

Středoškolská odborná činnost

Obor 08 – Ochrana a tvorba životního prostředí

**Monitorování infekčního tlaku moru včelího
plodu kartovou metodou**

Daniel Štipl

České Budějovice 2014

Středoškolská odborná činnost
Obor 08 – Ochrana a tvorba životního prostředí

Monitorování infekčního tlaku moru včelího plodu kartovou metodou

Monitoring of infection pressure of American
foulbrood with the card method

Autor: Daniel Štipl
Škola: Gymnázium, České Budějovice, Jírovcova 8, 371 61 České Budějovice
Kraj: Jihočeský kraj
Konzultant: Ing. Václav Křišťufek, CSc., Biologické centrum AV ČR, v. v. i. – Ústav
půdní biologie, České Budějovice

České Budějovice 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval samostatně, použil jsem jen literaturu uvedenou v seznamu použité literatury a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v plném znění.

V Českých Budějovicích, 8. 4. 2014

.....

Poděkování

Moje poděkování patří především Ing. Václavu Křišťůfkovi, CSc. (BC AV ČR, v. v. i. – ÚPB Č. Budějovice) za veškerou pomoc, podporu a čas, který mi věnoval a také za zasvěcení do problematiky závažné nemoci včelstev – moru včelího plodu.

Dále bych chtěl poděkovat Biologickému centru AV ČR, v. v. i. – ÚPB za možnost pracovat v laboratořích a také pracovníkům ústavu za odborné rady. Stejně tak děkuji Mgr. Štěpánu Rybovi, PhD. (PřF JU v Č. Budějovicích), který mi poskytl cenné informace o moru včelího plodu a jeho původci *Paenibacillus larvae* a Ing. Ludku Paprskárovi (LabMediaServis s. r. o. v Jaroměři) za zasvěcení do přípravy živných medií pro kultivaci bakterie *P. larvae*.

Touto cestou bych také rád poděkoval Ing. Petře Junkové, doktorandce na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, pod jejímž vedením jsem provedl identifikaci bakterií metodou MALDI – TOF MS.

Paní Mgr. Jarmile Ichové (Gymnázium Jírovцова, Č. Budějovice) patří mé poděkování za doporučení podílet se na tomto projektu.

Práce byla podpořena projekty:

i) VĚDRO (Věda pro veřejnost/cesta k udržitelnému rozvoji, 2012 – 2014) realizovaném na Biologickém Centru AV ČR, v. v. i. v Č. Budějovicích. V tomto projektu jsem aktivně zapojen od roku 2012 jako účastník v části Středoškolská odborná činnost.

ii) Transfer znalostí a technologií ve vybraných regionech založených na Evropském vzdělávacím modelu „Technology Transfer Manager“ (reg. No. CZ.1.07/2.4.00/12.0082).

Anotace

Práce byla zaměřena na závažné onemocnění včel – mor včelího plodu, jehož původcem je grampozitivní bakterie *Paenibacillus larvae*. V úvodu je shrnuta problematika dopadu choroby na včelstva. Dále je charakterizován postup Státní veterinární správy ČR ke zdolávání nebezpečné nákazy (vymezení ochranného pásma, opatření v ochranném pásmu, zdolání nákazy). Studie popisuje dosud používanou mikrobiologickou metodu k monitorování předklinického stádia rozšíření moru včelího plodu a hodnotí význam metody pro boj proti této nebezpečné chorobě včel.

Hlavním cílem práce bylo ověření nové metody pro relativně jednoduché monitorování stavu možného infekčního tlaku moru včelího plodu v jednotlivých včelstvech. Metoda bude pro včelaře uživatelsky dostupná. Metoda detekuje přítomnost patogenu již v předklinickém stadiu choroby, kdy ještě nelze na včelstvu sledovat žádné příznaky. Součástí příslušenství nové testovací metody je kultivační karta RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* ve které bude použito nové živné médium s větší záchytností patogenu v porovnání s dosud používanými kultivačními médii.

Také byla porovnána účinnost výtěžnosti spor *P. larvae* z včelí mčeli metodou používanou Státní veterinární správou ČR a tzv. Tweenovou metodu popsanou Bzdilem (2007). Tweenová metoda byla účinnější a hygieničtější a proto byly její principy použity v nově navržené metodě kultivace spor *P. larvae* na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*.

K rozlišení *P. larvae* a případné doprovodné mikroflóry, narostlé a izolované na kultivačních médiích, byla použita jak moderní identifikační technika hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem na principu MALDI – TOF MS, tak klasické metody, jako je Gramovo barvení, světelná mikroskopie a peroxidový test.

Klíčová slova: bakterie *Paenibacillus larvae*; MALDI – TOF MS; monitorování; mor včelího plodu; testová karta RIDA®COUNT; včela; živné médium

Annotation

The work is focused on a serious illness of honeybee called American foulbrood which is caused by a gram-positive bacterium, *Paenibacillus larvae*. In the introduction, the problems connected with this disease are summed up. The description of a method used by Nation veterinary administration of ČR to fight against the American foulbrood (specification of safety zone, measures in the safety zone, etc.) is included in the next part. The study describes the microbiological method used nowadays for monitoring of the expansion of *P. larvae*, and evaluates the sense of this method.

The main aim of this work is to verify a new method designed for quite easy monitoring of infection pressure of American foulbrood in each bee colony. This method would be quite common and user friendly. The method identifies the pathogen in the pre-clinical stadium of the illness when a beekeeper is not yet able to see any symptoms. The part of a set for this new monitoring method is the RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* test sheet. In this test sheet a new growth medium will be used, it is better than currently used mediums in growing and catching the *P. larvae*.

Moreover, there is a comparison between two methods as to how generate spores of the *P. larvae* from bee trash. The first method uses toluene. This „Toluene method“ is currently used by Nation veterinary administration of ČR. The second one uses the Tween 80 instead of toluene. The „Tween method“ was described by MVDr. Jaroslav Bzdil in 2007. It was more effective and more hygienic than the Toluene method. Therefore, the techniques of Tween method were used in the new method which catches spores of *P. larvae* on RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* test sheets.

For identification of *P. larvae* and potential micro flora grown and isolated on the agar mediums the modern technique MALDI – TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry) as well as classic techniques using microscope, Gram staining and peroxid test were used.

Keywords: American foulbrood; bacterium *Paenibacillus larvae*; growth medium; honeybee; MALDI – TOF MS; monitoring; RIDA®COUNT test sheet

Obsah

1	Úvod	9
1.1	Postup Státní veterinární správy ČR v otázce moru včelího plodu.....	10
1.2	Cíle práce	13
1.3	Hypotézy práce.....	14
1.4	Úvod do metodiky.....	14
1.4.1	Živné medium.....	14
1.4.2	Testovací karta RIDA®COUNT	16
1.4.3	Odběr vzorků voskové měli.....	17
1.4.4	Metody přípravy inokula za použití Tweenu 80 a toluenu.....	18
1.4.5	Izolace a identifikace bakterií.....	19
2	Materiál a metody.....	22
2.1	Složení a příprava použitých typů živných medií určených pro kultivaci <i>Paenibacillus larvae</i>	22
2.1.1	Živná media MYPGP agar, MYPGPn agar a MYPGPnp agar	22
2.1.2	Živné medium PLA agar	23
2.1.3	Živné medium CSA agar	24
2.1.4	Živné medium XY agar	25
2.2	Porovnání pracovního postupu pro stanovení infekčního tlaku moru včelího plodu toluenovou, tweenovou a kartovou metodou	25
2.2.1	Zpracování voskové měli klasickou toluenovou metodou	25
2.2.2	Zpracování voskové měli tweenovou metodou	27
2.2.3	Stanovení infekčního tlaku moru včelího plodu kartovou metodou	30
2.3	Identifikace bakterií	30
2.3.1	Peroxidový test	31
2.3.2	Izolace bakterií	31
2.3.3	Identifikační metoda MALDI – TOF MS	31
2.3.4	Identifikační metoda barvení preparátu dle Grama	35
2.4	Stanovení <i>Paenibacillus larvae</i> v půdě.....	36

2.5	Práce se zařízením pro jednoduché monitorování infekčního tlaku moru včelího plodu v jednotlivých včelstvech v praxi.....	38
3	Výsledky.....	42
3.1	Porovnání vlastností různých typů živných medií určených pro kultivaci <i>Paenibacillus larvae</i>	42
3.2	Důkaz <i>Paenibacillus larvae</i> pomocí různých identifikačních metod	45
3.2.1	Identifikační metoda MALDI – TOF MS	45
3.2.2	Metoda barvení preparátu dle Grama	48
3.2.3	Peroxidový test	48
3.3	Stanovení <i>Paenibacillus larvae</i> v půdě.....	48
3.4	Práce se zařízením pro jednoduché monitorování infekčního tlaku moru včelího plodu v jednotlivých včelstvech v praxi.....	48
	Závěry.....	51
	Seznam použité literatury	54

1 ÚVOD

Mor včelího plodu je v dnešní době velmi diskutovaným tématem a zároveň velkým strašákem mezi všemi včelaři. Mor včelího plodu je totiž jednou z nejzávažnějších chorob včelstev známé dnes již po celém světě. Jeho původcem je mikroskopická sporulující grampozitivní bakterie zvaná *Paenibacillus larvae*, která se množí pouze v trávicím traktu včelí larvy. Mimo tělo larvy přečkává v podobě spor (Obrázek 1). Spory této bakterie jsou však díky devíti ochranným vrstvám neskutečně odolné a boj s nimi je téměř beznadějný. Choroba plodu včely medonosné – mor včelího plodu – je definována jako přítomnost původce onemocnění (*P. larvae*) a zároveň přítomnost klinických příznaků [1], [3], [19].

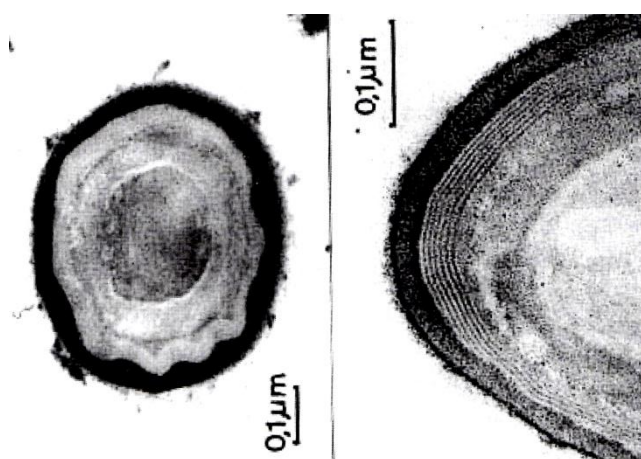
Bakterie se do úlu zdravého včelstva běžně dostane tak, že včely najdou ve svém okolí prázdný úl se zbytky zásob včelstva, které vyhynulo v důsledku propuknutí moru včelího plodu. Včely z okolních úlů zbytky zásob, ve kterých jsou spory *Paenibacillus larvae* vyberou a přinesou si je tak do svého doposud zdravého úlu. Těmito zásobami jsou poté krmeny včelí larvy. Nakažené larvy uhynou, rozpadnou se na kašovitou zapáchající hmotu, která v buňkách plástve zaschne a vznikne takzvaný příškvár. Dělnice rozpoznají špatnou buňku, odstraní a vyčistí ji. Dělnice tak samy sice neonemocní morem včelího plodu, ale roznesou spory po celém úlu. Tím propukne nákaza v dalším úlu. Včelstvu se přestanou líhnout mladušky, zeslábne a uhyne. Zásoby tohoto včelstva vyberou včelstva z okolí a tak se nákaza stále šíří dál [3], [23].

Existuje však mnoho kroků a postupů, které se včelařům doporučují jako vhodná prevence proti šíření či propuknutí moru včelího plodu. Imunitní systém včely je schopen bojovat s malým množstvím bakterií, ale pokud je množství spor vyšší, než je organizmus včely schopen snést, propuká nákaza a bakterie se začnou masově množit. Proto je vhodné podporovat imunitní systém včel a udržovat včelstva silná a všeobecně zdravá, jelikož i ostatní nemoci podněcují propuknutí moru (varroáza, nose móza, různá houbová onemocnění a další) [24].

Silná včelstva udržují například mladé a silné matky (včelař však musí mít přehled ohledně stáří matky a musí ji umět vyměnit). Dále lze silné včelstvo udržet zajištěním kvalitní přirozené potravy, jelikož pyl je pro včely zdrojem bílkovin a nelze ho nahradit. Pyl tak přímo podporuje imunitu včel. Důležité je také situovat úl do míst, kde je velké množství druhů rostlin. Tím je zamezeno tzv. monodietě a je tak podporován imunitní systém včely. Vhodné je také na zimu, kdy se včely dokrmují (po vytočení medu) cukrem,

nechat včelám alespoň trochu vlastního medu, jelikož obsahuje látky, které samotný cukr, jako náhražka medu, postrádá. Včelstva by se také měla vyvarovat působení stresových faktorů, jako je například kočování, ztráta matky či situování většího počtu úlů na malém prostoru. Jedním z důležitých faktorů je také všeobecné dodržování hygieny včelaře – nepoužívá infikované nástroje, atd. [6], [24].

Mor včelího plodu se však dnes nedá nijak aktivně léčit. Byť existují antibiotika, která vegetativní formu *Paenibacillus larvae* ničí, jejich použití je z hygienických důvodů zakázáno a navíc na spory nemají žádný vliv. Moru se lze tedy zbavit pouze radikální metodou – spálením nakažených včelstev, úlů a kontaminovaného materiálu [3], [15].



Obrázek 1 – Řez sporou *Paenibacillus larvae* (elektronový mikroskop, foto J. Ludvík); Titěra, 2009

1.1 Postup Státní veterinární správy ČR v otázce moru včelího plodu

Jedinou možností, jak lze dnes jednoznačně vyloučit, nebo prokázat přítomnost spor bakterie *Paenibacillus larvae* ve včelstvu, je vyšetření voskové měli, které provádí specializované laboratoře pověřené a oprávněné k provádění těchto rozborů Státní veterinární správou ČR. Jeho nevýhodou je náročnost na vybavení laboratoře a náročnost samotné laboratorní práce se vzorky biologického materiálu, ze kterého je infekční tlak moru včelího plodu stanovován. Nevýhodou je také vysoká cena převyšující pět set korun za jeden rozbor (z důvodu náročnosti práce a vybavení laboratoří). Přestože včelař náklady vynaložené za tato laboratorní vyšetření nehradí, měla by nás cena zajímat. Další nevýhodou je fakt, že touto metodou lze určit pouze stav ve všech včelstvech daného včelaře dohromady (max. však 10 včelstev dohromady). Nelze proto určit stav moru včelího plodu pro každé včelstvo zvlášť (resp. lze, ale cena by byla ještě mnohonásobně vyšší) [4], [18].

Včelař by si měl ve svém zájmu samostatně kontrolovat, jaký je stav nákazy moru včelího plodu v jeho včelstvu. Tuto kontrolu včelař nejspíše provede tak, že si nechá vyšetřit vzorky voskové měli z jeho úlů (vyšetření se dá provést i ze vzorků medu, vosku či pylu, ale použití vzorků měli se ukázalo jako nejvhodnější). Měl je tvořena hlavně voskovými částicemi pocházejícími z víček plodových i zásobních buněk [6]. Včelaři v České republice jsou i ze zákona povinni jednou ročně voskovou měl odebírat a zasílat ji na vyšetření do specializovaných laboratoří. Pokud je laboratoří prokázána přítomnost původce moru včelího plodu, je tento výsledek oznámen Krajské veterinární správě ČR (dále jen KVS ČR). Ta dále postupuje dle zákona č. 166/1999 S., o veterinární péči (dále jen „veterinární zákon“) a vydá předběžná opatření. Poté se pracovníci KVS ČR vydají do terénu a úly podezřelé z propuknutí moru včelího plodu prohlédnou a odeberou vzorky k dalším rozborům (plodové plásty s příškvary, měl,...). Tím je provedeno klinické vyšetření na stanovišti v souladu s § 13 a § 49 odst. 1 písm. c) a d) veterinárního zákona. Včelstvo, u kterého mor včelího plodu již propukl, je nápadné svým zápachem po zatuchlině, či klihu. Dále je nařízen zákaz přemísťování včelstev a úlů, prodej včelích produktů a objekt je uzavřen a opatřen výstražnou tabulkou. Včelař je také poučen o naze, která v jeho včelstvech propukla, o boji proti ní a o následujících krocích k zamezení šíření této nazy. Na stanovišti je inspektorem KVS ČR se včelařem sepsán protokol, který obsahuje základní informace o nakažených včelstvech (číslo, množství,...) a jejich majiteli (jméno, datum narození, podpis,...). KVS ČR pak po laboratorním potvrzení klinického stadia choroby vydá mimořádné opatření v souladu s § 15 odst. 1 a § 54 odst. 1 písm. a), odst. 2 písm. a) a odst. 3 a § 76 odst. 3 veterinárního zákona a vymezí ochranné pásmo o velikosti 5km. Včelaři v pásmu jsou KVS ČR o nastalém stavu informováni. Mimo jiné jim je zakázáno přemísťování včelstev (ven i do pásma) a doporučena větší pozornost ohledně moru včelího plodu [18].

Pokud je u včelstva po prohlídce a laboratorním vyšetření prokázáno klinické propuknutí nemoci u 15 a více procent včelstev na stanovišti, je bezpodmínečně nutná likvidace všech včelstev na stanovišti a utracení včel. Včelstvo, úly, med a další produkty, plástve a veškeré ostatní spalitelné pomůcky a nástroje, které byly používány k manipulaci se včelami a jejich produkty jsou pak spáleny (Obrázek 2), aby se zamezilo šíření moru mezi zdravá včelstva. Předměty, které lze účinně dezinfikovat (kovové předměty) lze včelaři ponechat. Budovy, kočovné vozy a konstrukce včelínů dezinfikovat nelze a musí být také spáleny. Včelstva jsou den předem utracena včelařem za použití benzínu. Utracení

probíhá v brzkých ranních, nebo naopak pozdních večerních hodinách, kdy jsou včely v úlu a nelétají. Pálení a dezinfekce půdy pod a před včelínem je následující den provedena za přítomnosti likvidační komise, která je předem určena KVS ČR. Ta pořídí záznam, který včelaři slouží jako potvrzení, či důkaz o likvidaci včelstev a materiálu. Chovatel si pak může na základě tohoto záznamu zažádat o dotaci na založení nové včelnice [4], [18].

V souvislosti s bojem proti této závažné nemoci je také na místě zmínit a neztratovat myšlenku Přidala (2008) [20]. Autor zde připomíná negativa utrácení a pálení včelstev. Podotýká, že pokud se budou likvidovat všechna stanoviště s pozitivním nálezem spor původce moru včelího plodu v měli, byť v jednom včelstvu, anebo v nízké koncentraci, a to bez ohledu na přítomnost klinických příznaků, vystavujeme se riziku likvidace podstatné části populace včelstev v České republice. Mikrobiální vyšetření měli totiž nelze považovat za diagnostiku v pravém slova smyslu, ale pouze jen za monitoring infekčního tlaku z okolí, která je vhodná pro dohledávání ohnisek zdroje infekce a jako varování pro daného chovatele. Hlavním problémem je fakt, že po prokázání klinických příznaků u více než 15 % včelstev jsou utracena a spálena všechna včelstva na daném stanovišti. Tím se však likvidují i včelstva, která jsou schopna díky svému genetickému vybavení infekčnímu tlaku odolat. Z populace včel při tomto způsobu likvidace tak odstraňujeme i geny odolnosti proti moru. Z ekologického hlediska je takovýto boj proti moru včelího plodu absolutně nepřijatelný.

Vše poukazuje na to, že by k ekologičtějšímu boji proti moru včelího plodu napomohla metoda, která by odhalovala přítomnost spor původce choroby v úlech již v prvopočátku nákazy. Pokud by se v tento moment (kdy je odhalena přítomnost nebezpečných spor a nákaza je tak včas podchycena) začalo se včelstva vhodně pracovat, dalo by se zabránit utrácení včelstev s genetickou výbavou, díky které je dané včelstvo vůči původci moru včelího plodu odolné. Chovatelsky cenné geny by tak pálením s nakaženými včelstvy nemizely, naopak by bylo podpořeno jejich šíření.

Projekt „*Vytvoření nového způsobu a zařízení pro monitoring infekčního tlaku moru včelího plodu*“, jehož jsem spoluřešitelem, má za cíl vyvinutí nového způsobu pro monitorování infekčního tlaku moru včelího plodu, díky kterému by byl sám chovatel schopen odhalit přítomnost spor původce moru včelího plodu dříve, než se začne v úlu nebezpečně množit. Tento způsob má být jednoduchý, levný a uživatelsky dostupný pro jednotlivé včelaře. I z toho důvodu bude součástí příslušenství nové metody pro

monitoring testovací karta RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* s živným médiem a chromogenem vhodným pro detekci původce moru včelího plodu [2].



Obrázek 2 – Pálení morem napadených včelstev; foto www.vcelarikonicko.webnode.cz

1.2 Cíle práce

Práce si vzala za cíl napomoci boji proti moru včelího plodu navržením nové metody pro jednoduché monitorování stavu infekčního tlaku moru včelího plodu v jednotlivých včelstvech s využitím kultivace původce této choroby na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*. Toto zařízení má odhalit přítomnost původce moru včelího plodu již v počátcích choroby.

Jedním z hlavních cílů práce bylo zdokonalení testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* prozkoumáním několika nových typů živných medií navržených ke kultivaci *P. larvae* a porovnáním jejich vlastností (především jejich specifitu a záchytnost bakterie *P. larvae*) s vlastnostmi media MYPGPn agar (meat extract, yeast extract, dipotassium phosphate, glucose, sodium pyruvate, nalidixic acid) [14], které se dosud užívá jako nejvhodnější živné medium pro kultivaci bakterie *P. larvae* na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* [3], [10]. Cílem porovnávání vlastností nových typů živných medií tak bylo nahradit živné medium MYPGPn agar vhodnějším médiem, nebo naopak potvrdit účinnost tohoto media s ohledem na záchytnost bakterie *P. larvae* a specifitu daného media určeného pro výrobu testovacích karet RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*.

Dalším cílem práce bylo porovnat laboratorní postup při určování infekčního tlaku moru včelího plodu klasickou metodou využívající toluen, podle které postupují

specializované laboratoře Státní veterinární správy ČR, s novým laboratorním postupem, který popsal v letech 2007 – 2010 MVDr. Jaroslav Bzdil, PhD. (Oddělení speciální mikrobiologie, Státní veterinární správa Olomouc). Tato metoda využívá látku Tween 80 namísto toluenu. Cílem porovnání obou metod bylo použít vhodnější z nich jako součást metody zařízení pro jednoduché monitorování stavu infekčního tlaku moru včelího plodu.

Zajímala mě také případná přítomnost spor patogenu v půdě pod česnem nakažených včelích úlů.

1.3 Hypotézy práce

Byl formulován předpoklad na základě literárních údajů [5] a [11], že po prozkoumání a porovnání nových typů živných medií bude jedno z nich vybráno na základě specifity a míry záchytnosti bakterie *Paenibacillus larvae* a bude namísto živného media MYPGPn agar doporučeno k použití při výrobě testovacích karet RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*. Zároveň byl stanoven předpoklad, že na všech typech použitých živných medií bude identifikačními metodami prokázán záchyt spor bakterie *P. larvae*.

Také byl formulován předpoklad, že použití látky Tween 80 bude při laboratorním stanovování infekčního tlaku moru včelího výhodnější, než použití toluenu a proto bude použití Tweenu 80 doporučeno jako součást metody zařízení pro snadné a rychlé stanovování infekčního tlaku moru včelího plodu samotnými včelaři.

Byla testována hypotéza o přežívání spor *P. larvae* v půdě v blízkosti nakaženého včelstva.

1.4 Úvod do metodiky

1.4.1 Živné medium

Živné medium je pevná, rosolovitá hmota, která díky svému složení a obsahu živin vytváří ideální podmínky ke kultivaci různých bakterií, hub a jiných mikroorganismů. Každý mikroorganismu vyžaduje pro kultivaci různé specifické prostředí a živiny, proto dnes existuje nespočet různých variant živných medií, která se různě upravují a vylepšují v závislosti na potřebách kultivace mikroorganismů z prostředí.

Živná media lze upravovat přidáváním různých složek a příměsí. Zpravidla je živné medium připraveno v kapalném skupenství, dále je vysokými teplotami sterilizováno a následně rozléváno na Petriho misky, na kterých díky přítomnosti agaru zrosolovává do

pevného skupenství. Agar je přírodní polysacharid. Jeho gelujících vlastností se využívá v potravinářství, kde slouží jako především jako zahušťovadlo. V 19. století ho začal využívat slavný německý mikrobiolog Robert Koch. Dnes je agar základní složkou většiny existujících živných medií.

V mikrobiologické praxi se však velmi často využívá tzv. selektivní medium. Selektivní živná media, kterými se tato práce zabývá, mají zpravidla velmi specifické složení. Jejich podstatou je totiž kultivace a izolace pouze sledovaného druhu mikroba a eliminace ostatních nežádoucích mikroorganismů. Složkou selektivních medií je často některé antibiotikum, nebo i jejich směs.

Při porovnávání živných medií lze sledovat mnoho znaků a vlastností, které živná media vykazují. Při pokusech se živnými medii byla v této práci sledována a porovnávána především záchytnost původce moru včelího plodu – *Paenibacillus larvae*, dále složení a specifita (jaké druhy bakterií lze na daném typu živného media kultivovat) a samozřejmě cena takového media.

Ve spolupráci s firmou LabMediaServis s. r. o. (Jaroměř) byla porovnána živná selektivní media, která byla nově navržena pro výrobu testovacích karet RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*. Media byla pracovně nazvána jako XY agar, CSA agar a PLA agar. U těchto tří živných medií byla experimentálně stanovena záchytnost bakterie *P. larvae* a porovnána se záchytností media MYPGPn agar. Záchytnost těchto medií byla porovnána se záchytností medií odvozených od MYPGPn agar: MYPGPnp agar a MYPGP agar. Záchytnost všech výše zmíněných živných medií byla nakonec porovnána se dvěma živnými medii typu MYPGPn agar s prošlými daty expirace (6 – 10 měsíců). Srovnávací pokusy popsané v práci tak prozkoumaly i vliv data spotřeby media na kvalitu a vlastnosti živného media. Výroba a složení použitých živných medií je dále popsána v kapitole 2.1.

V minulosti byla již obdobně testována nově navržená živná media typu FYPGP agar (obsahující rybí extrakt namísto hovězího extraktu) a Muller-Hinton agar (obsahující složku Mueller-Hinton broth namísto hovězího extraktu, kaseinového hydrolyzátu a rozpustného škrobu). Přestože byl na obou těchto typech živných medií prokázán nárůst kolonií bakterie *P. larvae*, media nevykazovala lepší specifitu ani vyšší záchytnost bakterie v porovnání s mediem MYPGPn agar [3].

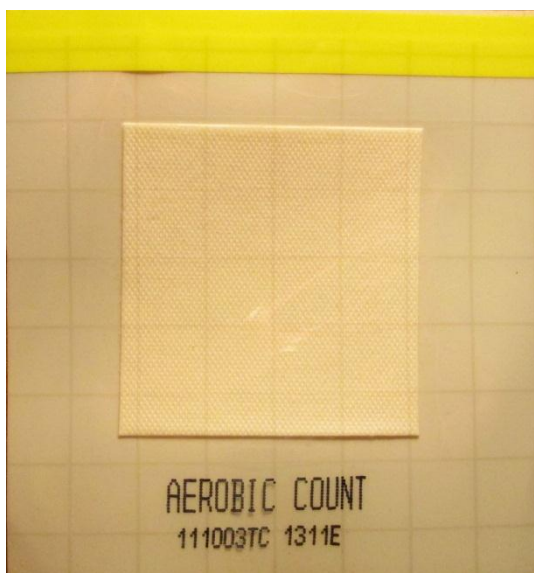
1.4.2 Testovací karta RIDA®COUNT

Testovací karta RIDA®COUNT (R-BIOPHARM, Německo; Obrázek 3) je produkt vyráběný od roku 2003 s cílem rychlé detekce přítomnosti nežádoucích mikroorganismů z hygienického hlediska (např. *Salmonella enterica*, původce salmonelózy) na pracovištích, kde je potřeba dbát na dostatečnou čistotu a sterilitu prostředí (např. jídelny, potravinářské provozy).

Testovací karta je vyrobena z měkkého plastu o rozměrech asi 8 x 8 cm a opatřena čtvercovou textilní podložkou o rozměrech asi 4,5 x 4,5 cm tvořící detekční vrstvu. Karta je překryta krycí vrstvou z průhledného plastu, což umožňuje odečtení vykultivovaných kolonií na testovací kartě přes krycí vrstvu. Detekční vrstva je napuštěna konkrétním živným médiem pro kultivaci cílové bakterie a chromogenem TTC (2,3,5 – trifenylnitrotetrazolium chlorid), který vykultivované kolonie bakterií barevně zviditelní.

Testovací karta musí být před použitím aktivována 1 ml fyziologického roztoku. Poté je karta otisknuta na sledovaném povrchu, nebo je vystavena spadu atd. Také může být testovací karta naočkována 1 ml inokula. Po inokulaci je testovací karta kultivována v příslušných podmínkách po určitou dobu. Po kultivaci jsou odečítány výsledky [10].

Důvod, proč je nutné sledovat složení živného media určeného pro výrobu testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*, je ten, že karty RIDA®COUNT jsou vyráběny v Japonsku, kde je kvůli obavám z nemoci šílených krav (BSE) ze zákona zakázáno používat hovězí extrakt (masokostní moučku) k jakýmkoliv účelům. Tato surovina je však součástí živného media MYPGPn agar, které se dnes používá pro klasické mikrobiologické vyšetření měli na přítomnost spor *P. larvae* v úle. Přestože se tyto karty již mohly díky speciálním povolením v Japonsku vyrobit právě s médiem MYPGPn agar, bylo by vhodnější toto medium nahradit médiem, které by obsahovalo místo hovězího extraktu jinou (vhodnější) surovinu, kterou lze v Japonsku k výrobě karet legálně použít (např. žloutek, beraní krev a jiné).



Obrázek 3 – Testovací karta RIDA®COUNT; foto D. Štipl

1.4.3 Odběr vzorků voskové měli

Odebrání voskové měli z úlu a odeslání těchto vzorků k vyšetření je jednou ročně povinností každého včelaře v České republice. Primárně je sledována přítomnost roztoče *Varroa destructor* (původce varroázy) a bakterie *Paenibacillus larvae*. Vyšetřením měli ve specializované laboratoři lze pak mimo jiné stanovit i infekční tlak moru včelího plodu. K vyšetření na přítomnost *P. larvae* je potřeba minimálně 1 gram měli.

Měl je odebírána zpravidla v zimě, kdy včely nečistí dno úlu a odběr měli je tak snazší. Může ale být odebírána kdykoliv v průběhu roku. Vosková měl odebraná v zimním ročním období je však vlhká a snadno podléhá plísním. Proto se doporučuje měl skladovat a odesílat do laboratoří v papírových tubusech uzavíratelných těsnými zátkami, které sají vlhkost a snižují tak riziko zplsnivění měli a smíchání měli s jinými vzorky [1]. Z mé vlastní zkušenosti také vím, že je zimní a jarní měl čistější, a je proto snáze zpracovatelná.

V létě, kdy včely dno úlu průběžně čistí, se k odběru měli používají speciální síťové podložky vyráběné právě pro tento účel Výzkumným ústavem včelařským v Dole u Prahy. Podložka je vystavena spadu měli v podmetu na dně úlu tak dlouho, dokud v ní není zachyceno požadované množství měli (může trvat i několik dní až týdnů). Bezprostředně po odběru pak včelař tuto podložku vloží do papírové obálky, řádně ji označí, aby nedošlo k záměně vzorků, a odešle ji na rozbor. Čím déle totiž proces odběru a odeslání měli trvá, tím více roste riziko zplsnivění měli, či znehodnocení obsahu obálky housenkami zavíječe voskového – *Galleria mellonella*, atd. [6], [12].

Obálky jsou následně v laboratoři rozbaleny, z podložky je odejmuta plastová síťka a po odstranění nečistot (např. mrtvá těla včel, larvy zavíječe voskového, drobné větvičky,...) je měl odebírána do zkumavek k dalšímu zpracování (Obrázek 4).

Vzorky měli jsem pro svou práci odebíral ve spolupráci s Mgr. Štěpánem Rybou, PhD. Vzorky měli v papírových obálkách jsem přemístil do plastových uzavíratelných zkumavek (tzv. Falcon tube) v létě roku 2013. Celkem bylo sesbíráno 155 vzorků měli z devatenácti včelařských stanovišť v Jihočeském kraji. Část vzorků byla odebrána v oblastech, kde byl již v té době (jaro 2013) Státní veterinární správou ČR stanoven mor a bylo vytyčeno morové pásmo. Další část vzorků byla odebrána z tzv. kontrolovaných stanovišť, kde nebyl stanoven mor, ani nebylo vytyčeno morové pásmo.



Obrázek 4 – Zpracování odebrané voskové měli ze stanovišť; foto V. Křišťůfek

1.4.4 Metody přípravy inokula za použití Tweenu 80 a toluenu

Zásadní rozdíl mezi „toluenovou metodou“, kterou používá pro přípravu inokula z měli Státní veterinární správa ČR a „tweenovou metodou“ popsanou Bzdilem (2007) v disertační práci „*Nové metody v diagnostice moru včelího plodu*“, je v použití látky k rozpuštění vosku a následnému uvolnění spor původce moru včelího plodu.

Toluenová metoda používá k rozpuštění vosku a přípravě inokula toluen. Toluén je čiré, organické, těkavé rozpouštědlo, které je agresivitou svých par zdraví škodlivé. Metoda MVDr. Jaroslava Bzdila, kterou lze z voskové měli připravit inokulum pro očkování živného media na Petriho miskách, využívá rozpouštěcích vlastností látky Tween 80. Tween 80 je chemicky polyoxyethylensorbitanmonooleát. V praxi se používá jako aditivum s charakterem emulgátoru, disperzního činidla či stabilizátoru. Tween 80 bývá také označován zkratkou E433 [8].

V práci byla porovnána účinnost obou metod, aby byla vhodnější z nich použita jako součást nově vyvíjeného zařízení pro monitorování stavu infekčního tlaku moru včelího plodu v jednotlivých včelstvech. Přitom byla sledována náročnost a složitost obou metod jak z praktického, tak z časového a hygienického hlediska.

Inokula získaná toluenovou a tweenovou metodou byla také použita pro testování živných medií navržených pro kultivaci bakterie *Paenibacillus larvae* a pro výrobu testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*.

1.4.5 Izolace a identifikace bakterií

Pro verifikaci výsledků bylo potřeba bakterie vykultivované na Petriho miskách s živnými medii identifikovat a ověřit jejich rod, popřípadě druh. Identifikace byla provedena metodou hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem na principu MALDI – TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spektrometry; dále jen MALDI – TOF MS), barvením preparátu dle Grama a následným mikroskopováním a částečně také peroxidovým testem na přítomnost katalázy.

K úspěšné identifikaci metodou MALDI – TOF MS a metodou barvení preparátu dle Grama je potřeba pracovat s bakteriálními koloniemi pouze jednoho jediného rodu. Na původní Petriho misce se však mohou jednotlivé bakteriální kolonie různého rodu překrývat a znemožňovat tak možnost identifikace těmito metodami. Z toho důvodu bylo nutné kolonie, které byly určeny k identifikaci, izolovat na samostatnou nepoužitou Petriho misku se stejným typem živného media.

Kolonie tvořené bakterií *Paenibacillus larvae* lze v první řadě od ostatních rozeznat svým charakteristickým vzhledem, tvarem, velikostí a zápachem. Z vlastní praxe to jsou mléčně průsvitné, kruhové kolonie (starší kolonie mají uprostřed žlutou tečku), které měří

v průměru asi 0,5 – 3 mm a svým zápachem připomínají čerstvě nakypřenou vlhkou půdu (Obrázek 4).

Principem peroxidového testu je odebrání bakteriální kolonie z Petriho misky sterilní kličkou na podložní sklíčko, zakapání preparátu peroxidem vodíku a sledování, zda se uvolňují bublinky kyslíku, nebo ne. Pokud preparát s peroxidem vodíku reaguje a šumí, znamená to, že bakterie tvořící danou bakteriální kolonii mají enzym katalázu, který štěpí peroxid vodíku na vodu a kyslík. Sledovaná bakterie *P. larvae* enzym katalázu postrádá a peroxidový test je tak u ní negativní (nešumí). Pozitivní katalázový test vylučuje, že je daná kolonie tvořena bakteriemi rodu *Paenibacillus* [9]. Test na přítomnost katalázy byl proto použit před izolací samostatných bakteriálních kolonií určených k identifikaci metodou MALDI – TOF MS a Gramovo barvením s následným mikroskopováním. Kolonie s negativním peroxidovým testem byly izolovány s předpokladem, že se jedná o kolonie tvořené bakteriemi rodu *Paenibacillus*.

Abych se ujistil, že narostlé kolonie bakterií na Petriho miskách jsou grampozitivní bakterie tyčinkového tvaru, jako je i vegetativní stadium bakterie *Paenibacillus larvae*, byly bakterie podrobeny klasické metodě barvení preparátu dle Grama a získané vzorky byly mikroskopovány. Gramovo barvení je jedno ze základních barvení preparátu v mikrobiologii, které umožňuje rozlišit mikroby, které se barví pozitivně – G⁺ (získávají tmavě modrou/fialovou barvu), negativně – G⁻ (získávají červenou barvu), částečně (tzv. gramlabilní bakterie mající přechodné nebo neurčité zbarvení), nebo se nebarví vůbec (tzv. nebarvitelné bakterie) z důvodu obsahu vysokého procenta mastných kyselin ve své buněčné stěně.

Pro bezpečnou identifikaci izolovaných bakterií byla zvolena metoda MALDI – TOF MS (Autoflex speed, Bruker Daltonics; Obrázek 5). Hlavním důvodem zavedení této metody do praxe byla jednoduchost a rychlost detekce bakterií, které mohly být potenciálně použity jako biologická zbraň (např. *Francisella tularensis* nebo *Bacillus anthracis*) [22].

Tato technika spočívá v extrakci a následné analýze proteinů získaných z vykultivovaných bakteriálních kolonií. Každá bakterie je totiž tvořena jiným a pro ni charakteristickým souborem proteinů. Během analýzy MALDI – TOF MS jsou ze vzorků bakterií proteiny extrahovány a za účasti laseru a matrice dochází k jejich vypaření a ionizaci. Ionty dále prolétají analyzátozem různou rychlostí, která je přímo úměrná jejich hmotnosti a v daném čase dopadají na detektor. Na základě množství, rychlosti a času

dopadu analytu jsou tak získána spektra, která jsou pro každý bakteriální druh jedinečná (stejně tak jedinečná, jako je jejich proteinové složení). Na základě porovnání získaných spekter se spektry, která jsou zaznamenána v databázi softwaru přístroje, lze určit rod (popř. i druh) neznámého vzorku bakteriálních kolonií a tyto bakterie tak identifikovat [22].



Obrázek 5 – Část Petriho misky, na níž je samostatná kolonie *Paenibacillus larvae* získaná izolací;
foto D. Štipl



Obrázek 6 – Příklad přístroje Autoflex speed (vpravo náhled do otevřeného přístroje) pracující na principu MALDI – TOF MS (VŠCHT Praha); foto D. Štipl

2 MATERIÁL A METODY

Výroba a složení všech použitých typů živných medií je uvedeno v kapitole 2.1. V kapitole 2.2 je popsán postup při odběru voskové měli ze stanovišť v Jihočeském kraji, jejich zpracování a získání inokula odlišnými metodami za pomoci Tweenu 80 a toluenu, inokulace na různé typy porovnávaných živných medií a testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* a následná kultivace. V kapitole 2.3 byla detailně popsána identifikace vykultivovaných bakteriálních kolonií, která slouží jako důkaz o zachycení právě bakterie *P. larvae*. Kapitola 2.4 popisuje pokus, kde byla sledována přítomnost *P. larvae* v půdě. Kapitola 2.5 pojednává o nejdůležitějším výsledku, a to navržení a otestování zařízení pro jednoduché monitorování infekčního tlaku moru včelího plodu ve včelím úle.

2.1 Složení a příprava použitých typů živných medií určených pro kultivaci *Paenibacillus larvae*

2.1.1 Živná media MYPGP agar, MYPGPn agar a MYPGPnp agar

Živné medium MYPGP agar (Obrázek 7) je dnes nejčastěji používaným typem kultivačního média pro kultivaci původce moru včelího plodu – *Paenibacillus larvae*. Jeho varianta s kyselinou nalidixovou je používána pro výrobu testovacích karet RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* [3], [7], [9], [14].

V 1 litru destilované vody bylo nejprve rozpuštěno 15 g kvasničného autolyzátu, 3 g K_2HPO_4 a 1 g pyrohroznanu sodného. Dále bylo přidáno 3,5 g hovězího extraktu, 6 g kaseinového hydrolyzátu, 0,5 g rozpustného škrobu a 12 g agaru. Takto připravený roztok, jehož pH bylo upraveno několika kapkami 10% kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 7,3, byl důkladně promíchán a sterilizován v autoklávu, kde byl ponechán při teplotě 121 °C po dobu 50 minut. Následně byla směs opět (co možná nejrychleji, aby nedošlo ke znehodnocení směsi) ochlazena. Poté byly do směsi přes bakteriální filtr přidány 2 g glukózy, která byla předem dokonale rozpuštěna v 5 ml destilované vody. Dále jsou do medií MYPGPn agar a MYPGPnp agar přidána antibiotika. Napřed byly připraveny zásobní roztoky s antibiotiky: 0,03 g kyseliny nalidixové bylo rozpuštěno ve 2 ml NaOH (0,1 M) a zředěno ve 100 ml fosfátového pufru (pH 7,2); 0,06 g kyseliny pipemidové bylo rozpuštěno ve 2 ml NaOH (0,1 M) a zředěno ve 100 ml fosfátového pufru

(pH 7,2). Z obou takto připravených zásobních roztoků byly k připravovaným mediím přidány přes bakteriální filtr (sterilizace) 3 ml kyseliny nalidixové (MYPGPn agar) a také 3 ml kyseliny pipemidové (MYPGPnp agar).

Takto připravená tekutá media byla pod tlakem rozlévána na Petriho misky v množství 20 ml na jednu misku, kde díky přítomnosti agaru, obsaženého v mediích, tuhnou. Po dokonalém ztuhnutí media jsou Petriho misky baleny do plastového obalu.

Série živných medií typu MYPGPn agar se starým datem expirace, která byla použita při srovnávacím pokusu, který probíhal od 28. 2. 2014 do 10. 3. 2014, měla datum expirace stanoveno k 9. 11. 2013 (prošlé asi 3,5 měsíce). Druhá použitá série živných medií měla datum expirace stanoveno k 23. 6. 2013 (prošlé asi 8 měsíců).



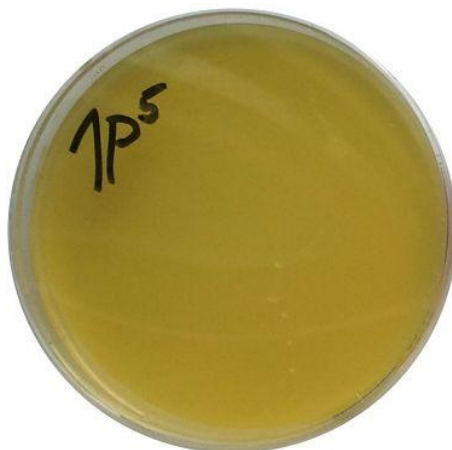
Obrázek 7 – Živné medium MYGPG/n/p agar; foto D. Štipl

2.1.2 Živné medium PLA agar

Živné medium PLA agar (*Paenibacillus larvae* agar; Obrázek 8) je (spolu s medií MYPGP agar a CSA agar) v publikaci OIE Terrestrial Manual 2008 [13] popsáno a doporučeno jako jedna z možných alternativ ke kultivaci bakterie *Paenibacillus larvae* při stanovování infekčního tlaku moru včelího plodu. Je složeno ze tří různých živných medií, která tvoří základ. K tomuto základu jsou potom přidána antibiotika (kyselina nalidixová a pipemidová) a vaječný žloutek [7].

Živné medium PLA agar je vyráběno velmi složitým způsobem. Stejná množství (100 ml) tří sterilních, zkapalněných medií *Bacillus cereus* selektivní agar (Oxoid CM617), Tryptikáza-sójový agar (TSA; Merck 5458) a SNA (doplňný živný agar; složení: živný agar (23 g/l), kvasničný extrakt (6 g/l), hovězí extrakt (3 g/l), NaCl (10 g/l) a Na₂HPO₄ (2 g/l)) byla spojena, promíchána a sterilizována po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. K této směsi byla z předem připravených zásobních roztoků přidána antibiotika kyselina

nalidixová a kyselina pipemidová (viz kapitola 2.1.1). Nakonec byl do této směsi přidán 50% roztok sterilního vaječného žloutku. Konečné pH media je $7,4 \pm 0,2$. Takto připravené živné medium PLA agar je rozléváno po 20 ml na Petriho misky [13].



Obrázek 8 – Živné medium PLA agar; foto D. Štipl

2.1.3 Živné medium CSA agar

CSA agar (Columbia sheep blood agar; Obrázek 9) je živné medium používané pro kultivaci vybraných bakterií (zejména hemolytických, gram-pozitivních). K výrobě bylo na jeden litr deionizované vody použito 12 g pankreaticky natráveného kaseinu, 5 g živočišné tkáně, 3 g kvasničného extraktu, 3 g hovězího extraktu, 1 g kukuřičného škrobu, 5 g chloridu sodného, 13,5 g agaru a 50 ml beraní defibrinované krve. Výroba media je dále obdobná, jako u media MYPGP agar. Konečné pH je $7,3 \pm 0,2$ [7], [13].



Obrázek 9 – Živné medium CSA agar; foto D. Štipl

2.1.4 Živné medium XY agar

Složení nově vyvinutého a testovaného živného media s pracovním názvem XY agar prozatím nemůže být zveřejněno z důvodu probíhajícího podání patentové přihlášky.

2.2 Porovnání pracovního postupu pro stanovení infekčního tlaku moru včelího plodu toluenovou, tweenovou a kartovou metodou

2.2.1 Zpracování voskové měli klasickou toluenovou metodou

Vzorky voskové měli byly zpracovány klasickou toluenovou metodou vycházející z Doporučených diagnostických technik O. I. E. [13], kterou dnes používají i specializované laboratoře v České republice ke stanovení infekčního tlaku moru včelího plodu. Dle tohoto standardního operačního postupu lze ke stanovení infekčního tlaku moru včelího plodu použít různé materiály, ve kterých lze odhalit přítomnost spor bakterie *Paenibacillus larvae*. Kultivační metodou lze stanovit *P. larvae* ve včelím medu (lze i centrifugační metodou), včelím vosku, nebo ve včelí voskové měli. *P. larvae* lze stanovit také mikroskopicky [9].

Do Falconových zkumavek byl navážen 1 g vysušené měli. Postup byl dále s každým vzorkem měli stejný. K 1 g měli bylo přidáno 10 ml toluenu a 10 ml sterilní destilované vody pomocí pipetmanu Organic Bottletop Dispenser (BRAND Dispensette®; Obrázek 10). Vzniklá hnědo-oranžová suspenze (Obrázek 11) byla poté homogenizována na přístroji TK3S (TechnoKartell) a vystavena selekčnímu tlaku tepla vložением zkumavky do vodní lázně (Obrázek 12) o teplotě 90 ± 2 °C po dobu 5 minut (měřeno uvnitř zkumavky). Po vyjmutí z vodní lázně byla suspenze opět homogenizována a ponechána 30 minut v klidu, aby se suspenze usadila. Usazením suspenze vznikly ve zkumavce tři od sebe různé části – ode dna zkumavky: vodní část (obsahující spory *P. larvae*), část obsahující pevné složky měli a nakonec část s toluenem (Obrázek 13). Když dosáhla suspenze pokojové teploty, byla nejspodnější fáze odpipetována po 0,2 ml na 3 plotny s živným médiem a rozetřena po celém povrchu misky sterilní skleněnou hokejkou. Inokulované Petriho misky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 7 dnů. Poté byl proveden odečet vykultivovaných bakterií (Obrázek 14).



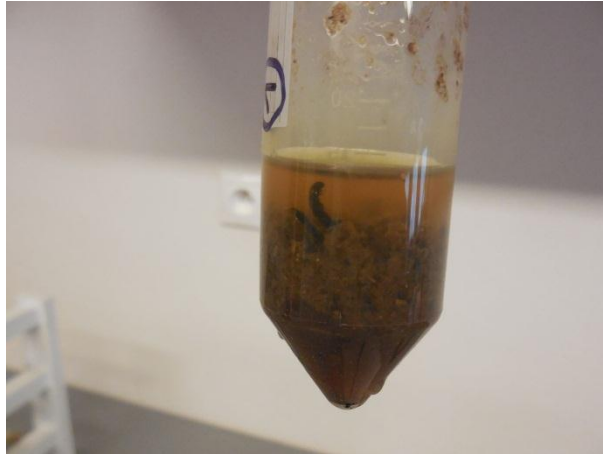
Obrázek 10 – Přidávání vody a toluenu pomocí pipetmanu; foto V. Křišťůfek



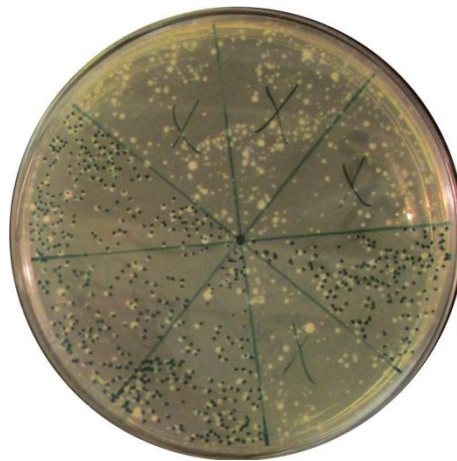
Obrázek 11 – Homogenizace suspenze; foto V. Křišťůfek



Obrázek 12 – Ošetřování suspenze ve vodní lázni; foto D. Štípl



Obrázek 13 – Části rozpuštěné měli vzniklé ve zkumavce po usazení; foto D. Štípl



Obrázek 14 – Petriho miska po odečtení množství spor *Paenibacillus larvae*; foto D. Štípl

2.2.2 Zpracování voskové měli tweenovou metodou

K přípravě inokula obsahujícího spory bakterie *Paenibacillus larvae*, potřebného k naočkování Petriho misek, byly použity dva různé zdroje těchto spor. Spory byly získány z voskové měli a z příškvaru (odumřelého těla včelí larvy zahubeného původcem moru včelího plodu). Ke kultivaci byly použity všechny typy porovnávaných živných medií, které byly popsány v kapitole 2.1.

Byla použita měl získaná z úlu v Nových Hradech, kde bylo již dříve jednoznačně prokázáno Státní veterinární správou ČR klinické stadium moru včelího plodu. Do jedné zkumavky s uzavíratelným hrdlem byly naváženy 2 g této měli. Do druhé zkumavky bylo naváženo 0,0056 g příškvaru. Do obou zkumavek bylo přidáno 17 ml sterilní destilované vody. Vzniklé suspenze byly homogenizovány [5].

Dále byl pipetou přidán do obou zkumavek 1 ml Tweenu 80 (tak byl připraven 5% roztok Tweenu 80, který je doporučen pro rozpouštění voskové měli). Pro zmenšení

viskozity bylo potřebné množství Tweenu 80 umístěno do vodní lázně o teplotě asi 70 °C po dobu 30 minut. Po rozehrání ve vodní lázni byla manipulace s Tweenem 80 pomocí pipety jednodušší [11].

Vzniklé suspenze byly opět homogenizovány a umístěny do vodní lázně o teplotě 70±2 °C po dobu 60 minut. Po uplynutí 15, 30 a 45 minut byla směs v obou zkumavkách důkladně protřepána, aby došlo k uvolnění spor usazených v drobných šupinkách vosku a v příškvaru. Směsi byly také tímto vystaveny selekčnímu tlaku tepla, při kterém byla ničena doprovodná mikroflóra obsažená ve voskové měli a v příškvaru [5].

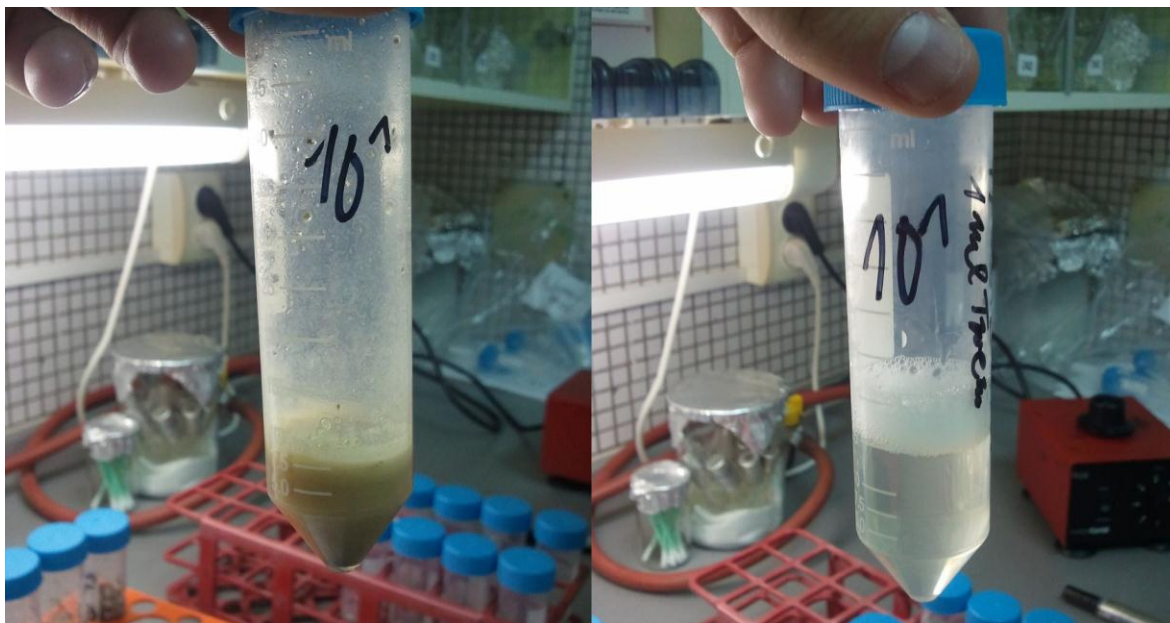
Po vyjmutí z lázně byly obě zkumavky ponechány v klidu při pokojové teplotě. Po usazení pevných částí byly ve zkumavce pozorovatelné tři od sebe různé části této suspenze. Na dně zůstaly pevné částičky s vyšší hustotou, než byla hustota prostřední (kapalné) části suspenze. Svrchní část suspenze tvořily pevné částičky o hustotě nižší, než byla hustota prostřední (kapalné) části suspenze. Prostřední část tvořila kapalina hnědošedé barvy. Ta obsahovala především vodu, Tween 80 a spory bakterie *P. larvae*.

Z důvodu nutnosti odebrání kapalné části suspenze obsahující i spory bakterie *P. larvae* byla zkumavka na následující hodinu položena do vodní lázně o teplotě asi 50 °C. Tím došlo k opětovnému rozehrání vosku a usazení částí suspenze. Prostřední (kapalná) složka byla odebrána pipetou. Odebraný výtěžek obsahující bakteriální spory byl 4 ml. K získaným 4 ml suspenze bylo přidáno stejné množství (tj. 4 ml) sterilní destilované vody a směs byla důkladně homogenizována. Druhá zkumavka obsahující příškvár byla po usazení sedimentu již homogenní (Obrázek 15). Výtěžek byl proto 100% a nemusel být dále nijak ošetřován.

Obě zkumavky byly vystaveny selekčnímu tlaku tepla vložením do vodní lázně o teplotě 90±2 °C po dobu 5 minut (měřeno uvnitř zkumavky). Poté byly obě zkumavky z lázně vyjmuty a opět byl jejich obsah pečlivě homogenizován. Po zchlazení suspenzí na pokojovou teplotu byly 2 ml z takto připravené suspenze přidány do zkumavky obsahující 18 ml sterilní destilované vody. Desítkovou ředící řadou byla připravena ředící řada v řádech 10¹, 10², 10³, 10⁴ a 10⁵. Inokulum bylo po 0,2 ml inokulováno na čtyři Petriho misky od každého typu použitého živného media (Obrázek 16). Petriho misky byly kultivovány po dobu 7 dnů při teplotě 37±1 °C. Celkem tak bylo kultivováno 272 Petriho misek.

Současně byly inokulovány i testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*. Vždy byl inokulován 1 ml od každého inokula na dvě testovací karty. Celkem tak

bylo kultivováno po dobu 7 dnů při teplotě 37 ± 1 °C 18 testovacích karet RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*.



Obrázek 15 – Inokulum v ředění 10^{-1} připravené z voskové měli (vlevo) a inokulum v ředění 10^{-1} připravené z příškvary (vpravo) tweenovou metodou; foto D. Štipl



Obrázek 16 – Inokulace suspenzí na Petriho misky – roztírání inokula skleněnou hokejkou (vlevo) a pipetování inokula (vpravo); foto D. Štipl

2.2.3 Stanovení infekčního tlaku moru včelího plodu kartovou metodou

Testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*, které obsahují živné medium MYPGPn agar, byly inokulovány stejnými inokuly, jako Petriho misky v předchozím pokusu.

Dle návodu výrobce musí být testovací karta bezprostředně před použitím aktivována nakapáním 1 ml fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl) rovnoměrně na celý povrch polštářku s živným mediem a chromogenem. Následně mají být karty obtisknuty (na povrchu, kde je sledována přítomnost bakterií) a kultivovány. V případě tohoto pokusu však karty nebyly obtisknuty, ale přímo očkovány inokulem pipetováním. Bylo však nutné dodržet pokyny výrobce ohledně aktivace karty. Karty proto byly inokulovány 1 ml inokula. Každé inokulum bylo očkováno vždy paralelně na dvě testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*. Stejně jako na Petriho misky byly použity dva typy inokula – z voskové měli a z příškvaru. Byla také zachována totožná ředící řada – 10^1 – 10^5 . Celkem tak bylo inokulováno a následně kultivováno 20 testovacích karet RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*.

2.3 Identifikace bakterií

Izolovány byly bakteriální kolonie vykultivované na každém použitém typu živného media a získané jak z příškvaru (1P – 8P), tak i z voskové měli (1M – 8M). Čísly 1 – 8 byly označeny různé typy použitých živných medií, písmeny „M“ a „P“ byl označen původ spor (M = vosková měl; P = příškvar). U media č. 7M nebyla identifikace možná, jelikož na mediu nebyly vykultivovány žádné bakteriální kolonie, které by bylo možné podrobit izolaci a následné identifikaci. Tato označení byla pro udržení přehlednosti testů použita jak při metodě MALDI – TOF MS, tak pro Gramovo barvení.

Na některých miskách byly pouhým okem pozorovatelné kontaminace (tj. necílové bakteriální kolonie jiného rodu, než *Paenibacillus*). K izolaci a identifikaci bylo určeno dohromady pět kontaminací, které byly opět označeny číslem a písmenem z jakého media a inokula pocházejí. Za toto označení byla přidána zkratka „KON“, aby bylo jasné, že se jedná o kontaminaci. Kontaminace byly rozeznány pouhým pozorováním – svým vzhledem, velikostí ani pachem se nepodobaly koloniím typickým pro bakterii *P. larvae*. Celkem bylo identifikaci podrobena dvacet bakteriálních kolonií.

2.3.1 Peroxidový test

Kolonie bakterií, které byly vybrány k izolaci a následné identifikaci metodou MALDI – TOF MS a Gramovo barvením byly nejprve prověřeny peroxidovým testem, zda neobsahují enzym katalázu. Sterilní kličkou byla vždy odebrána část kolonie a byla rozetřena na podložní skličko. Takto připravený preparát byl zalit několika kapkami 3% roztoku peroxidu vodíku. Negativní kolonie byly dále izolovány. Pozitivní nález katalázy u izolovaných kontaminací prakticky vyloučil přítomnost bakterií *Paenibacillus larvae* a potvrdil přítomnost necílové kontaminace. Metoda MALDI – TOF MS měla dále určit jejich rod a druh.

2.3.2 Izolace bakterií

Ve sterilním prostředí byla sterilní kličkou odebrána část vykultivované kolonie bakterií a ta byla dále rozetřena na Petriho misce se stejným živným médiem. Po sterilizaci kličky v plamenu kahanu byla z místa na Petriho misce, kde byla rozetřena narostlá kolonie, kličkou vytažena část rozetřené kolonie. Takovéto vytažení bakteriální kolonie bylo ještě alespoň dvakrát zopakováno. Výsledkem byla izolace (osamostatnění) jednotlivých kolonií bakterií díky rozetření a rozředění kolonií získaných z původní Petriho misky.

Po izolaci byly Petriho misky dále kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 ± 1 °C po dobu minimálně 2 dnů (izolována jsou totiž vyklíčená vegetativní stadia bakterií a ne jejich spory – není proto potřeba čekat, až spory vyklíčí a vegetativní stadia se začnou množit. Proto je nárůst kolonií o několik dní rychlejší). Vzniklé samostatné kolonie pak mohou být dále použity k identifikaci bakterií tvořících tyto kolonie.

2.3.3 Identifikační metoda MALDI – TOF MS

Identifikace metodou MALDI – TOF MS byla provedena celkem u dvaceti izolovaných bakteriálních kolonií. Osm kolonií bylo původem ze spor z příškvaru, sedm kolonií původem ze spor z voskové měli, tři kolonie představovaly kontaminaci původem ze spor z příškvaru a dvě kontaminaci původem ze spor z voskové měli.

K identifikaci byla nejprve použita nejjednodušší metoda – tzv. metoda přímého přenosu mikroorganismů. Vzorky izolovaných bakterií byly nejprve špičkou sterilní plastové násady od mikropipety Eppendorf naneseny ve dvou paralelách na ocelovou

identifikační destičku (Obrázek 17). Tyto paralelní vzorky se lišily pouze množstvím nanesené kolonie bakterií. Na první pole identifikační destičky byla nanesena většina hmoty, která byla nabrána špičkou z Petriho misky. Na druhé pole byl nanesen zbytek hmoty, který na špičce zbyl. Na první dvě pozice na identifikační destičce byl též nanesen vždy 1 μ l komerčně dostupného kalibračního standardu Bruker bacterial test standard (Bruker Daltonics). Po vysušení byly jak vzorky, tak standard převrstven 1 μ l HCCA matrice, tedy roztoku α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny rozpuštěné o koncentraci 10 mg/ml ve směsi 50% acetonitrilu a 2,5% kyseliny trifluoroctové. Po převrstvení byly vzorky i standard ponechány vykrytalizovat při pokojové teplotě.

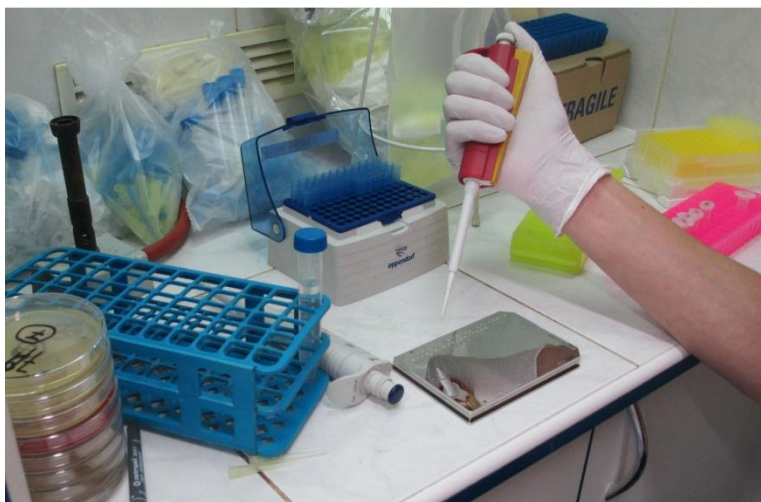
Pro dosažení kvalitnějších výsledků byly vzorky bakterií, které se nepodařilo výše popsanou metodou jednoznačně a dostatečně kvalitně identifikovat, podrobeny kvalitnější přípravě před nanesením na identifikační destičku a převrstvením matricí. Tyto vzorky byly zpracovány dvěma metodami, jejichž principem je získat proteinový extrakt jednotlivých bakterií.

První metodou byla extrakce pomocí kyseliny trifluoroctové (TFA), která je doporučována použít v případě sporulujících mikroorganismů, u kterých selhala metoda přímého přenosu. Z Petriho misky bylo do plastových mikrozkušavek (Obrázek 18) přeneseno 5 – 10 mg kultury bakterií, které se nepodařilo identifikovat metodou přímého přenosu (tj. vzorky č. 7P, 8P, 3P_KON, 2M, 4M, 5M, 6M a 8M). Do těchto osmi zkumavek s biologickým materiálem bylo pipetou přidáno 50 μ l 80% roztoku TFA a opakovaným nasáváním a vypouštěním pipetou byla vzniklá suspenze dokonale promíchána a rozpuštěna. Zkušavky s takto vzniklými suspenzemi byly dále inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 30 minut (Thermomixer comfort; Eppendorf; Obrázek 19). Poté bylo do každé zkušavky přidáno 150 μ l destilované vody a 200 μ l 100% acetonitrilu. Takto připravené suspenze byly opět homogenizovány a následně centrifugovány ((MiniSpin®with GB plug; Eppendorf; Obrázek 20) po dobu 2 minut při otáčkách 13 400 rpm. 1 μ l supernatantu od každého z osmi vzorků byl dvakrát vedle sebe nanesen na identifikační destičku. Ihned po zaschnutí byly vzorky překryty 1 μ l roztoku matrice. Po zaschnutí matrice byla identifikační destička připravena k analýze.

Druhou metodou byla extrakce pomocí etanolu a kyseliny mravenčí (FA), která je doporučována použít k identifikaci nesporelujících mikroorganismů, u kterých selhala metoda přímého přenosu. Nejprve bylo do plastových mikrozkušavek napipetováno 300 μ l destilované vody. Špičkou byl poté do každé z nich přenesen příslušný vzorek

bakteriálních kolonií o hmotnosti 5 – 10 mg. Dále bylo přidáno 900 µl etanolu a suspenze byla vždy důkladně promíchána. Následně byly suspenze centrifugovány po dobu 2 minut při otáčkách 13 400 rpm. Po vyjmutí a slití supernatantu byly mikrozkušavky znovu centrifugovány po dobu 2 minut při otáčkách 13 400 rpm a poté byl opatrně odpipetován zbytek etanolu. Zbýlý pelet byl ponechán několik minut při laboratorní teplotě, aby vyschl a dále bylo přidáno asi 50 µl 70% roztoku kyseliny mravenčí a suspenze byla homogenizována. Dále bylo ke směsi přidáno stejné množství acetonitrilu, jako bylo kyseliny mravenčí v předchozím kroku (množství chemikálií závisí na množství biologického materiálu). Suspenze byla opět centrifugována po dobu 2 minut při otáčkách 13 400 rpm. Nakonec byl na ocelovou identifikační destičku dvakrát vedle sebe nakapán 1 µl získaného supernatantu od každého vzorku. Ihned po zaschnutí supernatantu byly vzorky překryty 1 µl roztoku matrice. Po zaschnutí matrice byla identifikační destička připravena k analýze.

Identifikace mikroorganismů byla provedena na hmotnostním spektrometru Autoflex speed na principu MALDI – TOF MS (Bruker Daltonics) na Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha pod vedením Ing. Petry Junkové. Spektra byla měřena prostřednictvím programu Flex Control 3.4 (Bruker Daltonics; Obrázek 21) automaticky v lineárním pozitivním módu v hmotnostním rozmezí 2 000 – 20 000 m/z metodou MBT-FC s parametry nastavenými výrobcem (napětí iontového zdroje 1 – 20 kV, napětí iontového zdroje 2 – 19 kV, napětí na čočkách – 7 kV). Výsledné hmotnostní spektrum bylo pro každý vzorek vytvořeno sumarizací jednotlivých spekter získaných na deseti náhodně zvolených pozicích vzorku po 200 úderech laseru. Vlastní identifikace bakterií byla zajištěna programy MALDI Biotyper Realtime Classification a MALDI Biotyper™ 3.1 (Bruker Daltonics).



Obrázek 17 – Příprava identifikační destičky; foto P. Junková



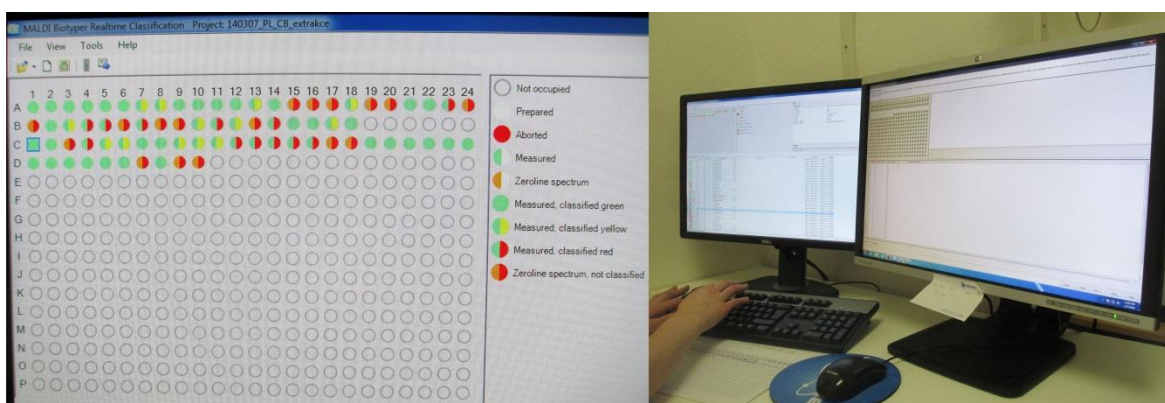
Obrázek 18 – Mikrozkušavky (Eppendorf) se zkoumanou bakteriální kulturou; foto D. Štípl



Obrázek 19 – Thermomixer comfort (Eppendorf); foto D. Štípl



Obrázek 20 – Centrifuga MiniSpin®with GB plug (Eppendorf); foto D. Štipl



Obrázek 21 – Měření spekter a samotná identifikace bakterií; foto D. Štipl

2.3.4 Identifikační metoda barvení preparátu dle Grama

Nejprve byl připraven fixovaný preparát. Na sterilní podložní sklíčko byla nanášena tenká vrstva suspenze vykultivovaných bakterií rozmíchaných ve fyziologickém roztoku. Takto ošetřené podložní sklíčko bylo na krátkou chvíli žiháno v plamenu kahanu.

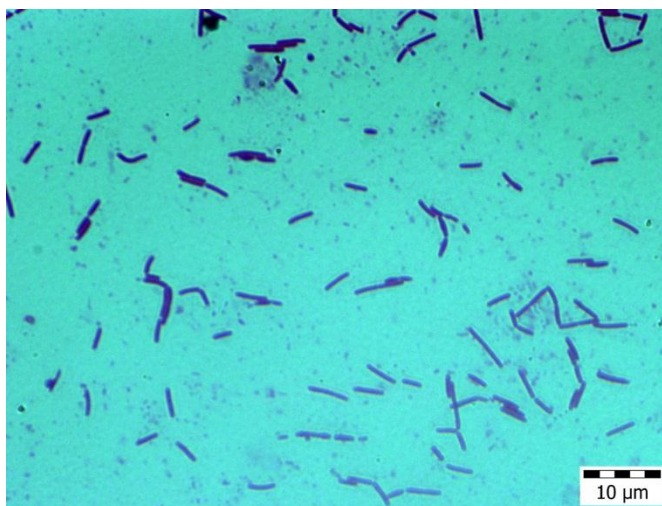
K samotnému barvení dle Grama bylo potřeba použít krystalovou violet, Lugolův roztok, odbarvovací roztok (aceton s lihobenzinem v poměru 1:5) a karbofuchsin (ředěný destilovanou vodou v poměru 1:10) [17].

Fixovaný preparát byl převrstven na 20 vteřin nejprve krystalovou violetí. Poté bylo barvivo slito a sklíčko bylo přelito na 20 vteřin Lugolovým roztokem. Následně byl Lugolův roztok slit a preparát byl dále převrstven na 25 vteřin pro odbarvení odbarvovacím roztokem. Fixovaný preparát byl dále opláchnut tekoucí vodou a dobarven přelitím zředěného roztoku karbofuchsinu asi na 45 vteřin. Nakonec byl preparát opět

opláchnut tekoucí vodou a byl ponechán, dokud volně neoschl. Takto ošetřený preparát byl připraven k mikroskopování a následnému vyhodnocení [17].

Takovýmto způsobem byly připraveny preparáty z izolovaných kolonií původem jak z příškvary, tak z voskové měli, vykultivované na všech typech použitých živných medií. Vzorky byly opět řádně pojmenovány a očíslovány.

Obarvené vzorky byly prozkoumány (Obrázek 22) ve zvětšení 1 000x pod mikroskopem (Olympus BX). Celkem tak bylo identifikaci Gramovo barvením podrobena 15 bakteriálních kolonií.



Obrázek 22 – Gramovo barvení bakteriálních buněk *Paenibacillus larvae* při zvětšení 1 000x; foto D. Štípl

2.4 Stanovení *Paenibacillus larvae* v půdě

Byl proveden orientační pokus, při kterém byl stanovován původce moru včelího plodu v půdě v okolí napadeného včelstva. Vzorky půdy byly odebrány na stanovišti u města Nové Hradky, kde bylo v roce 2013 stanoveno klinické stadium nemoci mor včelího plodu a kde proběhlo spálení veškerých včelstev dle stanovených předpisů. Půda byla odebrána pod česnem úlu (Obrázek 23 a 24).

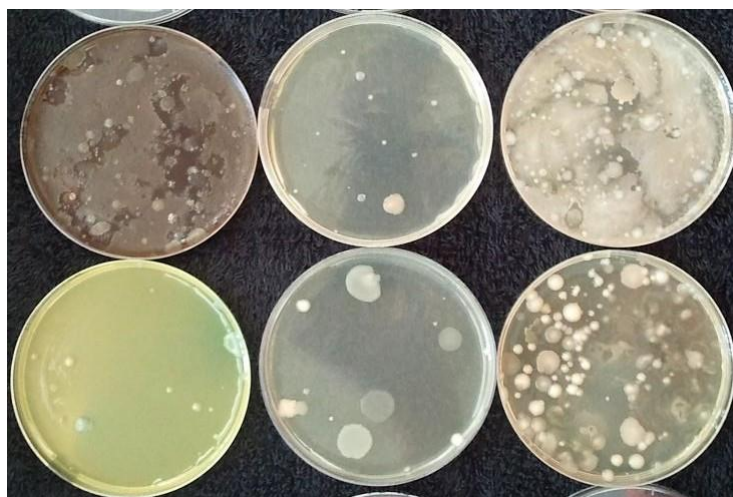
Odebrané vzorky půdy byly zpracovány tweenovou metodou (viz kapitola 2.2.2) s tím, že s půdou bylo zacházeno jako s mělí. Získané inokulum bylo rozředěno a inokulováno na Petriho misky s živnými medii PLA agar, CSA agar, XY agar, MYPGP agar, MYPGPn agar a MYPGPnp agar v ředění $10^1 - 10^5$ vždy s jedním opakováním. Celkem tak bylo inokulováno a při teplotě 37 ± 1 °C kultivováno 30 Petriho misek. Po sedmi dnech inkubace byly zaznamenány výsledky pokusu (Obrázek 25).



Obrázek 23 – Stanoviště včelstev napadených morem – lokalita odběrů půdních vzorků; foto D. Štípl



Obrázek 24 – Odběr půdy z místa pod česny morem napadených úlů; foto V. Krišťůfek



Obrázek 25 – Nárůst bakterií izolovaných z půdy pod česny morem napadených úlů na živných mediích
(horní řada zleva: bez antibiotik., k. nalidixová a k. pipemidová, bez antibiotik.;
dolní řada zleva: bez antibiotik., k. nalidixová a k. pipemidová, k. nalidixová); foto D. Štípl

2.5 Práce se zařízením pro jednoduché monitorování infekčního tlaku moru včelího plodu v jednotlivých včelstvech v praxi

Na včelnici byl použit následující materiál: plastový rámeček s vnitřními hranami 10 x 10cm a s držátkem pro lepší manipulaci; pinzeta pro odklizení mrtvolek z podložky; speciální, válcová, uzavíratelná, plastová tuba s 10 ml 5% roztoku Tweenu 80 a s tyčinkou s vatou na konci připevněnou k uzávěru – uzávěr lze buď celý vyšroubovat (potom lze manipulovat s tyčinkou a namáčet ji do roztoku Tweenu 80), nebo lze odklopit vrchní část uzávěru (potom lze po kapkách inokulovat obsah tuby); lihový fix k přehlednému popisu tub s odebranými vzorky měli; stříčka s etanolem a papírové utěrky k desinfekci plastového rámečku a k otření podložky po odebrání měli (Obrázek 26). Po ošetření měli ve vodní lázni byly použity testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* (zatím s mediem MYPGPn agar) a inkubátor potřebný ke kultivaci karek při teplotě 37±1 °C.

Pokus měl za cíl ve včelařské praxi otestovat navržený postup, který vyplýval z kombinace laboratorní metody využívající 5% roztok Tweenu 80 pro rozpuštění voskové měli a z metody kultivace na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* (viz kapitoly 2.2.2 a 2.2.3). Při provádění pokusu byla sledována především uživatelská náročnost práce s navrženým zařízením a kvalita prováděné práce v porovnání s dnes běžně používanou metodou odběru a rozboru voskové měli.

Pokus byl proveden v březnu roku 2014 kolem v ranních hodinách, kdy venkovní teplota nepřesahovala hodnotu 10 °C, a proto včely ještě neopouštěly úly. Nebylo proto zapotřebí chránit se při práci speciálním včelařským oblekem.

Nejprve byl zezadu úl otevřen a z podmetu byla vyjmuta plastová podložka s veškerým spadem (vosková měl, mrtvé včely,...). Pinzetou byly odebrány mrtvolky včel (Obrázek 27). Poté byl na náhodné místo na podložce s rozptýlenou voskovou mělí přiložen předem etanolem vydesinfikovaný plastový rámeček. Dále byl z tuby s 5% roztokem Tweenu 80 odšroubován uzávěr, na jehož spodku je připevněna tyčinka s vatou. Tyčinkou byla následně stírána vosková měl ohraničená plastovým rámečkem (Obrázek 28), dokud nebyl celý obsah rámečku přenesen do tubičky s 5% roztokem Tweenu. Hmotnost odebírané měli na ploše 100 cm² byla 0,5 gramu. Tuba byla uzavřena, plastový rámeček byl odebrán, místo na podložce potřísněné Tweenem 80 bylo otřeno papírovou utěrkou a podložka byla vrácena do podmetu na své původní místo. Úl byl uzavřen a práce na stanovišti tak byla ukončena.

Dále byla plastová tuba s odebranými vzorky vystavena ve vodní lázni teplotě 70 ± 2 °C po dobu 30 minut (Obrázek 29), aby byla vosková měla rozpuštěna a došlo tak k uvolnění spor sledované bakterie *Paenibacillus larvae* do vodného roztoku Tweenu 80. Před vložení do vodní lázně, po každých 10 minutách ve vodní lázni a po vyjmutí z vodní lázně byla tuba se suspenzí řádně promíchána. Po rozpuštění voskové měli byla suspenze ponechána 2 hodiny při teplotě asi 50 °C, aby se usadila. Dále byla suspenze vystavena selekčnímu tlaku tepla 90 ± 2 °C, aby byla eliminována veškerá doprovodná mikroflóra. Takto získané inokulum bylo po 1 ml nakapáno přímo z tuby na testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* (Obrázek 30) a inkubovány při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 7 dnů.

Stejný pokus byl proveden ve včelstvu, u kterého byl již dříve prokázán výskyt původce moru včelího plodu a bylo určeno klinické stadium nemoci. Další pracovní postup s odebranými vzorky infikované měli byl shodný, jako s prvními vzorky.

Po naočkování testovacích karet přímo z plastové tuby inokulem při ředění 10^1 byla z příslušného inokula v plastových tubách vytvořena ředící řada $10^2 - 10^5$. Takto vzniklémi inokuly byly očkované paralelně další dvě testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*. Pro srovnání s kultivací na Petriho miskách byla inokula také očkována na živné medium MYPGPn agar (shodné medium s medium v testovacích kartách) a na živné medium XY agar. Petriho misky a testovací karty byly kultivovány po dobu 7 dnů při teplotě 37 ± 1 °C. Poté byl proveden odečet narostlých bakteriálních kolonií (Obrázek 31) a byly stanoveny výsledky pokusu.



Obrázek 26 – Kompletní příslušenství potřebné k odběru vzorků na včelnici (plastový rámeček, tuba s 5% roztokem Tweenu 80, pinzeta, fix, plastový rámeček, stříčka s etanolem a papírové utěrky); foto D. Štipl



Obrázek 27 – Odstranění mrtvých včel pinzetou z podložky; foto D. Štipl



Obrázek 28 – Stěr voskové měli ohraničené rámečkem tyčinkou s vatou na konci vlhčenou v roztoku Tweenu 80; foto D. Štipl



Obrázek 29 – Tubička se suspenzí voskové měli rozpuštěné v Tweenu 80 ve vodní lázni; foto D. Štipl



Obrázek 30 – Inokulace testovacích karet RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* inokulem získaným odběrem voskové měli novou kartovou metodou; foto V. Křišťůfek



Obrázek 31 – Testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* po kultivaci s odečtenými výsledky; foto D. Štipl

3 VÝSLEDKY

3.1 Porovnání vlastností různých typů živných medií určených pro kultivaci *Paenibacillus larvae*

Tabulka č. 1 zobrazuje výsledky pokusu, který sledoval záchytnost bakterie *Paenibacillus larvae* u porovnávaných živných medií. Po odečtení bylo získáno množství spor na 0,2 ml inokula v příslušném ředění. Proto musel být proveden přepočít, aby byly získány hodnoty množství spor v 1 g příškvaru, nebo měli.

Pro přípravu inokula z příškvaru bylo použito 0,0056 g příškvaru. Ředění 10^1 obsahovalo 0,0056 g příškvaru, 17 ml destilované vody a 1 ml Tweenu 80. 0,2 ml tohoto inokula tak obsahovala $\frac{56}{9} \times 10^{-5}$ g. Při ředění 10^3 obsahovalo 0,2 ml inokula $\frac{56}{9} \times 10^{-7}$ g. Přímou úměrou byl odvozen vztah $\frac{x}{\frac{56}{9} \times 10^{-7}}$, kde x je počet kolonií na Petriho misce. Aby výsledky vycházely v milionech spor na 1 g příškvaru, byl celý vztah nakonec vynásoben $\times 10^{-6}$ a byl získán konečný vztah pro přepočít množství spor na Petriho misce při ředění 10^3 na 1 g příškvaru:

$$\frac{9x}{5,6} [\text{mil. spor/g}]$$

Pro přípravu inokula z voskové měli byly použity 2 g měli. Ředění 10^1 se skládalo právě ze 2 g měli, 17 ml destilované vody a 1 ml Tweenu 80. 0,2 ml tohoto inokula tak obsahovalo $\frac{1}{45}$ g. Při ředění 10^4 obsahovalo 0,2 ml inokula $\frac{1}{45} \times 10^{-3}$ g. Přímou úměrou byl odvozen vztah $\frac{x}{\frac{1}{45} \times 10^{-3}}$, kde x je počet kolonií na Petriho misce. Aby výsledky vycházely v milionech spor na 1 g měli, byl celý vztah nakonec vynásoben $\times 10^{-6}$ a byl získán vztah pro přepočít množství spor na Petriho misce při ředění 10^4 na 1 g voskové měli:

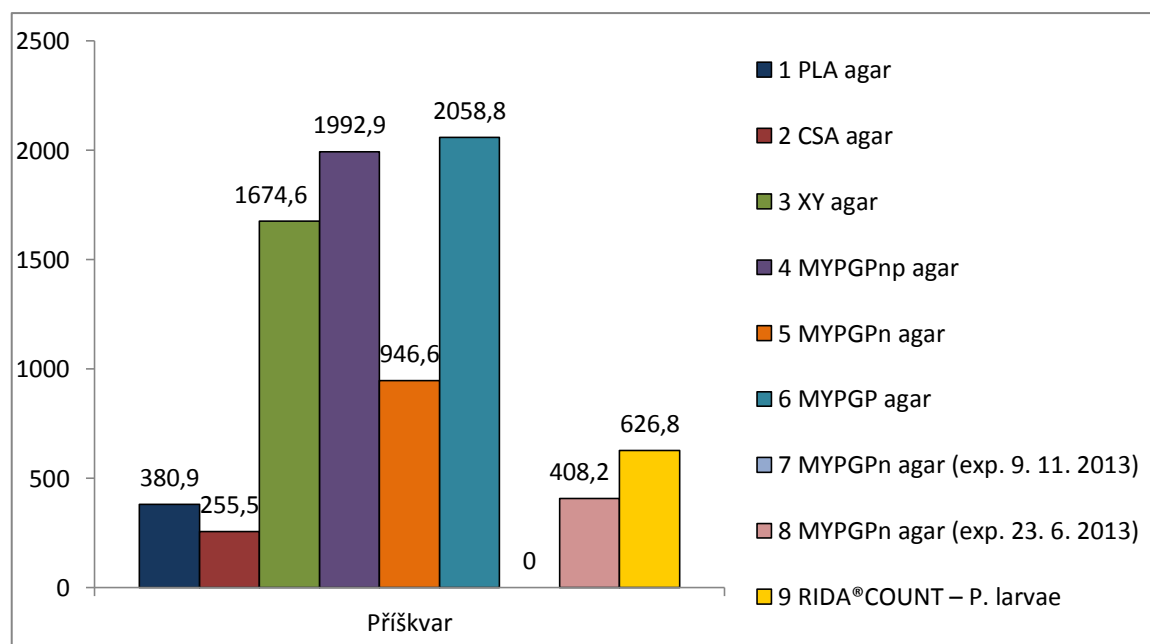
$$\frac{9x}{200} [\text{mil. spor/g}]$$

Obě inokula byla také použita ke srovnání záchytnosti bakterie *P. larvae* na Petriho miskách a na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*. Na jednu testovací kartu byl vždy očkován 1 ml inokula. K přepočtu množství zachycených spor na 1 g příškvaru a voskové měli bylo potřeba pouze odečtené množství vykultivovaných bakteriálních kolonií vydělit pěti. Tak bylo množství inokula (0,2 ml) srovnatelné s množstvím inokula očkovaným na Petriho misky, a proto lze po této úpravě použít stejné přepočtové vzorce.

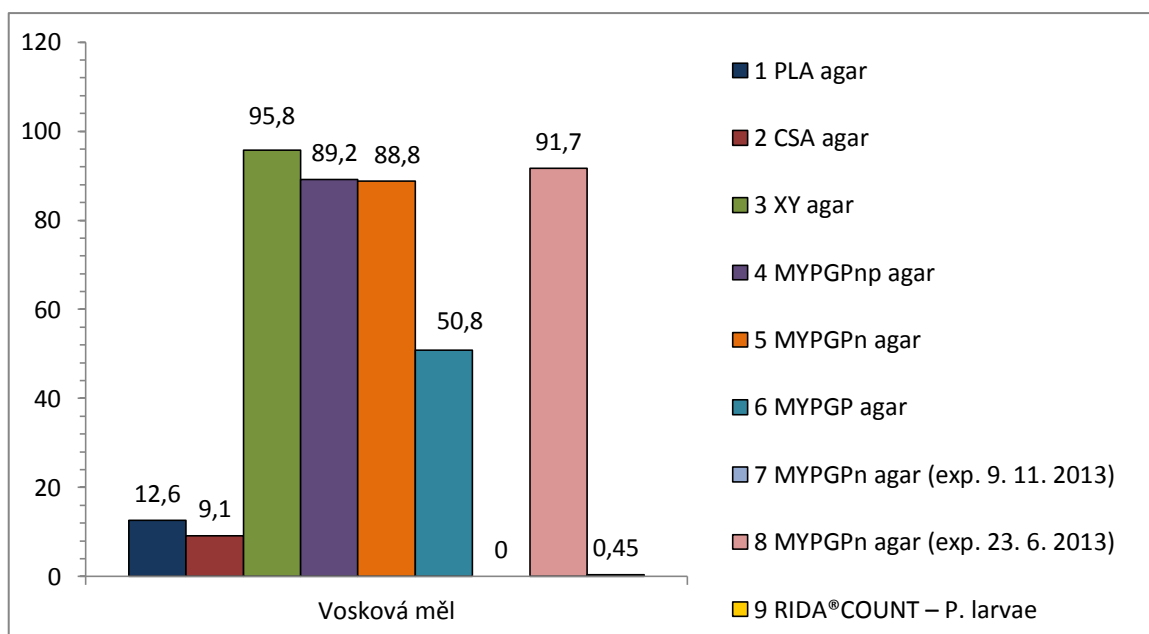
Živné medium	Původ spor	
	Příškvár	Vosková měl
	$\times 10^6$	
PLA agar	380,9 (51,3)	12,6 (1,2)
CSA agar	255,5 (44,4)	9,1 (3,5)
XY agar	1 674,6 (634,2)	95,8 (1,7)
MYPGPnp agar	1 992,9 (433,9)	89,2 (7,4)
MYPGPn agar	946,6 (289,1)	88,8 (19,8)
MYPGP agar	2 058,8 (133,9)	50,8 (4,9)
MYPGPn agar (exp. 9. 11. 2013)	0 (0)	0 (0)
MYPGPn agar (exp. 23. 6. 2013)	408,2 (288,3)	91,7 (17,1)
RIDA®COUNT – <i>P. larvae</i>	626,8 (0,3)	0,45 (0,1)

Tabulka č. 1 – Množství spor bakterie *P. larvae* v milionech se směrodatnou odchylkou určených v 1 g příškváru a v 1 g voskové měli stanovené na různých typech živných medií po sedmi dnech inkubace tweenovou metodou.

Výsledky schopnosti zachytit bakterii *P. larvae* na živných mediích dále ukazuje Graf č. 1, který znázorňuje výsledky pokusu s inokulem z příškváru, a Graf č. 2, který znázorňuje výsledky pokusu s inokulem z voskové měli.



Graf č. 1 – Množství spor bakterie *P. larvae* v milionech určených v 1 g příškváru kultivací na různých typech živných medií po sedmi dnech inkubace tweenovou metodou.



Graf č. 2 – Množství spor bakterie *P. larvae* v milionech určených v 1 g voskové měli kultivací na různých typech živných medií po sedmi dnech inkubace tweenovou metodou.

Z Tabulky č. 1 a Grafu č. 1, kde je zachyceno množství spor bakterie *Paenibacillus larvae* určených v 1 g příškvary stanovené na různých typech živných medií po sedmi dnech inkubace tweenovou metodou vyplývá, že na mediích typu PLA agar a CSA agar je sice možné kultivovat původce moru včelího plodu, ale v ohledu na záchytnost spor bakterie nejsou pro její kultivaci příliš vhodná. Nejvyšší záchytnost prokázala media typu MYPGP agar a jeho antibiotické varianty. Srovnatelných výsledků dosáhlo i nové medium XY agar. Významnou výhodou media XY agar je také fakt, že kolonie bakterií byly na tomto mediu pozorovatelné o den dříve (po 3. dni inkubace), než u ostatních porovnávaných živných medií. Živná media MYPGPn agar s prošlými daty expirace vykazovala výrazně nižší záchytnost než čerstvá media MYPGP agar. Na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* byl také prokázán záchyt bakterií *P. larvae*. Až na občasné kontaminace byla prokázána shodná specifita všech použitých živných medií. Cena jedné Petriho misky s živným mediem se pohybuje u všech použitých živných medií v cenové relaci 8 – 10 Kč, rozdíly finančních nákladů na výrobu živných medií jsou proto zanedbatelné.

Z Tabulky č. 1 a Grafu č. 2 kde je zachyceno množství spor bakterie *P. larvae* určených v 1 g voskové měli stanovené na různých typech živných medií po sedmi dnech inkubace tweenovou metodou vyplývají obdobná fakta, jako byla prokázána při použití inokula získaného z příškvary. Zásadní rozdíl nastává pouze u živného media MYPGPn

agar, které bylo již 9 měsíců po záruce kvality. Vykazovalo shodnou záchytnost, jako ostatní čerstvá živná media MYPGP agar. Lze si proto odvodit, že na živná media s prošlou expirační dobou se nelze spolehnout, přestože na nich stále lze bakterie kultivovat.

3.2 Důkaz *Paenibacillus larvae* pomocí různých identifikačních metod

Identifikačními metodami barvením preparátu dle Grama, testem na přítomnost katalázy a MALDI – TOF MS byla úspěšně prokázána přítomnost bakteriálních kolonií *Paenibacillus larvae* na všech typech použitých živných medií. Pozitivní výsledky prokazané identifikační metodou MALDI – TOF MS jsou znázorněny Tabulkami č. 2, 3 a 5 (viz kapitola 3.2.1).

3.2.1 Identifikační metoda MALDI – TOF MS

Software MALDI Biotyper porovnávající získaná spektra se vzorovými spektry uloženými v databázi MALDI vyjadřuje shodu těchto dvou spekter jako logaritmické identifikační skóre na číselné stupnici 0 – 3. Skóre pohybující se v rozmezí 3,000 – 2,300 je softwarem označeno zelenou barvou a značí vysoce pravděpodobnou identifikaci druhu. Rod je určen s naprostou jistotou. Skóre mezi 2,000 – 2,299 je také označeno zelenou barvou a znamená jisté určení rodu a pravděpodobnou identifikaci druhu. Skóre v rozmezí 1,700 – 1,999 je označeno žlutou barvou a znamená pouze pravděpodobnou identifikaci rodu. Nakonec skóre nižší než 1,700 je označeno červenou barvou a znamená nehodnotnou identifikaci. Pokud není možné ze vzorku získat spektrum, software oznámí, že nenalezl žádné vrcholy, určí skóre hodnoty 0 a sledovaný vzorek označí červenou barvou [16]. Ve výstupu získaném po identifikaci neznámých bakterií jsou výsledky zobrazeny v tabulkách, ve kterých je vypsáno deset (podle hodnot skóre) nejpodobnějších organismů.

Tabulky č. 2, 3 a 4 popisují výsledky identifikace neznámých bakteriálních kolonií metodou přímého přenosu mikroorganismů (Tabulka č. 2), metodou extrakce proteinů pomocí kyseliny trifluoroctové (Tabulka č. 3) a metodou extrakce proteinů pomocí etanolu a kyseliny mravenčí (Tabulka č. 4). Kompletní výsledkové tabulky identifikace metodou MALDI – TOF MS byly přidány na CD s přílohami ve formátu „.htm“.

Pomocí identifikační metody MALDI – TOF MS se podařilo potvrdit přítomnost bakterie *Paenibacillus larvae* ve všech testovaných vzorcích (1P – 8P, 1M – 6M a 8M) kromě kontaminací, které byly identifikovány pouze z informačních důvodů. Touto

metodou tak byl prokázán nárůst sledované bakterie *P. larvae* na všech použitých typech živných medií.

Vzorek	Určení vzorku na základě skóre	Skóre
Std	<i>Escherichia coli</i>	2,438
1P	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,194
2P	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,243
3P	<i>Paenibacillus larvae</i>	1,978
4P	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,157
5P	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,151
6P	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,135
7P	Nenalezeny žádné vrcholy	0
8P	<i>Paenibacillus larvae</i>	1,709
1P_KON	Nenalezeny žádné vrcholy	0
2P_KON	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,198
3P_KON	Nespolehlivá identifikace	1,656
1M	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,036
2M	<i>Paenibacillus larvae</i>	1,72
3M	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,156
4M	Nespolehlivá identifikace	1,496
5M	<i>Paenibacillus larvae</i>	1,955
6M	<i>Paenibacillus larvae</i>	1,984
8M	Nespolehlivá identifikace	1,659
2M_KON	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,077
6M_KON	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,216

Tabulka č. 2 – Rodové a druhové jméno izolátů bakterií z měli a příškvaru, které bylo danému vzorku přiřazeno podle nejvyšší hodnoty výsledného skóre a hodnoty skóre dané identifikace vzorku metodou přímého přenosu mikroorganismů; ze dvou vzorků je uveden vždy vzorek s lepším výsledným skóre.

U vzorku č. 3M byla nejprve naměřena hodnota 1,56. Poté se však podařilo ručním zaměřením laseru dosáhnout skóre 2,156 a bylo mu přiřazeno jméno *Paenibacillus larvae*.

Vzorky označené jako 7P, 8P, 3P_KON, 2M, 4M, 5M, 6M a 8M byly z důvodu nedostatečně spolehlivé identifikace dále podrobeny extrakci vzorků pomocí kyseliny tri-

fluor octové (TFA) a extrakci vzorků pomocí etanolu a kyseliny mravenčí (FA). Výsledky jsou zaznamenány v Tabulce č. 3 a Tabulce č. 4.

Vzorek	Určení vzorku na základě skóre	Skóre
Std	<i>Escherichia coli</i>	2,449
7P	Nespolehlivá identifikace	1,575
8P	<i>Paenibacillus larvae</i>	1,944
3P_KON	<i>Rothia mucilaginosa</i>	2,189
2M	<i>Paenibacillus larvae</i>	1,969
4M	Nespolehlivá identifikace	1,676
5M	<i>Paenibacillus larvae</i>	1,762
6M	Nenalezeny žádné vrcholy	1,692
8M	Nenalezeny žádné vrcholy	0

Tabulka č. 3 – Rodové a druhové jméno izolátů bakterií z měli a příškvaru, které bylo danému vzorku přiřazeno podle nejvyšší hodnoty výsledného skóre a hodnoty skóre dané identifikace vzorku metodou extrakce pomocí TFA; ze dvou vzorků je uveden vždy vzorek s lepším výsledným skóre.

Vzorek	Určení vzorku na základě skóre	Skóre
Std	<i>Escherichia coli</i>	2,449
7P	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,299
8P	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,366
3P_KON	<i>Rothia mucilaginosa</i>	2,525
2M	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,426
4M	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,098
5M	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,146
6M	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,352
8M	<i>Paenibacillus larvae</i>	2,32

Tabulka č. 4 – Rodové a druhové jméno izolátů bakterií z měli a příškvaru, které bylo danému vzorku přiřazeno podle nejvyšší hodnoty výsledného skóre a hodnoty skóre dané identifikace vzorku metodou extrakce pomocí etanolu a FA; ze dvou vzorků je uveden vždy vzorek s lepším výsledným skóre.

3.2.2 Metoda barvení preparátu dle Grama

Všechny preparáty obsahovaly tmavě fialové tyčinky. Po porovnání s dostupnou literaturou bylo ověřeno, že *Paenibacillus larvae* je grampozitivní, tyčinková bakterie. Pomocí metody barvení preparátu dle Grama a mikroskopováním získaného preparátu byla prokázána přítomnost bakterie *P. larvae* na všech použitých typech živných medií s původem spor jak z voskové měli, tak z příškvary [3], [19], [21].

3.2.3 Peroxidový test

Peroxidový test na přítomnost katalázy byl proveden mimo jiné na koloniích bakterií, které byly dále podrobeny identifikaci Gramovo barvením a metodou MALDI – TOF MS. Všechny kolonie bakterií, u kterých byl test na přítomnost katalázy negativní, byly vyhodnoceny metodou barvení preparátu dle Grama a metodou MALDI – TOF MS jako kolonie bakterie *Paenibacillus larvae*. Byla tak podpořena možnost řídit se testem na přítomnost (resp. nepřítomnost) katalázy při předběžné identifikaci *P. larvae*.

3.3 Stanovení *Paenibacillus larvae* v půdě

Na všech Petriho miskách byl zaznamenán nárůst neznámých bakteriálních kolonií již po 24 hodinách. Přestože nebyla prokázána přítomnost kolonií bakterie *Paenibacillus larvae*, byl po porovnání vždy všech šesti Petriho misek s inokulem ve stejném ředění pozorován význam antibiotik přidaných do některých z živných medií (XY agar, MYPGPn agar a MYPGPnp agar). Petriho misky s medii bez antibiotik (PLA agar, CSA agar a MYPGP agar) byly zpravidla všechny přerostlé různými bakteriálními koloniemi. Media obsahující kyselinu nalidixovou vykazovala podstatně nižší záchytnost půdních bakterií, kontaminací a doprovodné/necílové mikroflóry. Nejnižší záchytnost vykazovala media, která obsahovala navíc i kyselinu pipemidovou (XY agar a MYPGPnp agar). Pokus tak vypovídá o významu použití antibiotik při výrobě živných medií.

3.4 Práce se zařízením pro jednoduché monitorování infekčního tlaku moru včelího plodu v jednotlivých včelstvech v praxi

Na Petriho miskách s živnými medii MYPGPn agar a XY agar a na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*, které byly očkovány inokulem získaným z voskové měli odebrané ze zdravého včelstva pomocí nového zařízení pro monitorování

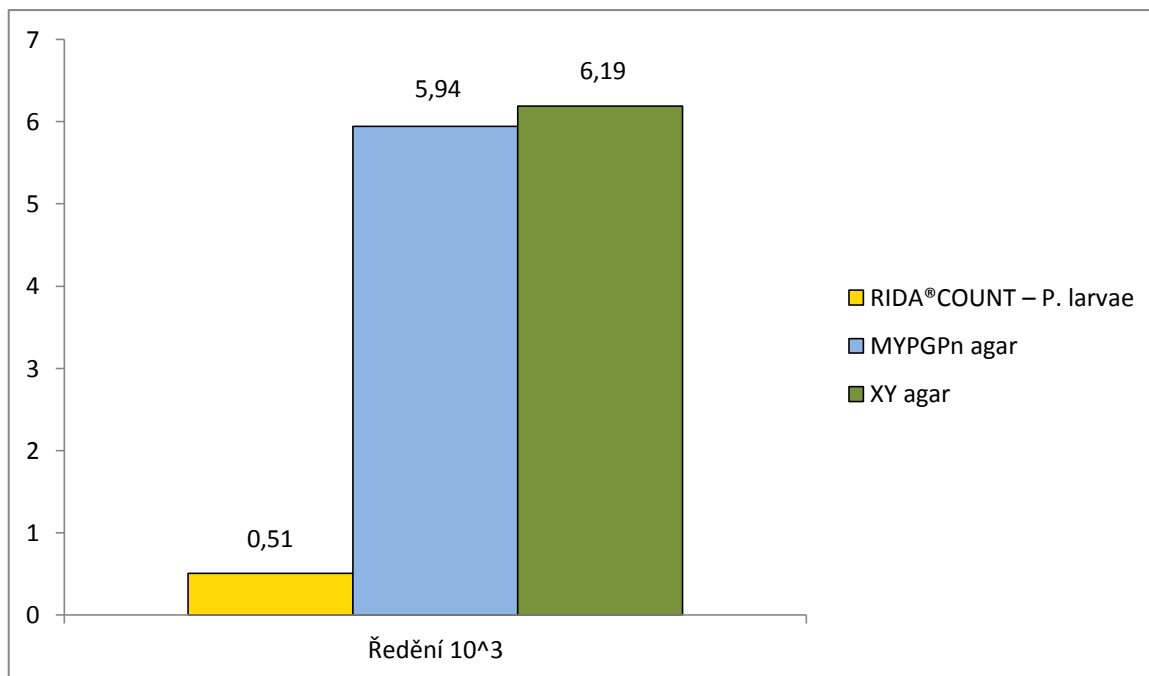
infekčního tlaku moru včelího plodu, nebyl zaznamenán jakýkoliv nárůst bakteriálních kolonií (ani *P. larvae*, ani doprovodná mikroflóra).

Nárůst kolonií bakterie *P. larvae* na Petriho miskách a testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* očkovaných inokulem, které bylo získáno z infikované měli použitím nového zařízení pro monitorování infekčního tlaku moru včelího plodu, je zaznamenán v Tabulce č. 5. V tabulce je uveden počet spor zachycených daným typem kultivační metody po sedmi dnech kultivace. Hodnoty jsou uvedeny v milionech spor na ploše 100 cm² podložky s voskovou mělí. Výsledky pokusu byly také zpracovány v Grafu č. 3.

Na testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* byl očkován vždy 1 ml inokula při daném ředění. Vynásobením odečteného množství spor konkrétním ředěním (10³, 10⁴) byl získán konečný počet spor v množství voskové měli rozptýlené na ploše 100 cm² podložky. Na Petriho misky bylo očkováno 0,2 ml inokula. Odečtené množství zachycených spor proto bylo nejprve vynásobeno pěti, aby bylo získáno množství spor v 1 ml inokula pro dané ředění. Dále byl princip přepočtu odečteného množství spor na Petriho miskách na počet spor obsažených ve voskové mělí rozptýlené na ploše 100 cm² podložky stejný jako u testovacích karet.

Živné medium	Množství spor x10⁶
RIDA®COUNT – <i>P. larvae</i>	0,51 (0,13)
MYPGPn agar	5,94 (2,22)
XY agar	6,19 (2,12)

Tabulka č. 5 – Počet spor bakterie P. larvae stanovených ve voskové měli (v milionech) rozptýlené na ploše 100 cm² podložky v úlu se směrodatnou odchylkou kultivací na testovacích kartách RIDA®COUNT – P. larvae a na živných mediích typu MYPGPn agar a XY agar; odečet výsledků byl proveden po sedmi dnech inkubace tweenovou metodou.



Graf č. 3 – Počet spor bakterie *P. larvae* stanovených ve voskové měli (v milionech) rozptýlené na ploše 100 cm² podložky v úlu kultivací na testovacích kartách RIDA®COUNT – *P. larvae* a na živných mediích typu MYPGPn agar a XY agar; odečet výsledků byl proveden po sedmi dnech inkubace tweenovou metodou.

Z pokusu vyplývá, že medium XY agar je v ohledu na záchytnost spor *Paenibacillus larvae* rovnocenné mediu MYPGPn agar. Na obou mediích bylo zaznamenáno asi šest milionů spor na ploše 100 cm² podložky v úlu. Výhodou media XY agar je, že kolonie bakterií byly pozorovatelné již po třech dnech kultivace. Na mediu MYPGPn agar je tomu zpravidla až o den později. Na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* byl nárůst bakterií zhruba o jeden řád nižší. Bylo zachyceno asi půl milionu spor bakterie *P. larvae*. Podstatné však je, že byla tímto pokusem ověřena a prokázána funkčnost kartové metody využívající k extrakci spor z voskové měli 5% roztok Tweenu 80.

ZÁVĚRY

- Práce si vzala za cíl porovnat různé typy živných medií určených pro kultivaci bakterie *Paenibacillus larvae*. Cílem tohoto porovnání bylo určit nejvhodnější živné medium pro kultivaci bakterie a v budoucnu jej použít k výrobě testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*:
 - byla otestována živná media typu PLA agar, CSA agar, MYPGP agar, MYPGPn agar, MYPGPnp agar a XY agar
 - z hlediska záchytnosti sledované bakterie *P. larvae* se projevilo jako nejvhodnější nově vyvinuté medium XY agar (v přípravě patentová přihláška). Bude vhodné pro výrobu testovacích karet RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* a zároveň i pro praktické užití ke stanovení infekčního tlaku moru včelího plodu dosud používaným mikrobiálním rozbořem
 - na mediích typu PLA agar a CSA agar byl sice prokázán nárůst bakterie *P. larvae*, avšak pro nedostatečnou záchytnost bakterie nedoporučuji jejich použití k výrobě testovacích karet RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*. Nevýhodou živného media CSA agar je také fakt, že vykultivované bakteriální kolonie lze obtížně odečítat z Petriho misek, jelikož medium je neprůhledné díky rudé beraní krvi, která je jednou z hlavních přísad media
- Porovnal jsem dosud používaný postup při určování infekčního tlaku moru včelího plodu klasickou „toluenovou metodou“ s novější „tweenovou metodou“:
 - pomocí obou metod je možné připravit z voskové měli inokulum obsahující volné spory bakterie *Paenibacillus larvae*. Nevýhodou toluenové metody je však práce s toluenem, která je z hygienických důvodů nevhodná. Další nevýhodou toluenu jsou jeho inhibiční vlastnosti působící na klíčení spor bakterie *P. larvae*. Záchytnost spor je proto nižší, než u tweenové metody
 - jako vhodnější tak byla vybrána tweenová metoda a na jejím principu bude postavena extrakce spor *P. larvae* z voskové měli v novém zařízení pro monitorování stavu infekčního tlaku moru včelího plodu kartovou metodou

- Byly identifikovány bakterie narostlé na živných mediích ze vzorků měli a příškvaru:
 - peroxidový test se projevil jako nejvhodnější metoda v ohledu na rychlost a náročnost práce pro určení zda daná kolonie bakterií obsahuje enzym katalázu a tudíž k vyloučení, že se jedná o bakterie rodu *Paenibacillus*
 - Gramovo barvením a mikroskopováním byla u sledovaných bakterií prokázána grampozitivita a tyčinkový tvar. Bylo tak potvrzeno, že sledované bakterie mohou být rodu *Paenibacillus*
 - identifikační metodou MALDI – TOF MS, která k identifikaci neznámých bakterií využívá porovnání jejich proteinových profilů, prokázala přítomnost a možnost kultivace bakterie *P. larvae* na všech použitých typech živných medií. Vzhledem k nízké ceně, relativně malé náročnosti práce a vysoké kvalitě výsledků je MALDI – TOF MS metoda první volby pro identifikaci neznámých bakteriálních kolonií a určování jejich rodu i druhu.
- Pokus, který měl za cíl odhalit spory *Paenibacillus larvae* v půdě pod nakaženým včelstvem dospěl k následujícím výsledkům:
 - nebyla prokázána přítomnost spor bakterie *P. larvae* v půdě odebrané pod česny morem napadených včelích úlů
 - byl potvrzen význam použití antibiotik (kyselina nalidixová a kyselina pipemidová) v testovaných živných mediích pro potlačení doprovodné/necílové mikroflóry. Zaznamenal jsem výrazně nižší nárůst necílových bakterií na živných mediích obsahující zmíněná antibiotika. Jejich použití na vyvíjených testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae* je nezbytné.
- Byl navržen nový postup v boji proti moru včelího plodu v předklinickém stádiu výskytu choroby v jednotlivých včelstvech s využitím kultivace původce této choroby na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*:
 - příslušenství tohoto zařízení obsahuje tyto chemikálie a materiál: plastová tuba s 10 ml 5% roztoku Tweenu 80 a s tyčinkou s vatou na konci připevněnou k uzávěru, plastový rámeček o obsahu 100 cm² s držátkem pro snadnou manipulaci, lihový fix (k popisu vzorků), stříčka s etanolem a papírové utěrky (k desinfekci náčiní), vodní

- lázeň (k tepelnému ošetření vzorků), inkubátor (ke kultivaci testovacích karet při teplotě 37 ± 1 °C), testovací karty RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*
- byl otestován pracovní postup s tímto zařízením. Pomocí zařízení se v nakaženém úlu podařilo stanovit přítomnost původce moru včelího plodu. Ve zdravém včelstvu byla pomocí tohoto zařízení potvrzena nepřítomnost spor bakterie *P. larvae*
 - práce s nově navrženým zařízením nevyžaduje od uživatele žádné odborné znalosti ani zkušenosti v mikrobiologické praxi. Práce s ním proto není uživatelsky náročná a splňuje veškerá základní hygienická opatření

- Práce bude pokračovat testováním a zdokonalováním nově navrženého zařízení pro monitorování infekčního tlaku moru včelího plodu kartovou metodou. Hlavním cílem bude zvýšit záchytnost spor původce moru včelího plodu na testovacích kartách RIDA®COUNT – *Paenibacillus larvae*. Toho by mělo být dosaženo především použitím živného media XY agar. Záchytnost sledované bakterie se také pravděpodobnělepší použitím roztoku Tweenu 80 o nižší koncentraci. Pro zavedení zařízení do praxe bude třeba ještě porovnat výpovědní hodnoty klasické mikrobiální metody a nové testovací kartové metody.

Cena zařízení s takto navrženým příslušenstvím je přibližně 15 000 Kč. Cena jednoho stanovení infekčního tlaku moru včelího plodu novou kartovou metodou pak bude přibližně 30 – 40 Kč. V porovnání s cenou jednoho mikrobiálního vyšetření voskové měli (600 – 900 Kč), rychlostí a jednoduchostí testu je však cena přijatelná, zvláště pak pro majitele velkochovů. Jednou z hlavních výhod testu je fakt, že stav infekčního tlaku moru včelího plodu bude tímto zařízením stanovován (oproti klasickému mikrobiálnímu vyšetření) v jednotlivých včelstvech.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TITĚRA, Dalibor. *Mor včelího plodu*. VÚVč Dol, 2009, 44 s., 1. vyd., ISBN 978-80-87196-02-1.
- [2] ŠOTOLOVÁ, Marie. Vyvíjíme efektivnější zjišťování moru včelího plodu. *Moderní včelař*. 2013, ročník X. (2013), č. 6, s. 14 – 15, ISSN 1214-5793.
- [3] ŠTIPL, Daniel. *Izolace původce moru včelího plodu Paenibacillus larvae na různých typech živného media*. 2013, Středoškolská odborná činnost, obor 07, 30 s.
- [4] SLÁMA, Jiří. Minimum znalostí pro začátečníky. *Včelařství*. 2010, ročník 63(144), č. 12, s. 414 – 416, ISSN 0042-2924.
- [5] BZDIL, Jaroslav. *Nové metody v diagnostice moru včelího plodu*. 2010, Doktorská disertační práce, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 121 s.
- [6] TYL, Jan. Co můžeme vyčíst z podložek. *Včelařství*. 2011, ročník 64(145), č. 2, s. 58 – 60, ISSN 0042-2924.
- [7] DE GRAAF, Dirk C., A. M. ALIPPI, M. BROWN, J. D. EVANS, M. FELDLAUFER, A. GREGORC, M. HORNITZKY, S. F. PERNAL, D. M. T. SCHUCH, D. TITĚRA, V. TOMKIES a W. RITTER. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, č. 43, s. 583-590, ISSN 0266-8254.
- [8] EN_WIKIPEDIA, *The Free Encyclopedia* [online]. [Cit. 2. 3. 2014] Dostupné z URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Tween_80
- [9] HAKLOVÁ, Marcela a Dalibor TITĚRA. Stanovení Paenibacillus larvae, ssp. v měli a vosku, předmět zkoušky med, měl, vosk. *Standardní operační postup VÚVč Dol*, 2012, MI_01_PL, AZ 5, s. 1-5.
- [10] RYBA, Stepan, Vaclav KRISTUFEK a Dalibor TITERA. The use of RIDA®COUNT for monitoring the American Foulbrood pathogen. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 2012, č. 3, s. 233 – 236, ISSN 2165-3356.
- [11] BZDIL, Jaroslav. *Detection of Paenibacillus larvae Spores in the Debris and Wax of Honey Bee by the Tween 80 Method*. 2007, Acta Vet. Brno, 76, s. 643-648.
- [12] KAMLER, František. Odběr vzorků ze dna úlů. *Včelařství*. 2011, ročník 64 (145), č. 1, s. 26 – 27, ISSN 0042-2924.
- [13] DE GRAAF, Dirk C. American foulbrood of honey bee. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals – O. I. E. Terrestrial Manual*. 2013, s. 395 – 404.

- [14] DINGMAN, Douglas W. a Donald P. STAHL. Medium Promoting Sporulation of *Bacillus larvae* and Metabolism of Medium Components. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, č. 10, s. 860 – 869, ISSN 0099-2240.
- [15] FLESAR, Jaroslav a Jaroslav HAVLÍK. Mor včelího plodu a přírodní látky pro život našich včel. *Včelařství*. 2009, ročník 62(143), č. 4, s. 92 – 93, ISSN 0042-2924.
- [16] HINIC, Vladimira, Cathleen LANG, Maja WEISSER, Clarisse STRAUB, Reno FREI a Daniel GOLDENBERGER. *Corynebacterium tuberculostearicum*: a potentially misidentified and multiresistant, *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, roč. 50, č. 8, s. 2561-2567, ISSN 0095-1137.
- [17] VÍTKOVÁ, Petra, Olga, BECHYŇOVÁ a Josef SCHARFEN. *Barvení preparátu dle Grama*. Oddělení lékařské mikrobiologie a imunologie, Oblastní nemocnice Trutnov a. s. 2012, s. 1 – 2.
- [18] Zákon 166/1999 Sb. o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon) ve znění zákonů č. 29/2000 Sb., č. 154/2000 Sb., č. 102/2001 Sb., č. 76/2002 Sb., č. 120/2002 Sb., č. 320/2002 Sb., č. 131/2003 Sb., č. 316/2004 Sb., č. 444/2005 Sb., č. 48/2006 Sb., č. 186/2006 Sb., č. 230/2006 Sb., č. 124/2008 Sb., č. 182/2008 Sb., č. 223/2009 Sb., č. 291/2009 Sb. a č. 298/2009 Sb., Sbírka zákonů, 1999, č. 57, s. 3122-3150.
- [19] HRABÁK, Jaroslav. Zamyšlení nad cenou jednoho mikrobiologického vyšetření. *Včelařství*. 2013, ročník 66 (147), č. 2, s. 47, ISSN 0042-2924.
- [20] PŘIDAL, Antonín. Mor včelího plodu – diagnostika. *Moderní včelař*. 2008, ročník V., č. 3, s. 5 – 6, ISSN 1214-5793.
- [21] HRABÁK, Jaroslav. Mor včelího plodu. *Včelařství*. 2011, ročník 64 (145), č. 11, s. 367 – 368, ISSN 0042-2924.
- [22] ŠTURSA, Petr, Petra, JUNKOVÁ, Michal, STREJČEK, Tomáš, MACEK a Martina, MACKOVÁ. MALDI – TOF MS snadný a rychlý způsob pro identifikaci bakterií izolovaných ze životního prostředí. *Listy cukrovarnické a řepařské*. 2010, roč. 126, č. 11, s. 412 – 413, ISSN 1210-3306.
- [23] HANUŠKA, Josef. Nákazová situace. *Včelařství*. 2008, ročník 61(142), č. 5, s. 118 – 119, ISSN 0042-2924.
- [24] MARADA, Vít. Mor včelího plodu a se dá úspěšně potlačit. *Včelařství*. 2009, ročník 62(143), č. 9, s. 270 – 273, ISSN 0042-2924.