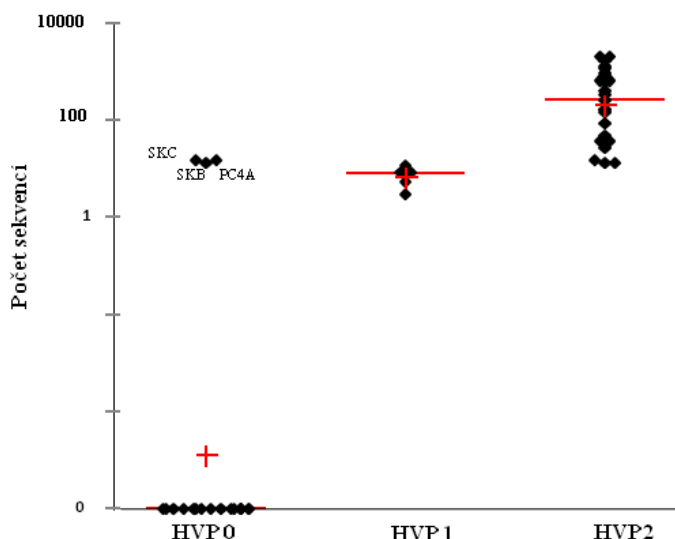
1. V programu MOTHUR je nejdříve zadán příkaz **trim.seqs**, kterým jsou z analyzovaných sekvencí odstraněny primery a barcodingy.
2. V případě hodnocení více sad sekvencí je možné zadat příkaz **merge.files**, kterým jsou jednotlivé sady sekvencí sloučeny a vytvoří se soubory nutné pro další analýzu (*qual*, *fasta* a *groups*).
3. Příkazem **make.fastq** jsou vytvořeny *fastq* soubory nutné pro další analýzu dat.
4. Pomocí příkazu **rename.seqs** jsou k jednotlivým sekvencím připojeny názvy skupin.
5. Další zpracování sekvencí probíhá v programu UPARSE, kde jsou sekvence pomocí příkazu **fastq_filter** zbaveny PCR artefaktů a chyb sekvenování.
6. Příkazem **derep_fulllength** jsou ze souboru odstraněny unikátní sekvence.
7. Poté jsou sekvence pomocí příkazu **sortbysize** seřazeny podle abundance.
8. Následně jsou příkazem **cluster_otus** vytvořeny operačně taxonomické jednotky (OTU).
9. Vytvořené OTU jsou identifikovány příkazem **utax** podle aktuální databáze RDP.
10. Poté je pomocí příkazu **usearch_global** vytvořen alignment.
11. Další zpracování sekvencí se provádí opět v programu MOTHUR, kdy jsou sekvence sjednoceny s databází SILVA, pomocí příkazu **align.seqs**.
12. Příkazem **summary.seqs** je ověřena kvalita sjednocených sekvencí.
13. Poté jsou pomocí příkazu **screen.seqs** odstraněny sekvence špatné kvality a velikosti.
14. Opět následuje příkaz **summary.seqs** ke znázornění změn v hodnocených sekvencích.
15. Kvalita sekvencí je poté upravena příkazem **filter.seqs**.
16. Příkazem **chimera.uchime** jsou znázorněny potenciální chimérické sekvence ve sledovaném souboru.
17. Následným příkazem **remove.seqs** jsou chimérické sekvence odstraněny.

18. Sekvence identifikovaných OTU je možné otevřít v programu CodonCode nebo Bioedit a poté jsou sekvence jednotlivých OTU porovnávány pomocí Blast s databází Genbank (Altschul et al. 1997).
19. Identifikované OTU v jednotlivých vzorcích jsou následně vizualizovány pomocí KRONA zobrazení, viz obrázek č. 6.
20. Statistická analýza dat probíhá v programu MOTHUR, kdy jsou pomocí příkazu **count.groups** určeny počty sekvencí ve vzorcích a příkazem **sub.sample** je zajištěna vyváženost datového souboru pro statistické analýzy.
21. Poté jsou pomocí příkazu **summary.single** vypočítány základní parametry α -diverzity (např. inverzní Simpsonův index, počet sekvencí, počet druhů). Vyhodnocení výsledku parametrů α -diverzity je znázorněno na obrázku č. 7.
22. Pomocí příkazu **dist.shared** je vytvořen soubor pro výpočet parametrů β -diverzity, které jsou založeny na porovnání podobnosti jednotlivých vzorků. Pro porovnání podobnosti se využívá řada ekologických indexů (např. Bray–Curtisův index, Jaccardův index).
23. Pomocí příkazu **amova** lze porovnat vliv zadaného faktoru na bakteriální složení vzorků, další test který je možné použít je **homova**, kterým se vypočítá homogenita molekulární variance.
24. Dále je provedena analýza dat na úrovni populace, která umožňuje vyhodnotit, zda je bakteriální společenstvo v analyzovaných vzorcích ovlivněno zvoleným faktorem. Analýza je vypočítána zadáním příkazu **metastat**.

Legenda vizualizovaných typů vzorků: **A)** Vzorky včelích dělnic z kontrolních zdravých včelstev; **B)** Vzorky včelích dělnic v ochranném pásmu HVP, avšak bez klinických příznaků HVP; **C)** Vzorky včelích dělnic ze včelstva s klinickými příznaky HVP.



Popis situace na grafu: Grafy zobrazují složení bakteriálního společenstva vzorků a znázorňují zastoupení jak symbiotických tak i patogenních případně potencionálně patogenních bakterií, které se vyskytují v analyzovaných vzorcích včelích dělnic.

Obrázek č. 7. Vyhodnocení parametru α -diverzity.

Legenda: **HVP 0** – vzorky včelích dělnic z kontrolních zdravých včelstev; **HVP 1** – vzorky včelích dělnic ze včelstev bez klinických příznaků HVP, ale ze stanoviště, kde byla včelstva klinicky pozitivní s HVP; **HVP 2** – vzorky včelích dělnic ze včelstev s klinickými příznaky HVP.

Popis situace na grafu: Nejvyšší počet sekvencí *M. plutonius* vykazují vzorky včelích dělnic s klinickými příznaky onemocnění – HVP2. U zdravých kontrolních včelstev (HVP0) mimo ochranné pásmo HVP byl *M. plutonius* prokázán u tří z množství testovaných vzorků, a zastoupení sekvencí *M. plutonius* v těchto pozitivních kontrolních vzorcích je podobné jako v případě všech včelstev, která sice nevykazovala symptomy HVP, ale byla na stanovištích se včelstvy s klinickými příznaky HVP. Poznámka: Přítomnost *M. plutonius* ve včelstvech v malém počtu potvrzují i naše další výsledky sekvenací (nepublikované výsledky), což potvrzuje enzootický výskyt *M. plutonius*. Vzorky pocházející ze včelstev bez klinických příznaků, ale ze stanovišť, kde byl prokázán klinický výskyt HVP, vykazují vysokou frekvenci výskytu *M. plutonius*, ale s nízkými koncentracemi.

Zajímavostí je, že *M. plutonius* byl detekován i ve včelách na stanovištích, která dlouhodobě nemají problémy se zdravotním stavem včelstev a ani historicky není znám případ onemocnění HVP. Z kvantifikace sekvencí detekované DNA *M. plutonius* se však jedná o velmi malé množství bakterií. Dále pak vzorky včel ze včelstev klinicky bez příznaků HVP, ale umístěná na stanovišti, kde byla klinicky pozitivní včelstva s HVP, ukazují již vyšší výskyt sekvencí DNA *M. plutonius*. To je důkazem, že patogenní bakterie *M. plutonius* již koluje ve včelstvu a může se množit a časem může včelstvo klinicky onemocnět.

4. Srovnání novosti postupů

V předkládané metodice jsou zahrnuty optimalizované pracovní postupy pro přesnou identifikaci *M. plutonius* pomocí kultivačních a molekulárních metod nebo jejich kombinací. Inovativním prvkem, který nebyl dosud kromě autorského týmu používán a má velké přednosti, je v předkládané metodice využití metody sekvenování nové generace, která patří mezi nejmodernější metody molekulární genetiky. Výhodou této metody je nejen možnost identifikace a kvantifikace patogena, ale i determinace další bakteriální komunity asociované s vyšetřovaným vzorkem. Mohou tak být identifikovány doprovodné bakterie, které mohou působit synergicky případně antagonisticky vůči *M. plutonius*.

5. Popis uplatnění metodiky

V Česku se nachází síť diagnostických laboratoří Státní veterinární správy a nově se také objevují odborné týmy pedagogicko-vědeckých institucí, které se začínají věnovat tématu zdraví a nemocí včel. Doposud však nikdo nepracuje s komplexním přístupem kombinací diagnostických technik HVP, včetně nejnovějších metod sekvenování nové generace. Tato certifikovaná metodika tak najde uplatnění jak v již zavedených a vybavených laboratořích, tak i v nově etablovaných pracovištích. Metodika předkládá všechny dostupné a validované metody diagnostiky HVP, která byla znovu prokázána v Česku po 40 letech. Laboratoře by proto měly mít v rukou návrhy a postupy pro správnou diagnostiku tohoto nebezpečného onemocnění včel.

6. Ekonomické zhodnocení metodiky

Hlavním přínosem spolehlivé diagnostiky je omezení šíření nákazy a souvisejících škod. HVP je dle Veterinárního zákona zařazena mezi nebezpečné nákazy zvířat, a proto jsou v případě eliminace a eradikace ohniska vypláceny chovatelům finanční náhrady. V roce 2014 bylo chovatelům včel v Česku v souvislosti s eradikacemi vyplaceno 8 807 798 Kč, 21 373 297 Kč v roce 2015 a 10 368 306 Kč v roce 2016 (tato částka není v době vydání této publikace kompletní a stále jsou řešeny požadavky za rok 2016). Na těchto náhradách může mít v případě vypuknutí nákazy významný podíl také HVP. V tomto důsledku mohou i celkové náklady při eradikaci jednoho ohniska být v řádech desítek až stovek tisíc korun. Včasná a správná diagnostika HVP jejímž důsledkem je odhalení potenciálních zdrojů infekce a jejich včasná

eliminace, tak může náklady významně snížit, protože cena popsanych laboratorních metod je vzhledem k závažnosti problematiky plně akceptovatelná.

Cenové nároky na vzorek:

- extrakce DNA – 100 Kč
- PCR s použitím detekčních primerů pro *M. plutonius* a eubakteriálních primerů – 40 Kč
- sekvenování pomocí metody sekvenování nové generace – lze využít sekvenace V4 oblasti genu 16S rRNA za 600 Kč nebo sekvenace V1 až V3 oblasti genu 16S rRNA za 2 200 Kč
- celkové náklady na vzorek při použití metody sekvenace nové generace se mohou v současnosti pohybovat dle zvolené metody a započtení práce od cca 1 000 Kč do 2 600 Kč bez DPH.
- celkové náklady na přímou PCR analýzu jednoho vzorku se mohou pohybovat po započtení práce v ceně 500 až 1 000 Kč
- stanovení *M. plutonius* pomocí mikrobiologických metod je cca 500 Kč

Laboratorní metody, které dokážou spolehlivě diagnostikovat bakteriální nemoci včelího plodu (absence patogena), přinášejí velkou úsporu času. Současná metodika ukládá vytyčení ochranných pásem kolem ohnisek a prohlídku (někdy dvě) všech včelstev v ochranném pásmu kvalifikovanou osobou. Tyto prohlídky představují nemalé náklady a cestovní náhrady. V případě předřazení spolehlivých laboratorních rozborů není nutné včelstva na stanovištích bez nálezů patogenu prohlížet.

7. Publikace, které předcházely metodice

Erban T., Ledvinka O., Kamler M., Hortova B., Nesvorna M., Tyl J., Titera D., Markovic M., Hubert J. (2017) Bacterial community associated with honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. PeerJ (in press).

Hubert J., Bicianova M., Ledvinka O., Kamler M., Lester P. J., Nesvorna M., Kopecky J., Erban T. (2017) Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. Microbial Ecology 73 (3): 685–698.

Hubert J., Kamler M., Nesvorna M., Ledvinka O., Kopecky J., Erban T. (2016) Comparison of *Varroa destructor* and worker honeybee microbiota within hives indicates shared bacteria. Microbial Ecology 72 (2): 448–459.

Kamler M., Tyl J., Nesvorná M., Hubert J., Merta J., Karešová B., Titěra D. (2016) Hniloba včelího plodu - znovuobjevená infekce včelstev v České republice. Veterinářství 66 (6): 435–438.

Kamler M., Tyl J., Titěra D., Hubert J., Nesvorná M., Vaníčková A., Merta J. (2015) Hniloba včelího plodu po mnoha letech opět aktuální. Včelařství 68 (10): 352–353.

Tyl J. (2016) VÚVč Dol – Standardní operační postup MI_04 _MP: stanovení *Melissococcus plutonius*; předmět zkoušky: med, měl, plod. Dol: Výzkumný ústav včelařský. (interní dokument)

Tyl J., Titěra D., Karešová B., Merta J. (2016) Hniloba včelího plodu po 40 letech. Včelařství 69 (5): 158–159.

8. Seznam zkratek

AFB – anglická zkratka pro mor včelího plodu (American foulbrood)

ČR – Česká republika

ELISA – z anglického „*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*“, imunologická metoda

EFB – anglická zkratka pro hnilobu včelího plodu (European foulbrood); použito u PCR primerů

HVP – hniloba včelího plodu

KVS – krajská veterinární správa

LFIA – z anglického „*Lateral Flow ImmunoAssay*“, imunologická metoda

MVO – mimořádná veterinární opatření

MVP – mor včelího plodu

MZe – Ministerstvo zemědělství

OIE – *The World Organisation for Animal Health* – Světová organizace pro zdraví zvířat (zkratka zůstala z dřívějšího francouzského názvu organizace „*Office International des Epizooties*“)

pb – párů bází

PCR – z anglického „*Polymerase Chain Reaction*“, polymerázová řetězová reakce

SVS – Státní veterinární správa

VÚRV – Výzkumný ústav rostlinné výroby

VÚVč – Výzkumný ústav včelařský

9. Citovaná literatura

- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389–3402.
- Arai R., Tominaga K., 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): e33708. DOI: 10.1371/journal.pone.0033708.
- Bailey L. (1956) Aetiology of European foulbrood; a disease of the larval honeybee. *Nature* 178 (4542): 1130–1130.
- 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. (1959) An improved method for the isolation of *Streptococcus pluton*, and observations on its distribution and ecology. *Journal of Insect Pathology* 1: 80–85.
- Bailey L. (1960) The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Journal of Insect Pathology* 2 (2): 67–83.
- Bailey L. (1961) European foulbrood. *American Bee Journal* 101: 89–92.
- Bailey L. (1983) *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *Journal of Applied Bacteriology* 55 (1): 65–69.
- Budge G. E., Barrett B., Jones B., Pietravalle S., Marris G., Chantawannakul P., Thwaites R., Hall J., Cuthbertson A. G. S., Brown M. A. (2010) The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *Journal of Invertebrate Pathology* 105 (2): 164–170.
- Budge G. E., Jones B., Powell M., Anderson L., Laurenson L., Pietravalle S., Marris G., Haynes E., Thwaites R., Bew J., Wilkins S., Brown M. (2011) Recent advances in our understanding



- of European foulbrood in England and Wales. *In*: Jensen A. B., Forsgren E., Genersch E. (eds.) Proceedings of the COLOSS workshop: The future of brood disease research – guidelines, methods and development, Copenhagen, Denmark, April 10–12, 2011. Bern: COLOSS (Prevention of honey bee Colony LOSSes), pp. 7–7. URL: <http://www.coloss.org/publications/annex-5-a-copenhagen-april-2011-proceedings>
- 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*. *ISME Journal* 8 (8): 1588–1597.
- Cole J. R., Wang Q., Fish J. A., Chai B., McGarrell D. M., Sun Y., Brown C. T., Porras-Alfaro A., Kuske C. R., Tiedje J. M. (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D633–D642.
- ČR (1999) Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (veterinární zákon): příloha č. 2: nákazy a nemoci přenosné ze zvířat na člověka, které jsou považovány za nebezpečné, a jejich původci. *In*: Sbírka zákonů České republiky, částka 57/1999. 30. 7. 1999. URL: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/100050593.html>
- Dahle B., Sørum H., Weideman J. E. (2011) European foulbrood in Norway: how to deal with a major outbreak after 30 years absence. *In*: Jensen A. B., Forsgren E., Genersch E. (eds.) Proceedings of the COLOSS workshop: The future of brood disease research – guidelines, methods and development, Copenhagen, Denmark, April 10–12, 2011. Bern: COLOSS (Prevention of honey bee Colony LOSSes), pp. 9–9. URL: <http://www.coloss.org/publications/annex-5-a-copenhagen-april-2011-proceedings>
- Defra (2013) Review of policies on managing and controlling pests and diseases of honey bees: evidence profile on European foulbrood (EFB). *In*: Consultation outcome: improving honey bee health. London: Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra). URL: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/221155/bee-health-consult-efbprofile-20130110.pdf



- Di Prisco G., Cavaliere V., Annoscia D., Varricchio P., Caprio E., Nazzi F., Gargiulo G., Pennacchio F. (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 110 (46): 18466–18471.
- Djordjevic 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 (3): 165-174.
- Edgar R. C. (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* 10 (10): 996–998.
- Edgar R. C., Haas B. J., Clemente J. C., Quince C., Knight R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27 (16): 2194–2200.
- Engel P., Kwong W. K., McFrederick Q., Anderson K. E., Barribeau S. M., Chandler J. A., Cornman R. S., Dainat J., de Miranda J. R., Doublet V., Emery O., Evans J. D., Farinelli L., Flenniken M. L., Granberg F., Grasis J. A., Gauthier L., Hayer J., Koch H., Kocher S., Martinson V. G., Moran N., Munoz-Torres M., Newton I., Paxton R. J., Powell E., Sadd B. M., Schmid-Hempel P., Schmid-Hempel R., Song S. J., Schwarz R. S., vanEngelsdorp D., Dainat B. 2016. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *mBio* 7 (2): e02164-15. DOI: 10.1128/mBio.02164-15.
- Erban T., Ledvinka O., Kamler M., Hortova B., Nesvorna M., Tyl J., Titera D., Markovic M., Hubert J. (2017) Bacterial community associated with honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. *PeerJ* (in press).
- Forsgren E. (2010) European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (Supplement 1): S5–S9.
- Forsgren E., Budge G. E., Charrière J.-D., Hornitzky M. A. Z. (2013) Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* 52 (1): 52.1.12. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.12.



- Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. (2006) Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (3): 501–511.
- Govan V. A., Brözel V., Allsopp M. H., Davison S. (1998) A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (5): 1983–1985.
- Grangier V. (2011) Early detection of European foulbrood using real-time PCR. PhD thesis. Bern: University of Bern, Vetsuisse Faculty.
- Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 4. URL: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Hornitzky M. A. Z., Smith L. A. (1999) Sensitivity of Australian *Melissococcus pluton* isolates to oxytetracycline hydrochloride. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 39 (7): 881–883.
- Cheshire F. R., Cheyne W. W. (1885) The pathogenic history and history under cultivation of a new *Bacillus* (*B. alvei*), the cause of a disease of the hive bee hitherto known as foul brood. *Journal of the Royal Microscopical Society* 5 (4): 581–601.
- Chiodini R. J., Dowd S. E., Chamberlin W. M., Galandiuk S., Davis B., Glassing A. (2015) Microbial population differentials between mucosal and submucosal intestinal tissues in advanced Crohn's disease of the ileum. *PLoS One* 10 (7): e0134382. DOI: 10.1371/journal.pone.0134382.
- Kamler M., Tyl J., Nesvorná M., Hubert J., Merta J., Karešová B., Titěra D. (2016) Hniloba včeliho plodu - znovuobjevená infekce včelstev v České republice. *Veterinářství* 66 (6): 435–438.



- Koch H., Schmid-Hempel P. (2011) Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 108 (48): 19288–19292.
- Koch H., Schmid-Hempel P. (2012) Gut microbiota instead of host genotype drive the specificity in the interaction of a natural host-parasite system. *Ecology Letters* 15 (10): 1095–1103.
- Kozich J. J., Westcott S. L., Baxter N. T., Highlander S. K., Schloss P. D. (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (17): 5112–5120.
- KVSH (2015) Mimořádná veterinární opatření při výskytu nebezpečné nákazy hniloba včelího plodu v chovech včel v regionu Královéhradeckého kraje, k zamezení jejího šíření a k jejímu zdolání. Nařízení Státní veterinární správy, č. j. SVS/2015/084740-H, 19. 8. 2015. Hradec Králové: Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Královéhradecký kraj (KVSH). URL: http://eagri.cz/public/web/file/417238/Narizeni_MVO_hniloba_vceliho_plodu_c.j._SVS_2015_084740_H.pdf
- KVSH (2016) Změna č. 1 mimořádných veterinárních opatření vyhlášených v Nařízení SVS č. j. SVS/2015/084740-H ze dne 19. 8. 2015 při výskytu nebezpečné nákazy hniloba včelího plodu v chovech včel v katastrálních územích obcí regionu Královéhradeckého kraje, k zamezení jejího šíření a k jejímu zdolání a k zabezpečení zdravotní nezávadnosti živočišných produktů. Nařízení Státní veterinární správy, č. j. SVS/2016/074234-H, 20. 6. 2016. Hradec Králové: Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Královéhradecký kraj (KVSH). URL: http://eagri.cz/public/web/file/470485/Narizeni_HVP_zmena_c._1.pdf
- Moran N. A. (2015) Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science* 10: 22–28.
- McIntosh J., Fildes P. (1916) A new apparatus for the isolation and cultivation of anaerobic micro-organisms. *Lancet* 187 (4832): 768–770.



- OIE (2016) OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2016. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE). URL: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2016/>
- OIE Terrestrial Manual (2016) Chapter 2.2.3. European foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Melissococcus plutonius*). Version adopted in May 2016. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2016. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE). URL: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>
- 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 (3): 168–170.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F. O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research 41 (Database issue): D590–D596.
- 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 (3): 362–371.
- Schirach A. G. (1771) Histoire naturelle de la reine des abeilles, avec l'art de former des essaims. La Haye: F. Staatman.
- Schloss P. D., Westcott S. L., Ryabin T., Hall J. R., Hartmann M., Hollister E. B., Lesniewski R. A., Oakley B. B., Parks D. H., Robinson C. J., Sahl J. W., Stres B., Thallinger G. G., Van Horn D. J., Weber C. F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 75 (23): 7537–7541.
- Tautz J. (2010) Fenomenální včely: biologie včelstva jako superorganizmu. Vydání v češtině 2. Praha: Brázda.



- Tian B., Fadhil N. H., Powell J. E., Kwong W. K., Moran N. A. (2012) Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *mBio* 3 (6): e00377-12. DOI: 10.1128/mBio.00377-12.
- Tomkies V., Flint J., Johnson G., Waite R., Wilkins S., Danks C., 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 (1): 63–72.
- Tyl J. (2016) VÚVč Dol – Standardní operační postup MI_04 _MP: stanovení *Melissococcus plutonius*; předmět zkoušky: med, měl, plod. Dol: Výzkumný ústav včelařský. (interní dokument)
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173 (2): 697–703.
- White G. F. (1912) The cause of European foulbrood. Circular No. 157. Washington, DC: U. S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology.
- Wilkins S., Brown M. A., Cuthbertson A. G. S. (2007) The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest Management Science* 63 (11): 1062–1068.

Tomáš Erban a kol. 2017 – Metody diagnostiky hniloby včelího plodu



ISBN 978-80-7427-212-7



ISBN 978-80-87196-23-6

