

Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra ekologie a životního prostředí



## **Mor včelího plodu – možnosti prevence**

Bc. Michaela Wolfová

Diplomová práce  
předložená  
na Katedře ekologie a životního prostředí  
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci  
jako součást požadavků k získání titulu Mgr. v oboru  
Ochrana a tvorba krajiny

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Vítězslav Bičík, CSc.  
Odborný konzultant: RNDr. Roman Linhart

Olomouc 2013



WOLFOVÁ, Michaela. Diplomová práce: Mor včelího plodu – možnosti prevence. Olomouc: Katedra ekologie a životního prostředí PřF UP v Olomouci, 2013. 47 str., 3 přílohy, česky.

## **Abstrakt**

Mor včelího plodu je onemocnění způsobené bakterií *Paenibacillus larvae larvae*, která napadá včelí larvy. V České republice je tato včelí choroba považována za vysoce infekční a neléčitelnou. Současná veterinární opatření nařizují při potvrzení výskytu moru včelího plodu utracení všech včelstev na daném stanovišti. Přestože odborníci vědí o moru včelího plodu již mnohé, česká veterinární praxe není v souladu s vědeckými poznatky a mezi včelařskou veřejností se šíří často nepřesné informace. Stěžejním úkolem této práce je vytvořit ucelený přehled dosavadního výzkumu dané problematiky a poskytnout srozumitelnou interpretaci zásadních poznatků. Cílem praktické části této práce je zpracování získaných informací o výskytu původce moru včelího plodu ve včelstvech na území Olomouckého kraje, z let 2007–2012. Bylo zjištěno, že klinické stádium nákazy nastává zpravidla při hodnotách spor v měli v řádu  $10^4/g$ . Naopak při množství spor v řádu  $10^2/g$  je největší pravděpodobnost životaschopného přežívání včelstva i v dalších letech bez klinických příznaků. Případy, u kterých byly pozitivní nálezy spor v měli po více následujících let bez klinických příznaků, a které byly ponechány samovolnému vývoji, vykazovaly nárůst infekce. U těchto případů došlo do tří let k manifestaci klinických projevů a včelstva byla spálena. Na druhé straně, v těch případech, u kterých byly pozitivní nálezy spor v měli po více následujících let bez klinických příznaků, a u nichž byla aplikována intenzivní obnova díla a desinfekce příslušenství, docházelo postupně k poklesu množství spor v měli a nezdědky došlo do tří let k úplnému potlačení infekce. Výsledky potvrzují, že intenzivní obnova díla má prokazatelný preventivní i ozdravný účinek.

## **Klíčová slova:**

imunita, klinické příznaky, obnova díla, původce *Paenibacillus larvae larvae*, prevence

WOLFOVÁ, Michaela. Diploma Thesis: American foulbrood – possible ways of prevention. Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University of Olomouc, 2013. 47 p., 3 appendices, in Czech.

## **Abstract**

American foulbrood is a disease caused by bacteria *Paenibacillus larvae larvae*, which infects honey bee larvae. In the Czech Republic, it is considered as a highly virulent and incurable disease. Current veterinary measures to deal with clinical occurrence of American foulbrood enjoin to burn all bee colonies on the locality. Although scientists have known much about American foulbrood, Czech veterinary practice has been in disagreement with the scientific knowledge. Fragmentary and confusing information get to beekeepers. Main task of this thesis is to create a complete survey of present research of this issue and provide clear interpretation of basic knowledge. A target of the practical part of the thesis is to assess data about the occurrence of the agent of American foulbrood in the region of Olomouc from 2007–2012. There was found that clinical symptoms of the disease emerge usually within the amount of spores in wax debris of  $10^4$ /g. On the other hand, there is the highest probability of vital survival of a bee colony within the amount of spores in wax debris of  $10^2$ /g. In cases which were positive on *P. larvae larvae* during several following years without clinical symptoms and which were left to spontaneous development, an increase of infection was observed. Clinical symptoms emerged up to three years and the bee colonies were burned. On the contrary, the cases which were positive on *P. larvae larvae* during several following years without clinical symptoms and which were treated, showed a gradual decrease of the amount of spores in wax debris. There was a total suppression of the infection up to three years. Our results confirm that renewal of combs induce a preventive and healing effect.

## **Key words:**

Agent *Paenibacillus larvae larvae*, clinical symptoms, immunity, prevention, renewal of combs

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Vítězslava Bičíka, CSc., s použitím citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci 2.1.2013

.....

podpis

# Obsah

Seznam obrázků .....	vii
Předmluva .....	viii
Poděkování.....	ix
1 Úvod.....	10
1.1 Základy ekologie a etologie včely medonosné .....	11
1.2 Historie výskytu moru včelího plodu.....	12
1.3 Epizootologie moru včelího plodu.....	13
1.3.1 Původce moru včelího plodu.....	13
1.3.2 Průběh infekce.....	13
1.3.3 Symptomy onemocnění.....	14
2 Cíle práce .....	15
3 Kompilace vědeckých studií .....	16
3.1 Diagnóza moru včelího plodu .....	16
3.2 Přenos bakterie <i>Paenibacillus larvae larvae</i> .....	17
3.3 Obranné mechanismy včely medonosné vůči MVP .....	20
3.3.1 Genetické mechanismy rezistence .....	20
3.3.2 Behaviorální a fyziologické mechanismy rezistence .....	21
3.4 Možnosti potlačení moru včelího plodu.....	24
4 Materiál a metody .....	28
4.1 Sběr dat.....	28
4.2 Zpracování dat.....	29
5 Výsledky .....	30
6 Diskuze.....	35
7 Závěr .....	37
8 Literatura.....	39
9 Přílohy.....	47

## Seznam obrázků

Obr. 1 Množství spor <i>P. larvae</i> ve vzorku měli u případů bez klinických příznaků a u případů s klinickými příznaky .....	31
Obr. 2 Histogram distribuce množství spor <i>P. larvae</i> u případů s klinickými příznaky... ..	31
Obr. 3 Histogram distribuce množství spor <i>P. larvae</i> u případů bez klinických příznaků .....	32
Obr. 4 Vývoj infekce <i>P. larvae</i> u pěti případů v průběhu tří let bez zásahů.....	32
Obr. 5 Průběh infekce <i>P. larvae</i> na dvou stanovištích v průběhu tří let při aplikaci obměny díla.....	33
Obr. 6 Průběh infekce <i>P. larvae</i> u tří včelstev v průběhu tří let při aplikaci intenzivní obměny díla.....	33
Obr. 7 Průběh nákazy u případů ponechaných samovolnému vývoji a u případů, u kterých byla aplikována obměna díla.....	34

## Předmluva

„Jestliže včely zmizí z povrchu zemského, bude mít lidstvo maximálně čtyři roky života; nebudou včely, nebude opylování, nebudou rostliny, nebudou zvířata, nebude člověk...“

*Albert Einstein*

Přítomnost opylovatelů v přírodě je životodárná! Mimořádný význam v opylovací činnosti má zejména včela medonosná. Ta je nejpočetnějším a nejuniverzálnějším opylovačem aktivním od předjaří do konce vegetační sezóny. Díky těmto vlastnostem je nejdůležitějším opylovačem hospodářských plodin i planě rostoucích rostlin. Včely a krajinné prostředí jsou od sebe neoddělitelné. Díky opylování hmyzosubných rostlin nedochází v krajině k druhovým přesunům ve prospěch větrosných druhů rostlin (např. trav). Včely se tak aktivně podílejí na uchování rozmanitosti vegetace. Včela je nezbytná i pro život ostatních zvířat v přírodě. Mnoho druhů ptáků se živí semeny, plody, bobulovinami, které se vyvinou, pouze pokud jsou květy opyleny. Včelařství má tedy velmi úzký vztah se životním prostředím – významně přispívá k posílení ekologické stability krajiny. Navzdory hospodářskému i ekologickému významu včel je včelařství v celé Evropě v úpadku. V posledních letech včelu medonosnou decimuje bakteriální choroba „mor včelího plodu“. Každý rok je v České republice v důsledku nákazy morem včelího plodu spáleno velké množství včelstev. A tak rok od roku ubývají včely i včelaři. Současní chovatelé stárnou, umírají a mladí začínající včelaři tento úbytek nevyrovnávají. Divoká včelstva či ulétlé roje, jež by mohly zastupovat v opylovací činnosti vytrácející se chované včely, jsou dle legislativy z preventivních důvodů důsledně likvidovány. Dobrý zdravotní stav včel je z ekonomického hlediska více než žádoucí, z pohledu ekologie životně důležitý. Může však být obnoven a zachován pouze tehdy, pokud správně pochopíme život včelích societ. V koevoluci včel a původce moru včelího plodu se jistě vyvinula přirozená schopnost obrany hostitele proti patogenům, která však může být narušena vlivem člověka. Moderní technologie včelaření již příliš neodráží přirozený život divokých včel. Právě snaha o pochopení některých přirozených mechanismů, díky kterým včely existují na naší planetě desítky miliónů let, se stala ústředním motivem této práce. Poznatky o biologických a ekologických zákonitostech je třeba včlenit do nových včelařských metod, které budou ctít přírodní zákony.



## Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila velkou vděčnost především vedoucímu mé diplomové práce, panu prof. RNDr. Vítězslavu Bičíkovi, CSc., za jeho čas, vstřícnost a mnoho cenných rad. Vřele děkuji také svému konzultantovi panu RNDr. Romanu Linhartovi za odborné provedení včelařskou problematikou a neustály optimismus při řešení problémů. Poděkovat bych chtěla také doc. Vagerovi, za jeho zájem o tuto práci. Výjimečné poděkování patří všem včelařům, bez jejichž podpory a ochoty poskytnout mi potřebné údaje by mé snažení zřejmě nebylo dokončeno. Za poskytnutí stěžejních údajů a informací děkuji zejména panu Svobodovi a panu Kolomému. V neposlední řadě, děkuji své rodině, partnerovi a přátelům za duševní podporu a trpělivost.

V Olomouci 2.1.2013

# 1 Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) patří mezi nejznámější zástupce společenského (eusociálního) hmyzu. Vytváří početné vytrvalé kolonie (society) s diferencovanými kastami (Macek et al. 2010). Přes zřejmé výhody života ve společnosti (obrana, péče o potomstvo, rychlé informování o zdroji potravy apod.), má tento způsob života i svá rizika. Tisíce příbuzných jedinců shloučených v hnízdě se stálou teplotou a mírnou vlhkostí, blízký fyzický kontakt včel (komunikace, grooming) a vzájemné předávání potravy vytvářejí vhodné podmínky pro množství různých patogenů. Včela medonosná trpí nemocemi virovými, bakteriálními, houbovými i nemocemi způsobovanými prvoky a roztoči (Švamberg 2000).

Mor včelího plodu (MVP) je nejzávažnější bakteriální chorobou včelího plodu. Jak pojmenování napovídá, patogen napadá larvální stádia včel. Mor včelího plodu je zhoubný nejen proto, že zabíjí infikované larvy, ale je potenciálně letální pro celé infikované včelstvo. Navíc, bakterie se snadno šíří díky schopnosti vytvářet velmi odolné endospory. Šíření původce na lokální i globální úrovni je usnadněno prodejem matek, oddělků a hlavně medu. V současné době je mor včelího plodu rozšířen téměř po celém světě, včetně České republiky. V letech 2005–2009 se pohyboval počet vyhlášených ohnisek moru v Česku mezi 180 až 250 (Duben 2010). V roce 2010 byl zaznamenán mírný pokles, na 162 zdolaných ohnisek (Státní veterinární správa ČR 2012). Je-li potvrzen výskyt moru včelího plodu nebo hrozí-li nebezpečí jeho šíření, česká legislativa nařizuje utracení všech včelstev, které se provede vysířením s okamžitým spálením (Malena 2007). Jakákoli léčba je ze zákona zakázána (vyhláška č. 299/2003 Sb.).

Přestože odborníci vědí o moru včelího plodu již mnohé, praxe stále není v souladu s vědeckými poznatky. Je nezbytné uvést všechny odborné a praktické okolnosti do souvislostí tak, aby došlo k řešení, které bude mor včelího plodu nejen účinně eradikovat, ale především vytvářet podmínky bránící propuknutí nákazy.

## 1.1 Základy ekologie a etologie včely medonosné

Včela medonosná byla domestikována v Egyptě před více než 5 000 lety pro účel produkce medu, vosku a propolisu. V České republice již nejsou původní divoké populace odlišitelné od domestikovaných zdivočelých včelstev (Tautz 2009). V přirozených podmínkách včely hnízdí v chráněných dutinách stromů a skal nebo využívají vhodných dutin obytných stavení. Domestikovaná včelstva jsou chována v různých typech úlů. Hnízdo je tvořeno voskovými plástvemi, které jsou stavěny svisle shora dolů. Plástve obsahují plodové komůrky a medové zásobníky. Do plodových buněk matka klade vajíčka, ze kterých se líhnou larvy. Medové zásobníky slouží k ukládání zásob potravy (nektaru a pylu).

Včela medonosná patří mezi nejznámější zástupce společenského (sociálního) hmyzu. Vytváří početné vytrvalé kolonie (society) s diferencovanými kastami (Macek et al. 2010). Každé včelstvo sestává z kast dělnic, trubců a jedné matky. Členové včelstva jsou na sobě zcela závislí. Úlohou matky je klást vajíčka, a tak zabezpečovat obnovu včelstva. Včelí matka se páří pouze jedenkrát za život s více trubci, aby si vytvořila dostatečné zásoby spermatu na pozdější oplodnění vajíček. Trubci žijí zpravidla jen v letním období za účelem oplodnění mladých matek. Na konci léta jsou trubci z hnízda vyhnáni. Dělnice jsou, stejně jako matka, samičího pohlaví, mají však nedostatečně vyvinuté pohlavní orgány. Pečují o matku i trubce a vykonávají ostatní potřebné práce. Po vylíhnutí mají dělnice funkci „čističek“, které připravují buňky k opětovnému zaklazení. V dalším stádiu vývoje přebírají funkci „krmiček“, jež se starají o zásobování larev potravou. Později se dělnicím aktivují voskotvorné žlázy a získávají tak schopnost stavět včelí dílo. Poté se ze „stavivatel“ stávají „strážkyně česna“, které hlídají vchod do úlu (hnízda). V předposlední etapě získávají dělnice funkci „létavek“, jejichž úkolem je donášení potravy a vody do úlu. Nakonec dělnice plní funkci „sběratelek“ propolisu.

Existence kast je dána haplodiploidním určením pohlaví, kvalitou potravy a feromony produkovanými včelí matkou. Feromon známý pod názvem „mateří látka“ zamezuje vývinu vaječnic dělnic a brání dělnicím stavět tzv. matečnický, speciální plodové buňky pro vývoj nových matek. Mateří látka se rovnoměrně šíří ve včelstvu vzájemným krmením mezi dělnicemi. V případě, že včelstvo ztratí matku, feromon nemůže působit. Včelstvo tak zjistí, že je osiřelé a začne zakládat nouzové matečnický pro vývoj nové matky. K porušení přenosu uvedeného feromonu může dojít také

při dosažení vysoké populační hustoty (vzhledem k velikosti hnízdního prostoru). V tomto případě dělnice postaví matečnický na okraji plodové plástve, do kterých matka naklade oplodněná vajíčka. Vylíhlé larvy jsou krmeny pouze mateří kašičkou, což způsobí rychlý růst a vývoj včelí matky (larvy dělnic jsou krmeny méně výživnou směsí nektaru a pylu). Před vylíhnutím mladých matek, opouští stará matka hnízdo s částí včelstva, ve které jsou zastoupeny včely všech věkových kategorií včetně trubců – nastává rojení, které je přirozeným způsobem rozmnožování včelstev.

## 1.2 Historie výskytu moru včelího plodu

Onemocnění včel, které nazýváme mor včelího plodu (angl. American foulbrood) pravděpodobně znali včelaři už ve starověku. V 18. století saský přírodovědec Schirach popsal včelí chorobu, která se projevovala hnilobným zápachem infikovaného včelstva a pojmenoval ji tedy jako hnilobu plodu (angl. foulbrood). O století později byly popsány dvě různé etiopatologické formy hniloby plodu - mírná a vyléčitelná u otevřeného plodu (velmi pravděpodobně se jedná o chorobu, kterou dnes nazýváme hniloba včelího plodu (angl. European foulbrood), druhá zhoubná a nevyléčitelná (mor včelího plodu angl. American foulbrood). V roce 1906 americký vědec White (1906) izoloval bakterii *Bacillus larvae*, jež je původcem moru včelího plodu (Genersch 2008). V roce 1996 byl *B. larvae* reklasifikován na *Paenibacillus larvae larvae* (Hansen a Brødsgaard 1999a).

Poprvé byl tedy mor včelího plodu zaznamenán v USA v roce 1906. V roce 1989 vypukla rozsáhlá epidemie v Jižní Americe v Argentině. Protože od invaze *P. larvae* do včelstva trvá nejméně 2-4 roky, než se projeví příznaky onemocnění (Hrabák 2011), je zřejmé, že patogen zde byl přítomen již mnoho let předtím (Hansen a Brødsgaard 1999a). V současné době je onemocnění MVP rozšířené téměř po celém světě. Výskyt není hlášen pouze ze subsaharské oblasti v Africe a z Indie. V Evropě je morem plodu postiženo průměrně 3 – 10 % včelstev, v některých oblastech se udává napadení až 40 %. Nepříznivá situace je v sousedních zemích (Polsko, Rakousko), nejasný je stav na Ukrajině a v dalších zemích jihovýchodní Evropy (Titěra 2005). V České republice je v současné době největší rozšíření moru včelího plodu od druhé světové války (Peroutka 2009).

Zásadní vliv na šíření MVP má samotné včelařství a jeho vývoj. V přirozených podmínkách byly včely odkázány na vhodné dutiny, přičemž densita včelstev byla nízká. Moderní velkochovy včel, při nichž dochází ke značné kumulaci včelstev

na jednom místě, nepochybně vytváří podmínky pro výskyt a přenos včelích chorob (Fries a Camazine 2001).

Na Slovensku byl zaznamenán první výskyt moru včelího plodu v roce 1939. Lze předpokládat, že se sem choroba rozšířila až po zavedení moderní formy včelaření v rozběrných úlech s rámký a prefabrikovanými mezistěnami. Při včelaření v košnicích na divokém díle nebyly klinické příznaky MVP zjištěny. I původní název choroby American foulbrood (Americká hniloba plodu) je odvozený od úlu Amerikán, v němž se poprvé začaly využívat rámký s mezistěnami (Bencúr 2012).

## 1.3 Epizootologie moru včelího plodu

### 1.3.1 Původce moru včelího plodu

Původcem onemocnění MVP je bakterie *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (dále pouze *P. larvae*). Jde o fakultativně anaerobní, gram-pozitivní bakterii tyčkovitého, někdy mírně zakřiveného tvaru se zaoblenými konci, značně proměnlivé velikosti (šířka - 0,5  $\mu\text{m}$ , délka 1,5 až 6  $\mu\text{m}$ ). Vegetativní formy se vyskytují samostatně nebo v řetězcích (příloha 1). Bakterie vytvářejí elipsoidní spory, které jsou vysoce odolné vůči teplu i chemikáliím (Terrestrial Manual... 2008). V testech přežívání bylo prokázáno, že si spory zachovávají klíčivost až 35 let, v reálných podmínkách pak tato doba může být podstatně delší, až 70 let (Hansen a Brødsgaard 1999a).

Bakterie *P.larvae* napadá pouze larvální stádia včel, přičemž náchylnost larev k infekci se snižuje s věkem larev. Larvy mladší než 36-48 hodin jsou nejnáchylnější k infekci prostřednictvím příjmu spor potravou. Jedinci starší než 53 hodin už nemohou být nakaženi (Woodrow a Holst 1942; Brødsgaard et al., 1998; Crailsheim a Riessberger-Gallé, 2001).

### 1.3.2 Průběh infekce

Larva přijme spory spolu s infikovanou potravou. Spory zůstanou ve střevě neaktivní, dokud larva nepřestane přijímat potravu (před zakuklením), čímž se sníží hladina glukózy a klesne acidita, která jinak zpomaluje růst bakterie (Lucký 1984). Poté spory v žaludku vyklíčí, vegetativní buňky se množí a procházejí stěnou žaludku pomocí fagocytózy. Bakterie se následně dostanou do hemolymfy, a tak dojde k rozšíření po celém těle. Buňky tukového tělesa, epitel vzdušnic a kutikula jsou místem bujného množení bakterií. V průběhu infekce produkuje *P.larvae* velké množství

extracelulárních proteáz, které inhibují včelí imunoproteiny. To vede v průběhu asi 234 hodin k úhynu a dezintegraci larvy (Bzdil 2010). Buňky napadených tkání ztrácejí pevné obrysy, mění se v zrnitou strukturu a rozplývají se (Veselý et al. 2003). V jedné rozložené larvě je možno nalézt na konci procesu až  $2,5 \cdot 10^9$  spor (Bzdil 2010).

### ***1.3.3 Symptomy onemocnění***

Obecně je pro včasné a účinné zakročení proti chorobám nutná rychlá a přesná identifikace. Klinické příznaky včelích chorob mohou být zjevné až po delším časovém období. Varovným indikátorem může být změna chování včel a oslabení včelstva. V případě podezření je třeba provést prohlídku, zda jsou zjevné klinické příznaky MVP. Ty jsou velmi různorodé a záleží na přítomném genotypu, stádiu onemocnění a síle včelstva (popř. rezistenci vůči MVP). Larvy mohou být usmrceny rychle v brzkém věku, kdy jsou ještě v nezavíčkované plodové buňce. Tyto mrtvé larvy mohou být odstraněny včelami dělnicemi díky jejich vrozenému čistícímu pudu. Častěji však dochází k usmrcení larvy po zavíčkování (Terrestrial Manual... 2008). Na možnost nákazy pak může upozornit mezerovitý vzhled plástu se zavíčkovaným plodem, který je způsobený střídáním zdravých zavíčkovaných buněk, nezavíčkovaných buněk s pozůstatky mrtvých larev a prázdných buněk (příloha 2). Víčka buněk, které obsahují nemocnou larvu, jsou mokvající, tmavá a mírně propadlá, některá mohou být již vlivem pokročilé infekce děravá. Také larva nebo kukla mění barvu a konzistenci. Prvním příznakem nakažené larvy je změna barvy perleťově bílé na barvu šedobílou až šedožlutou. Druhý týden se ztrácí článkování těla a zaniká vnitřní napětí orgánů těla. Za čtyři až pět týdnů, kdy měla být již zdravá včela dávno vykuklená, mění se tělo larvy v kašovitou tmavě hnědou hmotu. Za dalších pět až šest týdnů larva vysychá a mění se na tmavý „příškvár“ pevně přilepený na stěny buňky (Hanousek 1991).

## 2 Cíle práce

Stav vědeckého poznání problematiky moru včelího plodu je v současnosti na poměrně vysoké úrovni. České veterinární a výzkumné instituce však s novými poznatky pracují jen zřídka a mezi včelařskou veřejností se tak šíří útržkovité informace a mýty. Stěžejním cílem této práce je vytvořit ucelený přehled dosavadního výzkumu dané problematiky a poskytnout srozumitelnou interpretaci zásadních poznatků.

Úkolem praktické části této diplomové práce je zpracovat získané informace o výskytu původce moru včelího plodu ve včelstvech na území Olomouckého kraje, z let 2007–2012. První otázkou je, zda existuje řádová hodnota (stovky, tisíce, desetitisíce, statisíce) spor *Paenibacillus larvae* (zjištěné v úlové měli), při které je největší pravděpodobnost výskytu klinických příznaků. Dále budou porovnány vývoje stavu včelstev, u kterých byla zjištěna přítomnost spor *Paenibacillus larvae* bez klinických příznaků choroby. Nakonec, bude vyhodnocen případ včelaře, který aplikoval intenzivní obměnu díla jako ozdravnou metodu infikovaných včelstev.

Na základě vlastních výsledků a informací zjištěných z literatury, budou doporučeny možnosti prevence nákazy morem včelího plodu.

## 3 Kompilace vědeckých studií

### 3.1 Diagnóza moru včelího plodu

Diagnóza MVP je založena na identifikaci patogena. K tomu je nutné odebrat vzorky a provést laboratorní vyšetření. Otázkou však zůstává, jaký materiál je pro diagnostiku nejvhodnější. Gochnauer a Corner (1974) využívají ve své práci k detekci *P. larvae* pylových zásob. Hansen a Brødsgaard (1999b) doporučují provádět mikrobiologické vyšetření medu a postiženého plodu (larev). Bzdil (2010) popisuje navíc i vyšetření včelího vosku, mateří kašičky, plástů plodových i medových a také tamponových stěrů z prostředí. V České republice je včasná diagnostika MVP založena na vyšetření úlové měli (Titěra a Haklová 2003). Podle Přídala (2008) nelze hovořit o mikrobiologické analýze měli jako o diagnostické metodě. Pozitivní nález spor v měli nedokazuje existenci choroby. Úlová měl je součást prostoru, kde včelstvo žije, a jde tak pouze o důkaz infekčního tlaku z okolí. Vyvolat onemocnění může jedině přítomnost patogena v těle, zejména, je-li infekční tlak z okolí vysoký. Objektivně lze onemocnění prokázat mikrobiologickým vyšetřením plodu (larev). Podle von der Ohe (2003) lze pomocí bakteriologických vyšetření medu detekovat *P. larvae* ještě před klinickými příznaky MVP. Hornitzky a Karlovskis (1989) však tvrdí, že není vhodné pro vyšetření používat vzorky medu, protože u něj dochází k „falešně negativním“ výsledkům. To znamená, že při kultivaci nemusí být zaznamenán nárůst bakterií *P. larvae*, přestože včelstvo vykazuje zjevné klinické příznaky. Vysvětlení může spočívat ve skutečnosti, že med byl uložen ještě před tím, než bylo včelstvo infikováno (Gillard et al. 2008). Naopak metodou vyšetření dospělých včel bylo demonstrováno, že spory mohou být detekovány i ve včelstvech bez klinických příznaků. Tato „falešně pozitivní“ včelstva jsou infikována patogenem, ale klinické příznaky nejsou manifestovány. Podobné skutečnosti byly zjištěny i při vyšetření úlové měli. Při vyšších koncentracích spor  $10^4/g$  až  $10^5/g$  lze očekávat i klinické příznaky moru včelího plodu. Avšak je-li koncentrace spor  $10^2/g$  až  $10^3/g$ , jde o včelstva pod infekčním tlakem z okolí (např. sousedních nemocných včelstev) nebo o právě se rozvíjející nákazu (Přídala 2008). Z epidemiologického pohledu by tyto subklinické symptomy neměly být opomíjeny, protože mohou být zodpovědné za přenos nákazy.



### 3.2 Přenos bakterie *Paenibacillus larvae larvae*

Původci chorob, jejichž reprodukce a přežívání závisí na hostiteli, potřebují být přenášeni z hostitele na hostitele. Po čas průběhu infekce, kdy se patogen v hostiteli množí a oslabuje tak jeho fitness, je pro patogena nejdůležitější optimalizace jeho přenosu. Vertikálně přenosné choroby, kdy je patogen přenášen z jedné hostitelské generace (rodič) na druhou generaci (potomstvo), vytvářejí méně virulentní formy, s malým vlivem na fitness hostitele, protože rozmnožování hostitele je nezbytné pro přenos a přežití patogena. Horizontálně přenosné choroby, kdy je přenos patogena nezávislý na rozmnožení hostitele, mohou vytvořit formy s vyšší virulencí, a tudíž se značným negativním vlivem na fitness hostitele (Genersch 2010).

*Paenibacillus larvae* patří mezi velmi úzce specializované druhy parazitických bakterií. Úzká specializace tohoto patogena se projevuje ve vazbě na jediného konkrétního hostitele (včelu medonosnou) a synchronizaci životních cyklů obou organismů. Na základě těchto obecných poznatků se předpokládá, že *P. larvae* a včela medonosná žijí po tisíce let v koevoluci (Otten 2003). Mor včelího plodu byl dlouho považován za obligátně horizontálně přenosnou chorobu. Extrémně dlouhá životaschopnost spor *P. larvae* se považovala za evoluční adaptaci, která umožňovala bakterii přežít po úmrtí napadeného včelstva nepříznivé období bez hostitele a i po delší době infikovat nové včelstvo, které po čase obsadí volnou dutinu (strategie “sit and wait“) (Fries a Camazine 2001).

Systém horizontálního přenosu byl potvrzen mezi jedinci v rámci jednoho včelstva. Infekce se na samotné larvy přenáší potravou od dělnic krmíček nebo sporami, které zůstávají na dně plodových buněk po vykuklení předchozích generací (Terrestrial Manual... 2008). Tyto způsoby přenosu potvrzují Goodwin et al. (1996), kteří zaznamenali, že sporami jsou nejvíce zatíženy včely na plodových plástech, a následně včely na medných plástech. Včely odebrané z česna jsou sporami zatíženy nejméně. Nerovnoměrnou distribuci spor mezi dospělými včelami ve včelstvu uvádí také Crailsheim a Riessberger-Gallé 2001. Včela medonosná prochází během života ve včelstvu různými funkcemi (Přidal 2005). Činnosti jako čištění buněk, krmení larev či snášení nektaru korelují s různou mírou rizika kontaktu s patogenem a jeho přenosem. Není tedy náhoda, že největší zatížení sporami *P. larvae* bylo zaznamenáno u osmidenních včel vykonávajících funkci “kojiček“, které jsou v nejužším kontaktu s potenciálně infikovanými larvami (Crailsheim a Riessberger-Gallé 2001).

Horizontální přenos MVP mezi včelstvy je však uskutečňován převážně včelaři, majících funkci kulturních vektorů (Lindström 2006). Nejčastějším způsobem horizontálního šíření je prodej a výměna plodových plástů, krmení medem obsahujícím spory či obchodování s oddělky a matkami. Marada a Přidal (2008) provedli podrobné šetření přenosu, kdy se jim podařilo až u 90 % pozitivních stanovišť prokázat způsob přenosu moru včelího plodu. Převážná většina, 87 % včelstev, byla morem postižena zaviněním včelařů, z nichž přibližně 29 % včelstev se nakazilo použitím infikovaných úlů a rámků.

Spory mohou přenášet také „včely zlodějky“, které pronikají do nemocí oslabených včelstev, „vylupují“ je a přinášejí do svých včelstev infikované medné zásoby. Opačným případem jsou „toulavé včely“, které pronikají do zdravých včelstev a za vstup „uplácejí“ včely strážkyně svými mednými zásobami, které mohou obsahovat spory původce MVP. Tyto dva případy jsou následkem vysokého zavčelení území (počtu včelstev na km<sup>2</sup>). Význam hustoty zavčelení území ve vztahu k horizontálnímu přenosu MVP prostřednictvím „vylupování“ dokumentují ve svém výzkumu Lindström et al. (2008). Zjistili, že „vylupování“ je důležitou transportní cestou mezi včelstvy na krátké vzdálenosti, a to ne pouze v rámci včelnice, ale i mezi sousedními včelnicemi až do vzdálenosti jednoho kilometru. Na tuto vzdálenost se spory ze zdroje (z nemocných nebo uhynulých včelstev) dostávají do včelstev sousedních v takovém množství, které u nich vyvolá onemocnění. Pokud jsou sousední včelstva ve vzdálenosti tři a více kilometrů, klinické příznaky se neprojeví. Pouze ojediněle se objeví mírně zvýšené množství spor. Marada a Přidal (2008) při své studii šíření moru zjistili, že sousední včelstva nebyla infikována již ve vzdálenosti větší než 500 m od zdroje nákazy. Mor včelího plodu se evolučně vyvinul za zcela jiných podmínek. V přirozeném systému jsou hnízdní dutiny limitujícím faktorem, protože včely o ně musejí konkurenčně soutěžit s jinými dutinovými druhy živočichů (vosami, sršni, strakapoudy, datli, sovami apod.). Dutiny osídlené včelami se nachází podstatně dále od sebe než úly pro chov včel. O přenosu *Paenibacillus larvae* v přirozeném prostředí neexistují žádné záznamy. Předpokládá se však, že z důvodu přirozené nízké density včelstev je pravděpodobnost pro horizontální přenos (vylupování, zalétávání toulavých včel) rovněž nízká (Fries a Camazine 2001). Legislativa České republiky nařizuje vyhledávání a utrácení rojů neznámého původu a divoce žijících včelstev (vyhláška č. 299/2003 Sb.) jako preventivní opatření proti přenosu MVP z divokých včelstev na včely chované. Domněnka, že volně žijící včelstva jsou nebezpečným zdrojem

nákazy, je však zcela neopodstatněná. Naopak, Hovorka (2006) při svých pozorováních zjistil, že divoká včelstva morem netrpí. Hornitzky et al. (1996) prokázali, že včely z divokých včelstev jen velmi zřídka obsahují detekovatelné množství spor. Goodwin et al. (1994) provedli vyšetření glycidových zásob divokých včel. Ze 109 vzorků bylo pouze 7 pozitivních (6,4 %) na přítomnost spor *P. larvae*. Taková prevalence je poměrně nízká v porovnání s prevalencí výskytu v glycidových zásobách u domácích včelstev. Podle uvedených autorů tudíž divoká včelstva nejsou pro včelaře příliš velkým rizikem šíření MVP.

U včel ze subsaharské oblasti, kde je chov domestikovaných včel vzácný (jsou zde převážně divoká včelstva) (Fries a Raina 2003), byly sice nalezeny spory *P. larvae* v medu, ale nikdy nebyly prokázány klinické příznaky MVP (Hansen et al. 2003). To lze vysvětlit tím, že v přirozených podmínkách přežívání *P. larvae* primárně závisí na vertikálním přenosu prostřednictvím vyrojení, tzn. na zachování fitness včelstva. Z pozorování Fries et al. (2006) je známo, že i některá infikovaná včelstva v domácích chovech zůstala silná, bez klinických příznaků. Toto potvrzuje, že *P. larvae* si v průběhu evoluce vytvořil strategii udržení nízké virulence, která patogenu zaručuje přežívání ve včelstvu. Lindström (2006) popisuje tuto strategii tak, že čas od času onemocní jedna larva a způsobí malou lokální nákazu v části včelstva, která po určité době odezní. Spory s dlouhou životaschopností pak zůstávají v neaktivním stádiu po dobu, než budou včelami znovu náhodně sebrány a podány s potravou náchylné larvě. Autor upozorňuje na nebezpečí včelařských metod, které mění cesty šíření *P. larvae* a zvyšují tak jeho infekční tlak. Domácí chov včel značně zvýhodňuje horizontální přenos původce MVP díky vysoké míře zavčelení (podpora „vylupování“), výměnou včelařského materiálu (oddělků, matek) a obchodování s medem. Nevědomě dochází k potlačování vertikálního přenosu *P. larvae* také při používání protirojových metod. Podpora horizontálního přenosu a bránění přenosu vertikálního může současnou nákazovou situaci dále zhoršovat tím, že dochází k selekci více virulentních forem *P. larvae* (Lindström 2006). Tato fakta jsou vysvětlením pro dosud neobjasněné situace z praxe českých včelařů a veterinárních pracovníků, které popisuje Hrabák (2011). Autor uvádí, že někdy je nákaza MVP akutní, to znamená, že jsou morem zasaženy celé plochy plodových plástů a jindy se klinické příznaky objevují omezeně, třeba pouze u dvou larev v celém včelstvu.

### 3.3 Obranné mechanismy včely medonosné vůči MVP

Spory bakterie *P. larvae*, mohou být přítomny v půdě, ve vodě, vzduchu, v medných zásobách (Gliński a Jarosz 2001). Propuknutí nákazy morem včelího plodu tak není závislé pouze na množství spor *P. larvae* přítomných v okolí či přímo ve včelstvu, ale souvisí také s obrannými schopnostmi včel. Ty spočívají ve schopnosti vyhnout se infekci a v míře rezistence či tolerance napadeného včelstva vůči danému patogenu. Experimenty s indukovanou infekcí ukázaly, že včelstvo je schopné infekci eliminovat (Hansen a Brødsgaard 1995). Včelstva mohou skladovat med s velkým množstvím spor *P. larvae* i po několik let, aniž by se projevil příznak moru včelího plodu. Hansen a Brødsgaard (1995) udávají, že odolná včelstva běžně překonají kontaminaci medu v hodnotách  $2\text{-}5 \times 10^5$  spor na gram medu. Včela medonosná má různé anatomické, fyziologické i behaviorální mechanismy, které zajišťují ochranu proti chorobám. Různá míra odolnosti je ovlivněna geneticky i podmínkami prostředí, např. silou včelstva, hygienickým chováním (čistící pud), antagonistickými mechanismy mikroflóry, množstvím dostupného nektaru nebo možností sbírat pyl (Otten 2003).

#### 3.3.1 Genetické mechanismy rezistence

Mezi patogenem a hostitelem probíhají tzv. koevoluční „závody ve zbrojení“, kdy obě strany vytvářejí vzájemné adaptace a protiadaptace (Townsend et al. 2010). Vývoj charakteru patogena (např. virulence) v jeho následných generacích je zcela nepředvídatelný. Včela se tedy musí stále evolučně vyvíjet tak, aby byl vztah s *P. larvae* udržen na rovnovážné úrovni (Dawkins a Krebs 1979).

Pokud by všichni jedinci ve včelstvu měli stejný genotyp náchylnosti k danému patogenu, byla by infekce fatální pro celé včelstvo (Sherman et al. 1998). Zásadní je tedy existence intrakoloniální genetické variability. Včelí matka se přirozeně páří v průměru se 12 trubci, může se však spářit až s více než 40 trubci (Richard et al. 2007). Dělnice, které jsou dcerami stejného otce, vytvářejí v rámci včelstva podrodiny (v jedné kolonii je podrodin tolik, s kolika trubci se matka úspěšně spářila). Tyto podrodiny vykazují různou míru odolnosti k patogenům, se kterými se koevolučně vyvíjejí (Sherman et al. 1998). Bylo provedeno mnoho výzkumů na včelách a mravencích, které prokázaly, že vyšší genetická diverzita snižuje míru infekce patogeny (Invernizzi et al. 2009). Palmer a Oldroyd (2003) potvrzují, že různé včelí podrodiny v rámci včelstva mají různou míru odolnosti vůči bakterii *P. larvae*.

Moderní včelařské metody využívají umělé inseminace včelích matek a záměrně zužují genetickou variabilitu pro selekci požadovaných vlastností (čistící pud, nižší agresivita apod.). Tímto však dochází k opomíjení cenných genů a značnému oslabování koevolučního mechanismu specifické rezistence.

### ***3.3.2 Behaviorální a fyziologické mechanismy rezistence***

Život ve skupinách či societách je všeobecně spojován se zvýšeným ohrožením parazity a chorobami, naopak však může být výhodou ve smyslu účinnější obrany. Boomsma et al. (2005) popisují obecný model, kdy shlukování jedinců usnadňuje přenos chorob v rámci kolonie, ale významně snižuje riziko přenosu infekce mezi koloniemi. Včela medonosná, žijící v trvalých koloniích je potenciálně ohrožena snadným intrakoloniálním přenosem patogenů prostřednictvím vzájemného krmení. V sociálním způsobu života včel se vyvinul sociální imunitní systém, který představuje efektivní prevenci před vznikem a šířením chorob.

Součástí antimikrobiální obrany včelí kolonie je propolis. Je nazýván také jako včelí tmel a je tvořený směsí pryskyřic, které včely sbírají v úžlabí pupenů květů a listů, dále pak včelího vosku, rostlinných silic, olejů a malého množství pylu. Včely propolisem dezinfikují stěny hnízda i veškerý povrch plástů. Tautz (2009) přisuzuje velký význam plástům jakožto jednoho z nejdůležitějších obranných mechanismů před patogeny. Zvláštní význam má při tom právě tenká vrstva propolisu, kterou jsou potaženy stěny buněk, a to především v plodišti.

Plodové plásty s každou generací včelích larev stárnou. V plodových buňkách zůstávají exuvie (tzv. „košilky“) a výkaly po vykuklených larvách, čímž plásty tmavnou a křehnou (Hepburn 1998). Tmavá až černá barva plástů je výsledkem dlouhodobé akumulace mnoha různých kontaminantů. (Free a Williams 2009). Voskové plásty se skládají převážně z uhlovodíků a esterů (Tulloch 1980), které snadno absorbují různé chemické látky. Smith a Wilcox (1990) zaznamenali ve včelím vosku obsah 35 různých toxických látek. Ve vosku mohou být absorbovány také spory plísní a bakterií.

V přirozených podmínkách přežívá včelí kolonie v průměru asi šest let. Když včelstvo uhyne, myši, zavíječi apod. odbourají voskové plásty a vyčistí tak dutinu pro jiné včelstvo (Gilliam a Taber 1991). Moderní včelařské technologie (rámky s prefabrikovanými mezistěnami) uměle prodlužují životnost a dobu používání plástů. Opakované používání plástů po několik let narušuje přirozené recyklační procesy a zvyšuje nebezpečí nákazy MVP (Gilliam 1985).

V přirozených podmínkách bylo pozorováno, že jak včelstvo roste, vytváří nové plásty, které se postupně stávají plodištěm a do starších plodových plástů jsou ukládány zásoby medu (Free a Williams 2009). Berry a Delaplane (2001) ve svých výzkumech zjistili, že včelí matka ploduje ve větší míře na nových plástech než na starých. Pomocí tohoto behaviorálního mechanismu se včelstvo vyhýbá případným negativním účinkům starých plástů na vývoj plodu.

Dalším velmi důležitým faktorem sociální rezistence je hygienické chování včel. Včelí dělnice čistí své tělo i ostatní včely (grooming) a nečistoty vynášejí z hnízda ven. Právě hygienické chování (čistící pud) znamená, že dělnice jsou schopny velmi rychle rozpoznat nemocné nebo uhynulé larvy, které odstraní z hnízda a důkladně vyčistí plodové buňky (Gliński a Jarosz 2001). V rezistentním včelstvu mohou být infikované larvy odstraněny dříve, než bakterie vytvoří spory (Woodrow a Holst 1942). Spivak a Reuter (2001) sledovali 18 hygienických včelstev a 18 nehygienických včelstev, která byla uměle infikována *P. larvae*. U všech nehygienických včelstev se projevil klinické příznaky onemocnění MVP, naproti tomu pouze sedm hygienických včelstev onemocnělo. Na tomto výzkumu bylo demonstrováno, že včelstva šlechtěná na čistící pud mohla být odolnější vůči moru včelího plodu než včelstva bez hygienického chování.

Mladé (osmidenní) včely, které mají na starost výchovu larev, jsou schopny nakažené či již uhynulé larvy požírat a jsou tak vystaveny vysokému infekčnímu tlaku. Autoři Crailsheim a Riessberger-Gallé (2001) prokázali schopnost adaptace dospělých včel na jejich povolání a s tím spojeným rizikem infekce *P. larvae*. V žaludku včelích dělnic „krmiček“ byl prokázán 100% inhibiční účinek. Zásadní roli zde hraje žaludek dospělých včel. Spory jsou odstraňovány z potravy pomocí česla (proventriculus). Česlo plní úlohu regulačního uzávěru, který umožňuje pohyb potravy z medného váčku do žaludku, ale ne naopak, a tím předchází kontaminaci potravy spory (Sturtevant a Revell 1953). Woodrow (1942) zjistil, že nejen u dospělých včel, ale již u larev starších než pět dnů je plně vyvinutá tzv. peritrofická membrána, přes kterou je penetrace bakterií velmi pomalá. Podle Gregorce a Bowena (1998) hraje tato peritrofická membrána zásadní roli v ochraně starších larev a dospělých včel před infekcí. Také Davidson (1973) zmiňuje, že dospělé včely jsou vůči *P. larvae* rezistentní díky střevnímu epitelu, který funguje jako fyzická a chemická bariéra. Otázkou rezistence dospělých včel vůči MVP se zabývali i Riessberger-Gallé et al. (2001), kteří zjistili, že extrakt ze žaludku dospělých včel obsahuje látku inhibující růst *P. larvae*

a bránící klíčení spor. Zvýšená produkce inhibičních látek je podle autorů pravděpodobně podpořena vyšším množstvím pylových zrn v potravě. Pyl obsahuje mikroorganismy, které fungují antagonisticky proti *P. larvae*. Tyto antagonistické mikroorganismy izolované ze žaludku larev i dospělých včel a z pylu zamezily v podmínkách *in vitro* tvorbě spor a šíření *P. larvae* ve včelstvu. Pyl v potravě, která byla podaná experimentálně infikovaným larvám ve stáří 6-18 hodin, významně snížil mortalitu těchto larev. Obsah pylu v potravě pro včelí larvy snižuje míru infekce larev, proto je rezistence jednotlivých kast spojena právě s výživou. Nejnáchylnější je larva včelí matky, v jejíž potravě je nejmenší podíl pylu. Larvy dělnic, které jsou krmeny více pylem, jsou náchylné méně a larvy trubců, v jejichž potravě je velký podíl pylu jsou nejodolnější (Rinderer et al. 1975). Behrens et al. (2010) svými výzkumy vylučuje vliv potravy jako jediného faktoru způsobujícího vyšší odolnost trubců. Rozdíl v míře rezistence mezi pohlavími autor vysvětluje rozdílnou mírou růstu trubčích a dělničích larev. V prvních pěti dnech mají larvy trubců nižší hmotnost než larvy dělnic. Také Sutter et al. (1968) se zabývali vlivem velikosti na odolnost včelích larev a uvádějí, že velikost těla může být důležitým faktorem pro patogenezi MVP. Larvy z rezistentní genotypové linie se lišily od náchylné linie právě v průměrné velikosti. Velikost a hmotnost včel je dána částečně geneticky a částečně prostředím tj. velikostí buňky a dostupnou potravou (Berry a Delaplane 2001). Jak plodové plásty stárnou, narůstá počet „košilek“, které zůstávají na dně a stěnách v plodových buňkách, což má za následek zmenšování průměru těchto buněk. Byly provedeny studie, které ukazují, že čím méně je místa v plodové buňce, tím se líhnou menší jedinci. Včely vychované na starém plodovém plástu vážily v průměru o 8,3 % méně než včely z nového plástu (Berry a Delaplane 2001). K podobnému výsledku dospěl i Abdellatif (1965), který zjistil 8% redukci tělesné váhy včelích dělnic vychovaných na starém plodovém plástu, kde bylo vychováno již 70 generací. Velikost a hmotnost včelích larev je prokazatelně ovlivněna stářím plodových plástů. Jak bylo popsáno výše, stáří plástů úzce souvisí s hygienou včelího hnízda a může zvyšovat nebezpečí akumulace spor bakterií. Je tedy pravděpodobné, že vyšší náchylnost k infekci *P. larvae*, kterou vykazují larvy s nižší hmotností či mírou růstu, souvisí se stářím plodových plástů, a tím zvýšeným infekčním tlakem v nejbližším prostředí vyvíjejících se larev. Stejná souvislost pak byla potvrzena i ve výzkumu Piccirilla a De Jonga (2002), kteří sledovali vliv zmenšených buněk starých plodových plástů na míru napadení roztočem *Varroa jacobsoni*.

Za hygienické chování se dnes považuje zejména výše popisované zjištění a odstranění nakaženého plodu. Včely jsou však schopny čistit různé části hnízda a snižovat tak koncentraci zárodků chorob. Přidal (2012) zaznamenal a fotograficky zdokumentoval, jak včely odstraňují staré včelí dílo vykousáním. Uvádí, že rozebrání přestárlého díla je chovatelům známo. Dosud však není prokázáno, zda toto činí všechna včelstva nebo jen ta se zvláštními dispozicemi pro hygienické chování.

Na druhé straně na včely působí faktory, které oslabují jejich sociální i individuální imunitu. Odolnost včel vůči moru včelího plodu může být snížena zejména parazitickým roztočem *Varroa destructor*, který nejen včelstva oslabuje, ale je považován i za možného přenašeče *P. larvae* (Titěra 2005). Dále může mít vliv stav životního prostředí a použití agrochemikálií na kulturách, které včely navštěvují. Nejvýznamnějším negativním činitelem však může být samotný chov včel a používané včelařské metody.

### 3.4 Možnosti potlačení moru včelího plodu

Vzhledem k proklamované nebezpečnosti této choroby byla v České republice zavedena přísná veterinární pravidla. Ještě donedávna platilo, že pokud se na stanovišti vyskytly klinické příznaky moru včelího plodu do 50 %, byla spálena jen tato klinicky pozitivní včelstva a zbylá včelstva byla po dobu jednoho roku sledována. V současnosti v případě potvrzení výskytu klinického stádia MVP nařídí příslušná Krajská veterinární správa utracení všech včelstev na stanovišti a likvidaci veškerého spalitelného materiálu (vyhláška č. 299/2003 Sb.). Radikální opatření, která mají za úkol mor včelího plodu zcela vymýtit, však nejsou opodstatněná. Švancer (1974) např. upozorňuje, že preventivní likvidací i zdravých včelstev v ohnisku dochází k odstranění nejen náchylných genotypů, ale i těch odolnějších. Tento postup tak likviduje i včelstva, která by byla díky svému genetickému vybavení schopna infekčnímu tlaku odolat (Přidal 2008).

Jak bylo již výše zmíněno (1.2.3. Symptomy a diagnóza moru včelího plodu), samotná přítomnost spor *P. larvae* ve včelstvu neznamena onemocnění MVP. Moderními detekčními metodami vyšetření různých materiálů (med, plásty, měl, stěry ze stěn úlu) lze zjistit různé hodnoty koncentrace spor. Přidal (2008) uvádí, že nízká koncentrace spor v měli ( $10^2/g$  až  $10^3/g$ ) může být důsledkem infekčního tlaku z okolí nebo právě se rozvíjející nákazy. Včelstva v tomto subklinickém stádiu jsou pouze podrobena veterinárnímu sledování, a je tedy pouze otázka, zda a kdy se objeví klinické



příznaky onemocnění. Avšak právě v těchto případech je třeba zavést účinná preventivní opatření proti dalšímu rozvoji nákazy.

V posledních letech bylo vynaloženo mnoho úsilí na vytvoření udržitelné strategie eradikace MVP, ale bez značného posunu kupředu. Použití antibiotik má mnoho úskalí. Pokusy tlumit mor antibiotiky a sulfonamidy jednoznačně prokázaly, že při takové terapii dojde pouze k dočasnému ústupu klinických příznaků, ale infekční tlak zůstává silný díky vysoké koncentraci životaschopných spor. Látky účinkují pouze na vegetativní formy bakterie, ale spory nezničí. Infekce proto může propuknout po skončení léčby znovu (Hrabák 2011). *Paenibacillus larvae* rovněž rychle získává vůči antibiotikům rezistenci (Titěra 2005). Navíc rezidua léčiv kontaminují med i ostatní včelí produkty. Použití antibiotik ve včelařství je proto v rámci Evropské unie zakázáno (European commission 2009).

Potenciální přírodní alternativou léčby MVP jsou výtažky z některých rostlin a esenciální oleje, u nichž jsou prokázány baktericidní účinky. U esenciálních olejů z rostlin jako *Citrus sinensis*, *Cinnamomum spp.*, *Cuminum cyminum*, *Eugenia spp.*, *Thymus vulgaris* or *Verbena sp.* (Floris a Carta 1990), *Cymbopogon citratus*, *Satureja hortensis*, *Lavandula intermedia*, *Mentha piperita*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* (Alippi et al. 1996), *Acantholippia seriphoides*, *Schinus molle*, *Minthostachys mollis*, *Tagetes minuta*, *Lippia turbinata* (Fuselli et al. 2006) byl prokázán značný inhibiční účinek na *P. larvae*. Tyto látky však mají toxický účinek i na samotné včely (Flesar et al. 2010). Prozatím není vyřešena metoda dávkování a není prokázána dostatečná účinnost v praxi.

Už přibližně 40 let probíhá výzkum prospěšných probiotických bakterií v žaludku včely medonosné, které potlačují mor včelího plodu. Tuto biologickou metodu je však možno použít spíše jako podporu na posílení zdraví a kondice včelstev, nikoliv k léčbě (Dubná in Přidal 2009).

Mnoho výzkumů směřuje ke šlechtění odolných kmenů včel, zejména v souvislosti s hygienickým chováním (např. Brødsgaard a Hansen 2003). Selekcí požadovaných vlastností však dochází ke snížení genetické variability a značnému oslabování specifické rezistence (kapitola 1.3.1. Genetická rezistence).

Klíčem k úspěšnému potlačení moru včelího plodu může být lepší pochopení systému vztahů patogen-hostitel v průběhu infekce. Je třeba zkoumat, za jakých podmínek přechází výskyt původce moru do klinického stádia onemocnění (hynutí

larev) a pochopit jeho reprodukční dynamiku v kontextu s reprodukční dynamikou včelstev a jejich díla (Linhart et al. 2009).

Fries et al. (2006) demonstrovali, že u včelstva, které je infikované, ale nevykazuje klinické příznaky, dochází vyrojením k ozdravení. V roji z takového včelstva bylo zaznamenáno značné snížení množství spor a nové larvy nebyly infikovány. Naproti tomu roj ze včelstva, které bylo v klinickém stádiu, vykazoval nejprve snížení infekce, ale po čase se u něj choroba opět projevila. Z toho vyplývá, že rojení klinicky nemocných včelstev představuje úspěšný vertikální přenos choroby, zatímco rojení pouze infikovaných včelstev může být prostředkem eliminace onemocnění MVP. Lindström (2006) ve svých výzkumech zjistil, že ke snížení infekčního tlaku dochází po vyrojení jak u včelstev bez klinických příznaků, tak s manifestovanými klinickými příznaky. Autor uvádí, že žádný z rojů nevykazoval klinické příznaky ani po delší době. Roj nemá žádné larvy, které by mohly být infikovány přenášenými spory dříve, než je většina kontaminované potravy z mateřské kolonie zkonzumována.

Již za dob Marie Terezie se místy vyskytovalo onemocnění včel, jehož popis odpovídá dnešní diagnóze moru včelího plodu. Tehdejší významný slovinský včelař Anton Janša přišel na to, že včelstva mohou být vyléčena prostřednictvím přemetení do jiného úlu a vyhladovění, přestože v té době ještě nebylo o moru včelího plodu téměř nic známo (Šivic 2003). Oficiálně tuto metodu, která se nazývá „shook-swarm“ nebo „shaking method“, poprvé představil saský vědec Schirach v roce 1769. Ve 20. století pak byla znovu objevena McEvoyem (Hansen a Brødsgaard 2003). V novodobém pojetí jde o přemístění dospělých včel do čistého úlu a spálení plodových plástů s infikovanými larvami. Než přemístěné včely vytvoří nový plod, stihnou strávit všechn kontaminovaný med, který si s sebou nesly. Někdy se doporučuje nechat včely v pozorovacím boxu při venkovní teplotě (Matheson 1992) nebo v chladné místnosti, tak aby chlad urychlil spotřebu zásob v medném váčku (Ritter 1996). Poté jsou včely přemístěny na rámky s novými mezistěnami. Tato včelařská metoda, která napodobuje přirozené vyrojení v kombinaci se spálením nakažených plodových plástů a desinfekcí náradí je efektivním způsobem léčby MVP. Dánští vědci Hansen a Brødsgaard (2003) potvrzují významný pokles množství spor *P. larvae* v takto ošetřených včelstvech. Ve Švédsku se tento systém používá od roku 1974 a výrazně snížil počet klinických případů MVP (Lindström 2006). Data z Nového Zélandu také ukazují, že pomocí metody umělého rojení dochází ke snížení počtu klinických případů a každý rok

se snižuje i počet infikovaných včelstev (Goodwin a Van Eaton 1999). Z německých studií je známo, že „shaking method“ byla úspěšná v eliminaci infekce *P. larvae* ve většině případů (Oehring 1998). Pernal et al. (2008) provedli rozsáhlý výzkum, ve kterém se soustředili na ohodnocení metody umělého rojení z ekonomického pohledu. Konstatovali, že toto opatření je finančně mnohem výhodnější a logisticky flexibilnější než pálení napadených včelstev a nahrazování je novými. Autoři doporučují pálit pouze značně infikovaná, slabá včelstva.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Sběr dat

Vyšetření včelstev na mor včelího plodu si může objednat kdokoliv. Protože je laboratorní rozbor finančně nákladný, je nařízen pouze v povinných případech, a to jedenkrát ročně. Provádí se u chovů s komerční produkcí matek a u chovů s komerční produkcí oddělků, u včelstev kočujících a včelstev určených pro přemístění mimo území kraje, u včelstev spadajících do ochranných pásem a v rizikových oblastech stanovených veterinární správou. Data evidují a archivují Krajské veterinární správy, které však tyto informace nemohou poskytovat, a to ani pro studijní účely. V rámci Olomouckého kraje byly osobně kontaktovány základní organizace Českého svazu včelařů (ZO ČSV), v jejichž okrscích se v posledních letech objevila ohniska moru včelího plodu. Podařilo se získat údaje z Olomoucka, Šternberska, Šumperska a Konicka.

Ze včelařské praxe jsou známé včelařské metody, které by mohly sloužit jako preventivní a v některých případech také jako ozdravná opatření. Bylo zaznamenáno několik ústních sdělení o pozitivních výsledcích aplikace těchto metod, ale doposud se je nepodařilo exaktně prokázat. Pro tyto účely byly použity případy dvou včelařů, kteří si v průběhu aplikace „ozdravné“ metody nechali provést kontrolní vyšetření doložené laboratorními protokoly.

V současnosti se u nás pro vyšetření na přítomnost *P. larvae* používá vosková měl, což jsou drobné úlomky plástů a plodových víček, které padají na dno úlu. Měl se odebírá z podložek vložených na dno úlů. Pro jedno vyšetření je potřeba asi 1,5 g měli. Vzorek pro vyšetření je možno smísit až z 25 včelstev mimo ochranná pásma, v ochranných pásmech je dovoleno mísit vzorky maximálně z 10 včelstev. Vždy se směsují pouze vzorky od jednoho včelaře, z jednoho stanoviště (Titěra 2009). Odebrané vzorky se posílají do některé z akreditovaných laboratoří. K laboratornímu vyšetření se používá klasická mikrobiologická kultivační metoda. Nejnižší detekovatelné množství je 100 spor v jednom gramu vzorku ( $10^2$ /g).

## 4.2 Zpracování dat

Z laboratorních protokolů byly vypsány všechny pozitivní nálezy ( $\geq 10^2/g$ ) a zapsány číselnou hodnotou jako stav v roce 1. Tyto jednotlivé případy pak byly vyhledány v protokolech následujícího roku. Pokud byly při veterinární prohlídce nalezeny klinické příznaky a došlo ke spálení včelstev, byly tyto případy v roce 2 označeny jedničkou. Pokud klinické stadium nebylo prokázáno a v dalším roce kleslo množství spor v měli pod hranici detekce, byly tyto případy označeny nulou. Pokud byla včelstva opakovaně kontrolována s pozitivními nálezy, ale bez klinických projevů i v dalších letech, byly u těchto případů zapsány číselné hodnoty množství spor jako stav v roce 2, v roce 3 a v roce 4. Právě u těchto případů lze sledovat vývoj onemocnění v dalších letech. Stejným způsobem byla zaznamenána data z případu experimentální aplikace „ozdravné“ metody. Pro další práci s daty byla provedena logaritmická transformace.

Data byla zaevidována v tabulkovém editoru Microsoft office Excel. Tabulky evidence dat jsou přiloženy v Příloze.

Pro další zpracování dat byl použit statistický software NCSS 2007. Hypotéza ( $H_0$ ), že střední hodnoty se neliší mezi případy s klinickými příznaky a bez klinických příznaků, byla testována neparametrickým Mann-Whitney testem na hladině významnosti 5 %. Výsledky byly graficky znázorněny pomocí krabičkového grafu. Grafické znázornění rozložení hodnot a stanovení řádových hodnot bylo provedeno pomocí histogramu. Další grafy byly vytvořeny v tabulkovém editoru Microsoft office Excel.

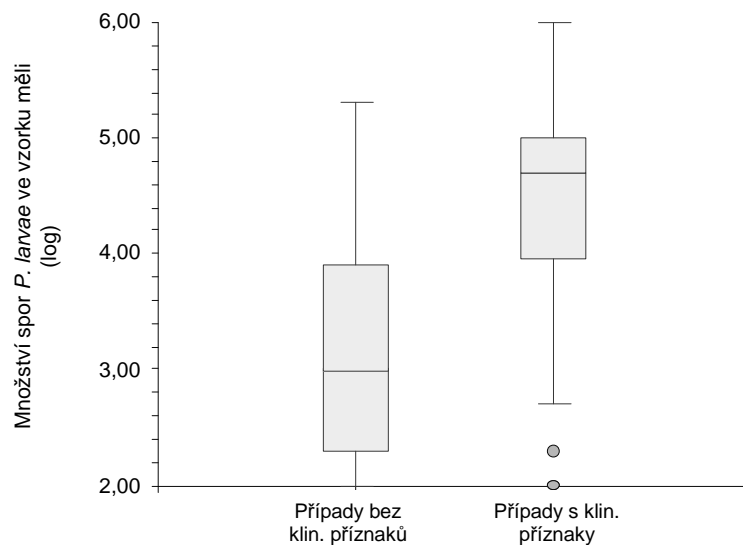
## 5 Výsledky

Ze zkoumaného souboru 126 případů byly u 85 případů prokázány klinické příznaky a tato včelstva byla spálena. U zbylých 41 případů nebyly při veterinárních vyšetřeních klinické příznaky nalezeny a množství spor v měli v následujícím roce kleslo pod detekovatelnou míru  $10^2/g$ . Průměrné zastoupení klinických případů bylo 73 % a průměrné zastoupení případů bez klinických příznaků bylo 27 % (tab. 1).

**Tab. 1 Počet a procentuální zastoupení případů s klinickými příznaky a bez klinických příznaků**

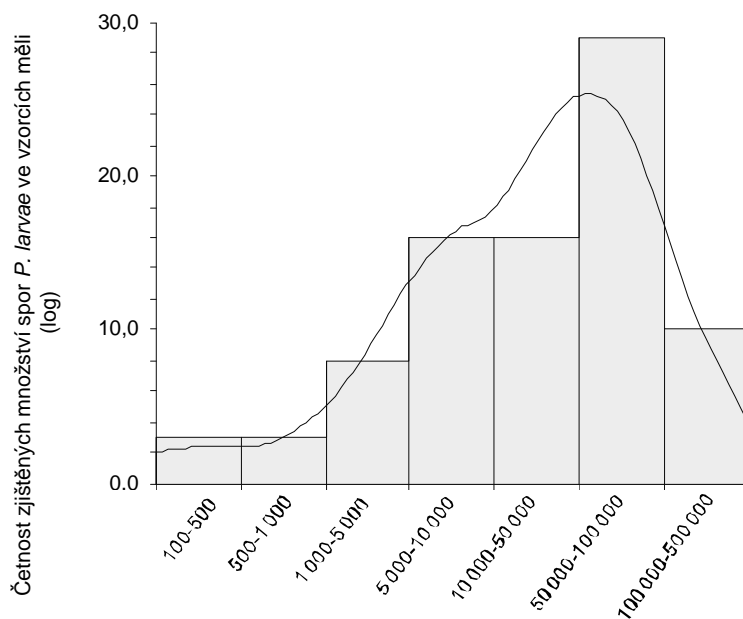
Lokalita	Počet případů	Počet klinických případů	Počet případů bez klin. příznaků	Zastoupení klinických případů	Zastoupení případů bez klinických příznaků
Domašov	5	5	0	100,0%	0,0%
Konice	45	29	16	64,4%	35,6%
Olomouc	44	29	15	66,0%	34,0%
Šumperk	19	14	5	73,7%	26,3%
Velký Újezd	13	8	5	61,5%	38,5%
Počet celkem / průměrné zastoupení	126	85	41	<b>73,0%</b>	<b>27,0%</b>

Střední hodnota (medián) množství spor *P. larvae* v měli je 3 (log) tj. 1 000 u případů bez klinických příznaků a 4,7 (log) tj. 50 119 u klinických případů. Rozdíl mezi mediány množství spor v případech bez klinických příznaků a v případech s klinickými příznaky je signifikantní (DF=1; Z=-6; P<0,05) (obr.1).

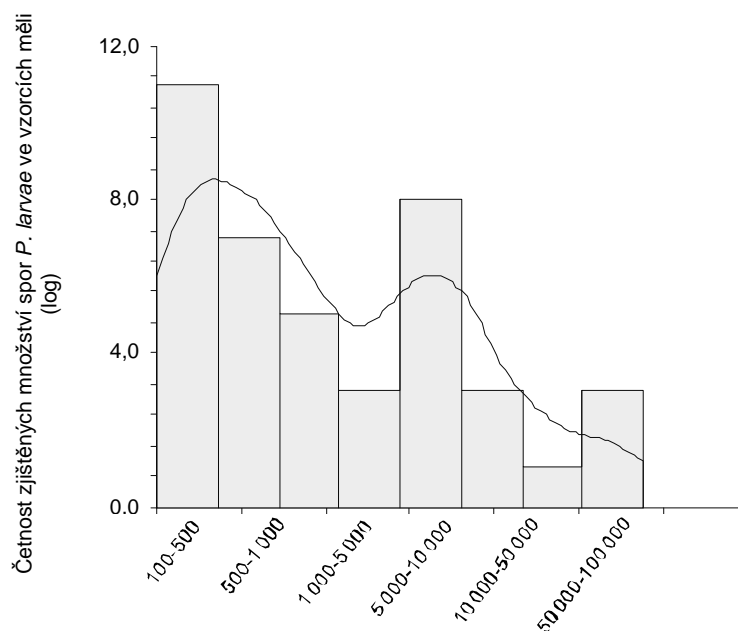


**Obr. 1** Množství spor *P. larvae* ve vzorku měli u případů bez klinických příznaků a u případů s klinickými příznaky (DF=1; T=-8; P<0,05; n<sub>bez klin. příznaků</sub>=41; n<sub>s klin. příznaky</sub>=85)

Klinické stádium nastává zpravidla při hodnotách spor v měli 50 000–100 000 tj. v řádu  $10^4/g$ – $10^5/g$  (obr. 2). Naopak při množství spor do 5 000 tj. do řádu  $10^3/g$  je největší pravděpodobnost životaschopného přežívání včelstva i v dalších letech bez klinických příznaků (obr. 3).

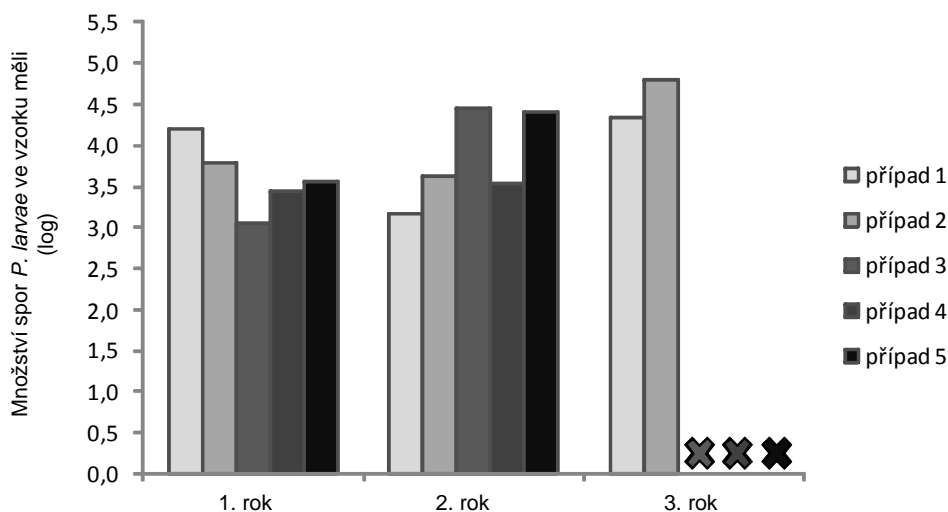


**Obr. 2** Histogram distribuce množství spor *P. larvae* u případů s klinickými příznaky



**Obr. 3** Histogram distribuce množství spor *P. larvae* u případů bez klinických příznaků

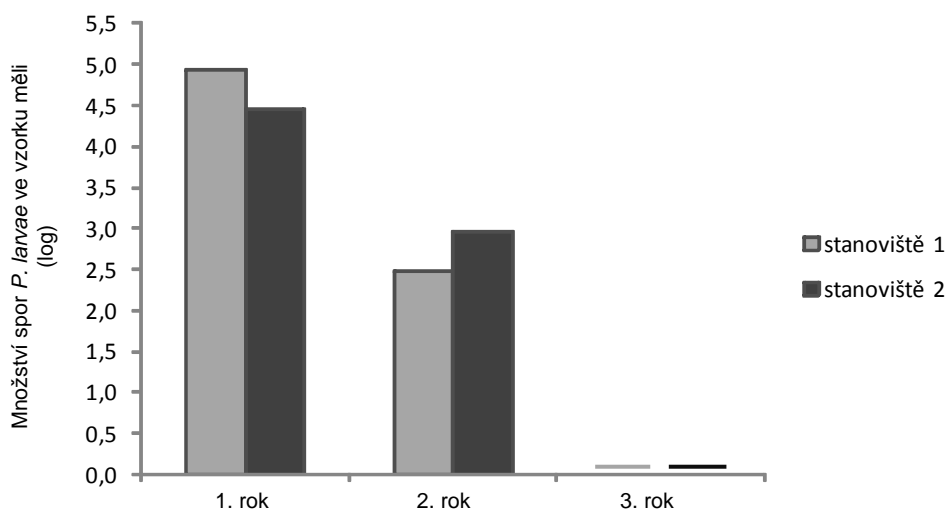
Ve zkoumaném souboru se vyskytlo sedm případů, u kterých byly pozitivní nálezy spor v měli v hodnotách  $10^3/g$  až  $10^4/g$ , ale nebyly u nich zaznamenány klinické příznaky. Pět případů vykazovalo, více či méně strmý, rostoucí trend množství spor v měli. Během dvou až tří let vzrostla míra infekce na hodnoty, kdy došlo i k manifestaci klinických projevů a včelstva byla spálena (obr. 4).



**Obr. 4** Vývoj infekce *P. larvae* u pěti případů v průběhu tří let bez zásahů (pozn. křížky v grafu znamenají, že včelstva byla spálena)

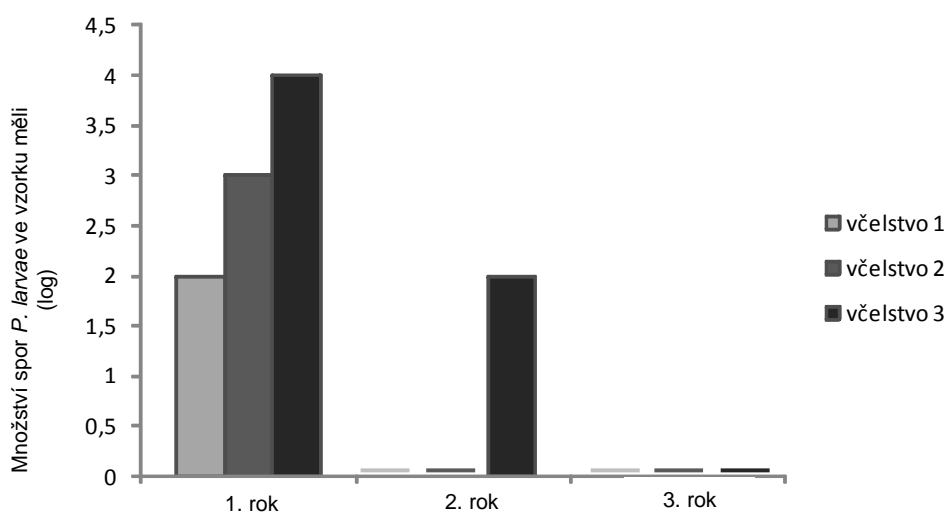


U dvou případů se projevil klesající trend, kdy během tří let došlo k poklesu množství spor v měli až pod hranici detekce  $10^2/g$  (obr. 5). U těchto případů jde o dvě stanoviště téhož chovatele, který slovně doložil, že aplikoval metodu obměny díla a dezinfekci příslušenství.



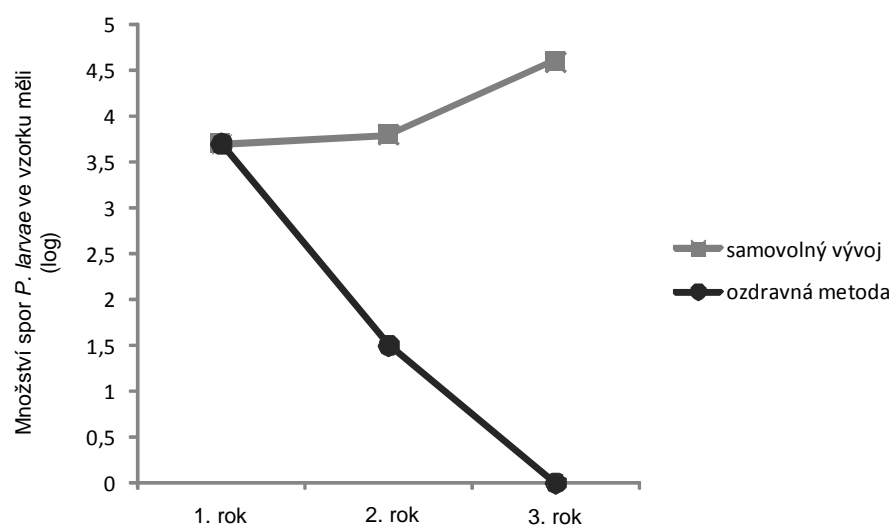
**Obr. 5** Průběh infekce *P. larvæ* na dvou stanovištích v průběhu tří let při aplikaci obměny díla

U tří včelstev druhého chovatele, který doložil aplikaci „intenzivní obměny díla“ byl v průběhu tří let rovněž prokázán pokles množství spor v měli až pod hranici detekce  $10^2/g$  (obr.6).



**Obr. 6** Průběh infekce *P. larvæ* u tří včelstev v průběhu tří let při aplikaci intenzivní obměny díla

Z porovnání případů ponechaných samovolnému vývoji a případů, u kterých bylo obměněno dílo, vyplývá prokazatelný rozdíl průběhu onemocnění (obr. 7).



**Obr. 7** Průběh nákazy u případů ponechaných samovolnému vývoji a u případů, u kterých byla aplikována obměna díla

## 6 Diskuze

Mor včelího plodu je považován za paradigma horizontálně přenosné, a tedy vysoce virulentní včelí choroby. Ve zkoumaném souboru však bylo v průměru 27% zastoupení případů infikovaných včelstev, která zůstala silná bez klinických příznaků. Tyto případy mohou souviset se vzdáleností mezi daným stanovištěm a zdrojem spor (nemocných nebo uhynulých včelstev). Lindström et al. (2008) zjistili, že pokud jsou včelstva ve vzdálenost tři a více kilometrů, někdy se objeví mírně zvýšené množství spor, ale nikdy se neprojeví klinické příznaky. Mohlo tedy jít o nízký infekční tlak patogena z okolí, kterému byla včelstva schopná odolat. Jiným vysvětlením může být, že u těchto případů vytvořil původce MVP méně nakažlivé formy, které hostitele neusmrcují, aby mohlo dojít k vertikálnímu přenosu prostřednictvím vyrojení. Studie Friese et al. (2006) prokazují, že *P. larvae* může vytvářet kmeny s různou mírou virulence a může tak být přenášen nejen horizontálně, např. při „vylupování“, ale také vertikálně prostřednictvím vyrojení silného „zdravého“ včelstva.

Výsledky této orientační studie potvrdily, že klinické příznaky jsou spojeny s množstvím spor v řádu desítek tisíců a více. Marada a Přidal (2008) také udávají stupeň nákazy  $10^3/g$  a  $10^4/g$  jako klinický. Naopak při množství v řádu stovek spor bylo zjištěno, že včelstva přežívají bez známek onemocnění. Uvedení autoři zjistili, že v případech nákazy stupněm  $10^2/g$  lze obměnou včelího díla a desinfekcí příslušenství onemocnění potlačit. Shodné výsledky publikoval i Přidal (2008), který uvádí, že nízká koncentrace spor v měli ( $10^2/g$  až  $10^3/g$ ) může být způsobena mírným infekčním tlakem z okolí, (ze sousedních včelstev) a onemocnění se nemusí nikdy projevit. Tato hodnota však může být příznakem právě se rozvíjející nákazy. Také Titěra (2009) potvrzuje, že při nálezů stovek spor může jít o začátek infekce, kterou lze ještě odvrátit.

Marada a Přidal (2008) v praxi potvrdili, že v případech nákazy stupněm  $10^2/g$  lze obměnou včelího díla a desinfekcí příslušenství onemocnění potlačit.

V mnou zkoumaném souboru se vyskytlo sedm případů, u kterých byly pozitivní nálezy spor v měli ve vysokých hodnotách  $10^3/g$  až  $10^4/g$ , ale přesto u nich nebyly zaznamenány klinické příznaky. U pěti těchto případů došlo během následujících let k nárůstu míry infekce, kdy došlo i k manifestaci klinických projevů a včelstva byla spálena. U zbývajících dvou byla aplikována obměna díla a dezinfekce příslušenství. Díky těmto zásahům došlo k postupnému snižování infekce, kdy ve třetím roce byly

výsledky vyšetření na přítomnost *P. larvae* v měli negativní. Také experimentální „ozdravný zásah“ u sledovaného včelaře potvrdil význam hygieny díla ve vztahu k vývoji onemocnění morem včelího plodu. To je v souladu se studií Přidala (2008), který zjistil v chovech Ing. Sedláčka přítomnost spor *P. larvae*, avšak bez klinických příznaků MVP. Vzhledem k pečlivě vedenému chovu s aplikací metod intenzivní obměny díla se podařilo chovateli předejít propuknutí nákazy. Van Eaton (2000) apeluje, že pravidelná obměna starých plástů je nezbytně důležitou složkou prevence onemocnění morem včelího plodu.

Linhart et al. (2009) popisují „Rašovskou metodu“ včelaření, která je založena na přirozené dynamice včelího díla divoce žijících včel. Autoři prokázali, že včelstva žijící v přirozených podmínkách se dvakrát (nejméně však jednou) ročně přesouvají na panenské dílo (příloha 3). Důsledná hygiena díla snižuje infekční tlak původce v prostředí hnízda (úlu) tak, že nedosáhne mezní hodnoty pro klinickou manifestaci MVP a jiných mikrobiálních infekcí. Oproti „přemetání včel“, které je provozně i finančně nákladné, „Rašovská metoda“ umožňuje každoroční obměnu všech plástů v plodišti, a tak kontinuálně udržuje žádoucí hygienu.

## 7 Závěr

Po celém světě bylo provedeno mnoho výzkumů zabývajících se morem včelího plodu z různých aspektů. O této včelí chorobě je tedy již mnohé známo, česká veterinární praxe však není s těmito vědeckými poznatky v souladu. Propuknutí nákazy morem včelího plodu souvisí s obrannými schopnostmi včel, a to nejen individuálními, ale hlavně s tzv. sociální imunitou včelstva. V průběhu koevolučního vývoje včely a bakterie *P. larvae* se specificky formovaly vztahy hostitele a patogena. Včelařská praxe v mnoha ohledech narušuje přirozenou rovnováhu těchto vztahů, čímž napomáhá šíření a vzniku onemocnění.

Bylo prokázáno, že bakterie *P. larvae* vytvářejí kmeny s různou mírou virulence v závislosti na zvolené strategii přenosu (horizontální nebo vertikální). Možnost horizontálního přenosu patogena je spojena se vzdáleností mezi včelstvy, resp. vzdáleností mezi včelařskými stanovišti. Nákaza horizontální cestou je nejvíce pravděpodobná do vzdálenosti půl kilometru až jeden kilometr. Nepřirozeně vysoká hustota zavčelení některých území tak usnadňuje horizontální přenos, který je spojený s vysokou mírou virulence patogena. Za těchto podmínek se choroba šíří epidemicky. V oblastech s nízkou hustotou včelstev se *P. larvae* šíří vertikální cestou prostřednictvím rojení. Aby došlo k rojení, musí být včelstvo v dobré kondici. Pro vertikální šíření patogen vytváří méně virulentní formy, které infikované včelstvo nezabíjí. Takové případy se při veterinárním vyšetření mohou projevit zvýšeným množstvím spor *P. larvae*, ale zřídka kdy se projevují klinické příznaky. Tato fakta vysvětlují přítomnost tzv. subklinických případů ve studovaném souboru, u kterých byl pozitivní nález spor v měli bez klinických příznaků, jenž v následujícím roce klesl pod hranici detekce. Mohlo jít o přítomnost kmenů *P. larvae* s vertikálním přenosem nebo byl zdroj spor ve větší vzdálenosti než je optimální vzdálenost pro horizontální přenos a daná včelstva dokázala odolat nízkému infekčnímu tlaku. Výše uvedené skutečnosti také odpovídají na často kladenou otázku, proč v některých oblastech propukají epidemie a v jiných oblastech (často i sousedních katastrálních územích) se nákaza nikdy neprojevila.

Moderní včelařské metody často brání uplatnění genetické a behaviorální rezistenci včel. Stěžejní roli pravděpodobně hraje hygiena včelího díla. V úlovém chovu včel se obvykle plásty používají po více let. Divoká včelstva mají

přirozený cyklus, kdy během roku obnoví všechny plásty, čímž snižují infekční tlak patogena v prostředí hnízda. Všechny výzkumy zaměřené na možnosti prevence a léčbu moru včelího plodu pomocí přemetení (tzv. „shaking method“) přinesly pozitivní výsledky. Také výsledky této práce potvrzují, že intenzivní obnova díla má prokazatelný ozdravný účinek. Většina případů v subklinickém stádiu (s pozitivním nálezem spor v měli, bez klinických příznaků) je ponechána bez jakýchkoli preventivních opatření a je tedy pouze otázkou, zda a kdy se objeví klinické příznaky onemocnění. Avšak právě v těchto případech je třeba zavést účinná opatření proti dalšímu rozvoji nákazy. Zde je možné doporučit radikální obnovu díla prostřednictvím přemetení včel na mezistěny, do desinfikovaných nebo nejlépe do nových úlů. Zcela žádoucí je pak začlenění včelařských metod, které umožní obměnit pravidelně každý rok všechny plásty v plodišti. Současné pálení včelstev by tak mělo být pouze prostředkem pro likvidaci zvláště závažných případů.

## 8 Literatura

Abdellatif M. A. 1965. Comb cell size and its effect on the body weight of the worker bee, *Apis mellifera* L. American Bee Journal. 105: 86–87.

Alippi A. M., Ringuelet J. A., Cerimele E. L., Re M. S., Henning C. P. 1996. Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease. Journal Herbs Spices and Medical Plants. 4: 9–16.

Behrens D., Forsgren E., Fries I., Moritz R. F. A. 2010. Lethal infection thresholds of *Paenibacillus larvae* for honeybee drone and worker larvae (*Apis mellifera*). Environmental Microbiology. 12: 2838–2845.

Bencúr M. 2012 [cit. 2012–4–2]. Klub Šanca pre včely. Našapr@vda Warre [internet]. Dostupné z: <http://naspravda.blogspot.com/2012/klub-sanca-pre-vcely.html>

Berry J. A., Delaplane K. S. 2001. Effects of comb age on honey bee colony growth and brood survivorship. Journal of Apicultural Research. 40.

Boomsma J. J., Schmid-Hempel P., Hughes W. O. H. 2005. Life histories and parasite pressure across the major groups of social insects. Insect Evolutionary Ecology. 6: 139–176.

Brødsgaard C. J., Ritter W., Hansen H. 1998. Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. Apidologie. 29: 569–578.

Brødsgaard C. J., Hansen H. 2003. Tolerance mechanism against American foulbrood in honeybee larvae and colonies. Apiacta. 2.

Bzdil J. 2010. Nové metody v diagnostice moru včelího plodu. Disertační práce.

Crailsheim K., Riessberger-Gallé U. 2001. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. Apidologie. 32: 91–103.

Davidson E. W. 1973. Ultrastructure of American foulbrood disease pathogenesis in larvae of the worker honey bee. Journal of Invertebrate Pathology. 21: 53–61.

Dawkins R., Krebs J. R. 1979. Arms races between and within species. Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences. 205: 489–511.

Duben J. 2010. Tisková zpráva ze dne 9.3. 2010. Státní veterinární správa České republiky.

European Commission. 2009 [cit. 2012–3–28]. Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC). 1831. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm\\_register\\_feed\\_additives\\_1831-03.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf).

Flesar J, Havlík J., Klouček P. et al. 2010. In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology*. 145: 129–133.

Floris I., Carta C. 1990. *In vivo* activity of *Cinnamomum zeylanicum* Nees essential oil against *Bacillus larvae* White. *Apicultura*. 6: 57–61.

Free J. B., Williams I. H. 2009. Factors determining food storage and brood rearing in honeybee (*Apis mellifera* L.) comb. *Physiological Entomology*. 49 (1): 47–63.

Fries I., Camazine S. 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*. 32: 199–214.

Fries I., Raina S. 2003. American foulbrood (*Paenibacillus larvae larvae*) and African honey bees (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Economic Entomology*. 96: 1641–1646.

Fries I., Lindström A., Korpela S. 2006. Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Microbiology*. 114 (3–4): 269–274.

Fuselli S. R., de la Rosa S. B. G., Gende L. B., Eguaras M. J., Fritz R. 2006. Antimicrobial activity of some Argentinean wild plant essential oils against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American foulbrood (AFB). *Journal of Apiculture Research*. 45: 2–7.

Genersch E. 2008. *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood - long since known and still surprising. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 3: 429–434.

Genersch E. 2010. American Foulbrood in honey bees and its causative agent *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: 10–19.



Gillard M., Charriere J. D., Belloy L. 2008. Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 99: 92–95.

Gilliam M. 1985. Microbes from apiarian sources: *Bacillus* spp. in frass of the greater wax moth. *Journal of Invertebrate Pathology*. 45: 218–224.

Gilliam M., Taber S. 1991. Diseases, pests, and normal microflora of honeybees, *Apis mellifera*, from feral colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58: 286–289.

Gliński Z., Jarosz J. 2001. Infection and immunity in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apiacta*. 36 (1): 12–24.

Gochnauer T. A., Corner J. 1974. Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. *Journal of Apicultural Research*. 13: 264–267.

Goodwin R. M., Perry J. H., Houten A. T. 1994. The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. *Journal of Apicultural Research*. 33: 209–212.

Goodwin R. M., Perry J. H., Haine H. M. 1996. A study on the presence of *Bacillus larvae* spores carried by adult honey bees to identify colonies with clinical symptoms of American foulbrood disease. *Journal of Apiculture Research*. 35 (3/4): 118–120.

Goodwin R. M., Van Eaton, C. 1999. Elimination of American Foulbrood Without the Use of Drugs. A Practical Manual for Beekeepers. National Beekeepers Association of New Zealand. New Zealand: Napier. 78 pp.

Gregorc A., Bowen I. D. 1998. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Cell Biology International*. 22 (2): 137–144.

Hanousek L. 1991. Začínáme včelařit. Praha: Brázda. 126 s. ISBN 8020901949.

Hansen H., Brødsgaard C. J. 1995. Field trials with induced infection of *Bacillus larvae*. Proceedings of the XXXIVth International Apicultural Congress of Apimondia, Lausanne: Apimondia Publishing House. 166–171.

Hansen H., Brødsgaard C. J. 1999a. Foulbrood diseases. *Apiacta*. 3: 69–83.

Hansen H., Brødsgaard C. J. 1999b. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*. 80 (1): 5–23.

Hansen H., Brødsgaard C. J. 2003. Control of American foulbrood by the shaking method. *Apiacta*. 2.

Hansen H., Brodsgaard C. J., Kryger P., Nicolaisen M. 2003. A scientific note on the presence of *Paenibacillus larvae larvae* spores in sub-Saharan African honey. *Apidologie*. 34: 471–472.

Hepburn H. R. 1998. Reciprocal interactions between honeybees and combs in the integration of some colony functions in *Apis mellifera* L. *Apidologie* 29: 47–66.

Hornitzky M. A. Z., Karlovskis S. 1989. A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. *Journal of Apiculture Research*. 28 (2): 118–120.

Hornitzky M. A. Z., Oldroyd B. P., Sommerville D. 1996. *Bacillus larvae* carrier status of swarms and feral colonies of honeybees (*Apis mellifera*) in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 73: 116–117.

Hovorka P. 2006 [cit. 2012–3–30]. Kontrola moru včelieho plodu - novozélandská metóda. Slovenská včelárska stránka [internet]. Dostupné z: <http://www.vcely.sk/index.php?name=News&file=article&sid=206>

Hrabák J. 2011. Mor včelího plodu (*Histolysis infectiosa pernicioso larvae apium*) (*Pestis apium americana*). *Včelařství*. 11: 367.

Invernizzi C., Peñagaricano F., Tomasco H. 2009. Intracolony genetic variability in honeybee larval resistance to the chalkbrood and American foulbrood parasites. *Insect. Soc.* 56: 233–240.

Lindström A. 2006 [cit. 2012–2–10]. Distribution and Transmission of American Foulbrood in Honey Bees. Doctoral thesis. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences [internet]. Dostupné z: <http://pub.epsilon.slu.se/1053/1/Avhandling.pdf>

Lindström A., Korpela S., Fries I. 2008. Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie*. 39: 515–522.

Linhart R., Bičík V., Vagera J. 2009 [cit. 2012–2–10]. Praktické využití přirozené dynamiky včelího díla při potlačování chorob a parazitóz včel a včelího plodu. Střední škola zemědělská a vyšší odborná škola Chrudim [internet]. Dostupné z: <http://www.szes.chrudim.cz/projekty/>

veda/clanek1/

Lucky Z. 1984. Nemoci včel. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 187 s.

Macek J. et al. 2010. Blanokřídlí České republiky I. – žahadloví. Praha: Academia. 524 s. ISBN 978–80–200–1772–7.

Malena M. 2007. Metodický návod SVS ČR číslo 2/2007 (Ře/585/2007). Státní veterinární správa České republiky.

Marada V., Přidal A. 2008. Zkušenosti s potíráním moru včelího plodu na okrese Hodonín. Moderní včelař. 1: 7–8.

Matheson A. 1992. Strategies for prevention and control of American foulbrood. American Bee Journal. 132: 399–402, 471–475, 534–537, 547.

Oehring M. 1998. Bakteriologische Überprüfung von Sanierungsmaßnahmen im Rahmen der Bekämpfung der Amerikanischen Faulbrut. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctor Medicinæ Veterinariæ durch der Tierärztliche Hochschule Hannover. 169 pp.

Otten C. 2003. A general overview on AFB and EFB pathogen, way of infection, multiplication, clinical symptoms and outbreak. Apiacta. 2.

Palmer K. A., Oldroyd B. P. 2003. Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. Naturwissenschaften. 90: 265–268.

Pernal S. F., Albright R. L., Melathopoulos A. P. 2008. Evaluation of the Shaking Technique for the Economic Management of American Foulbrood Disease of Honey Bees (*Hymenoptera: Apidae*). Journal of Economical Entomology. 101 (4): 1095–1104.

Peroutka M. 2009 [cit. 2012–3–28]. Rozhovor tajemníka Českého svazu včelařů pro ČTK [inetrnet]. Dostupné z: <http://www.novinky.cz/domaci/168248-ceskem-se-siri-vceli-mor-v-nejvetsi-mire-od-konce-valky.html>

Piccirillo G. A., De Jong D. 2002. Old brood combs are more infested by the mite *Varroa Jacobsoni* than new brood combs. *Apiacta*. 1.

Přidal A. 2005. Ekologie opylovatelů: vysokoškolská učebnice. 2. vyd. Brno: Lynx. 112 s. ISBN 80–86787–04–4.

Přidal A. 2008. Mor včelího plodu – diagnostika. *Moderní včelař*. 3: 5–6.

Přidal A. 2009. Mor včelího plodu a syrovátka. *Moderní včelař*. 6: 184–185.

Přidal A. 2012. Hygienické chování – Staré dílo včely odstraňují vykousáním. *Moderní včelař*. 3: 100–101.

Riessberger-Gallé U., von der Ohe W., Crailsheim K. 2001. Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae larvae*, the causative agent of the American foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*. 77: 231–236.

Richard F. J., Tarpay D. R., Grozinger C. M. 2007. Effects of Insemination Quantity on Honey Bee Queen Physiology. *Science Daily*. 29.

Rinderer T. E., Rothenbuhler W. C., Gochnauer T. A. 1975. The influence of pollen on the susceptibility of honey bee larvae to *Bacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 13: 81–86.

Ritter W. 1996. Diagnostik und Bekämpfung der Bienenkrankheiten. Jena: Gustav Fischer Verlag. 230 pp.

Sherman P. W., Seeley T. D., Reeve H. K. 1998. Parasites, pathogens, and polyandry in honey bees. *The American Naturalist*. 151 (4): 392–396.

Smith R. K., Wilcox M. M. 1990. Chemical residues in bees, honey and beeswax. *American Bee Journal*. 130: 188–192.

Spivak M., Reuter G. S. 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*. 32: 555–565.

Státní veterinární správa ČR. Ohniska moru včelího plodu na konci roku 2010 na území ČR. Dostupné z: <http://www.svscr.cz/download.php?idx=4970>

Sturtevant A. P., Revell I. L. 1953. Reduction of *Bacillus larvae* spores in liquid food of honey bees by action of the honey stopper and its relation to the development of American foulbrood. *Journal of Economic Entomology*. 46: 855–860.

Sutter G. R., Rothenbuhler W. C., Raun E. S. 1968 Resistance to American foulbrood in honey bees. VII. Growth of resistant and susceptible larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 12: 25–28.

Šivic F. 2003 [cit. 2012–3–30]. Beekeeping in Slovenia. Government Communication Office [internet]. Dostupné z: [http://www.ukom.gov.si/en/media\\_relations/background\\_information/culture/beekeeping\\_in\\_slovenia/](http://www.ukom.gov.si/en/media_relations/background_information/culture/beekeeping_in_slovenia/)

Švamberg V. 2000. Tajemný svět včel. 1. vyd. Líbeznice: Víkend. 77 s. ISBN 80–7222–120–5.

Švancer L. 1974. Zdolávanie včelieho plodu. *Včelár* 11: 246.

Tautz J. 2009. Fenomenální včely. 1. vyd. Praha: Brázda. 270 s. ISBN 978–80–209–0376–1.

Terrestrial Manual – American foulbrood of honey bees. 2008. The World Organisation for Animal Health. Chapter 2.2.2.

Titěra D. 2005. Výroční zpráva za rok 2005 o plnění úkolů k zajištění monitoringu výskytu původce moru včelího plodu v ČR. Výzkumný ústav včelařský s.r.o.

Titěra D. 2009. Mor včelího plodu. Výzkumný ústav včelařský, s.r.o. Dol. ISBN 978–80–87196–02–1.

Titěra D., Haklová M. 2003. Detection method of *Paenibacillus larvae larvae* from beehive winter debris. *Apiacta*. 38: 131–133.

Townsend C. R., Begon M., Harper J. L. 2010. Základy ekologie. 1. české vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 495 s. SBN 978–80–24–2478–1.

Tulloch A. P. 1980. Beeswax – composition and analysis. *Bee World* 61: 47–62.

Van Eaton C. 2000. Controlling AFB without drugs. *New Zealand's Approach, Bee Culture* 128: 36–40.

Veselý V. et al. 2003. Včelařství. Praha: Brázda. 272 s.

von der Ohe W. 2003. Control of American foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms. *Apiacta*. 38: 137–139.

Vyhláška č. 299/2003 Sb. O opatřeních pro předcházení a zdolávání nálezů a nemocí přenosných ze zvířat na člověka.

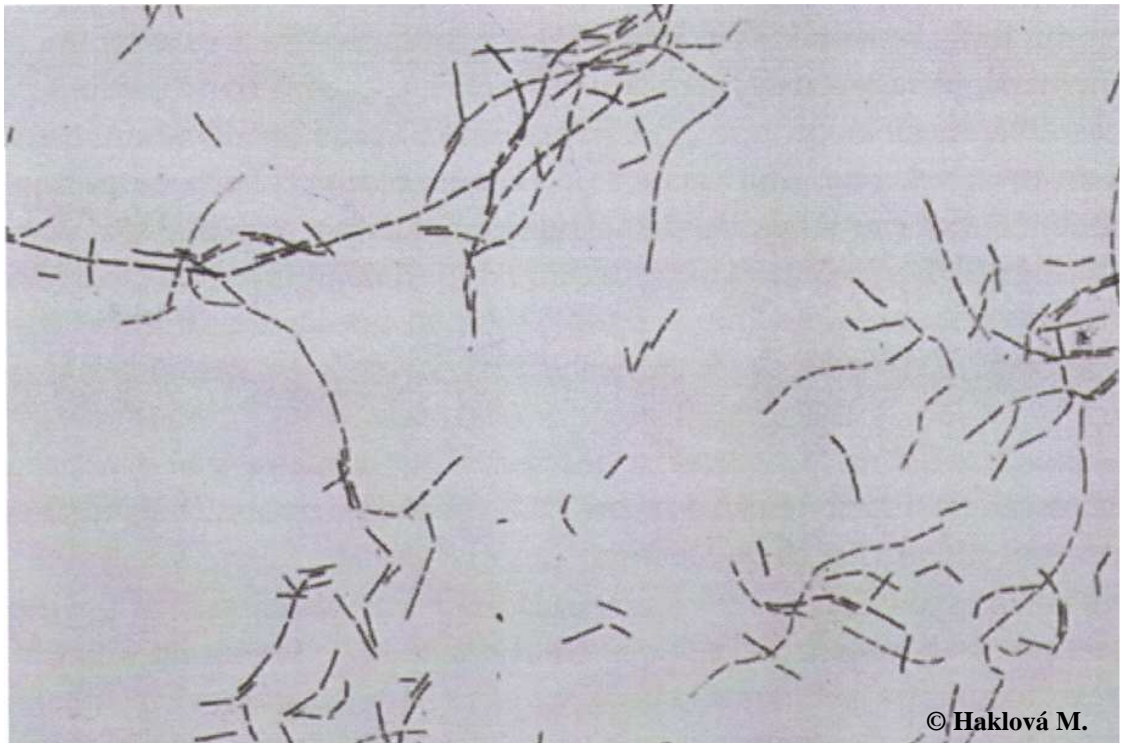
White G. F. 1906. The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. US Department of Agriculture - Bureau of Entomology. Technical Series 14: 50.

Woodrow A. W. 1942. Susceptibility of honey bee larvae to individual inoculation with spores of *Bacillus larvae*. *Journal of Economic Entomology*. 35: 892–895.

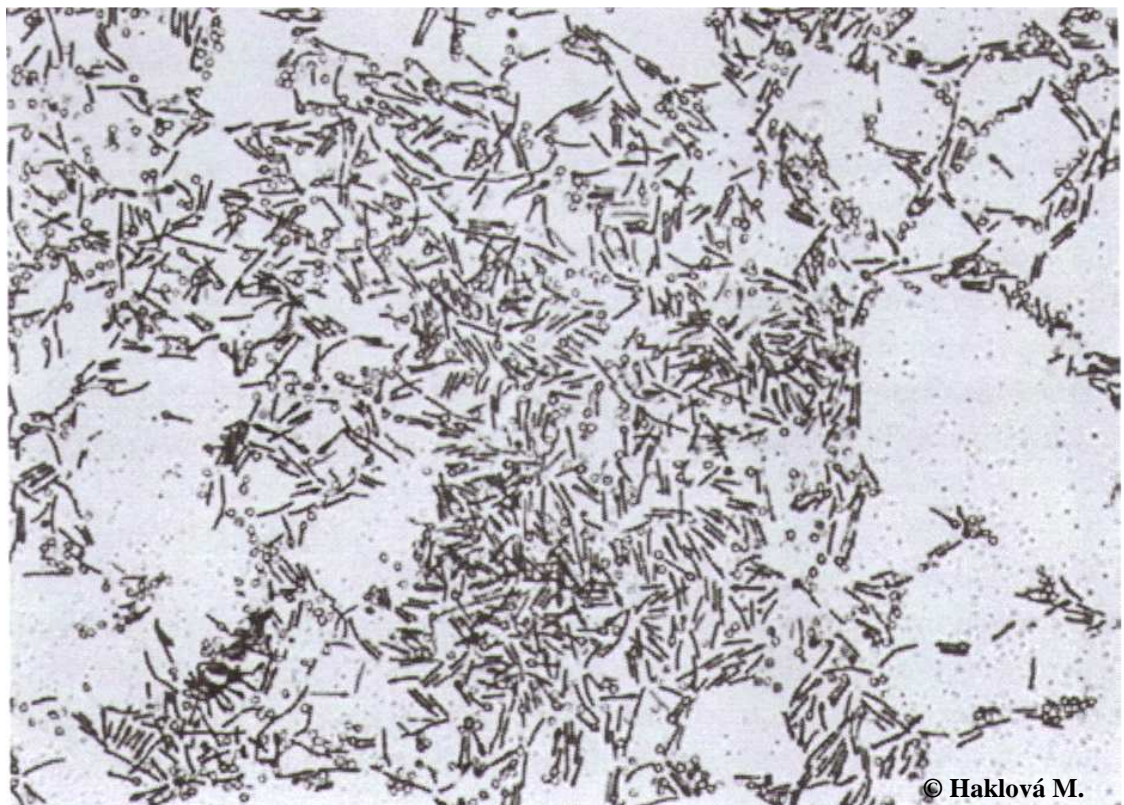
Woodrow A. W., Holst E. C. 1942. The mechanism of colony resistance to American foulbrood. *Journal of Economic Entomology*. 35: 327–330.

## 9 Přílohy

### Příloha 1



Vegetativní stádia *P. larvae larvae*



Sporangia a spory *P. larvae larvae*

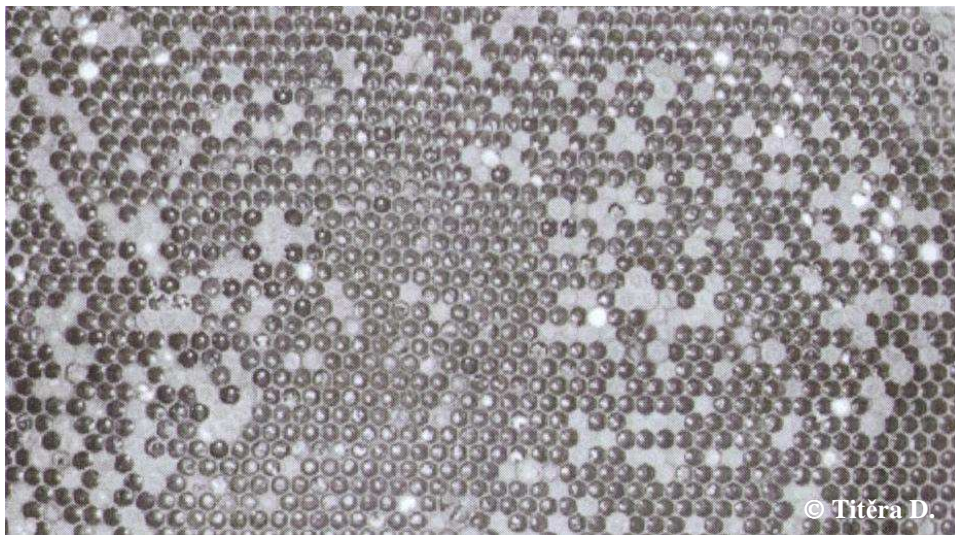


## Příloha 2



**Zdravý zavíčkovaný plod**

© Zichová E.



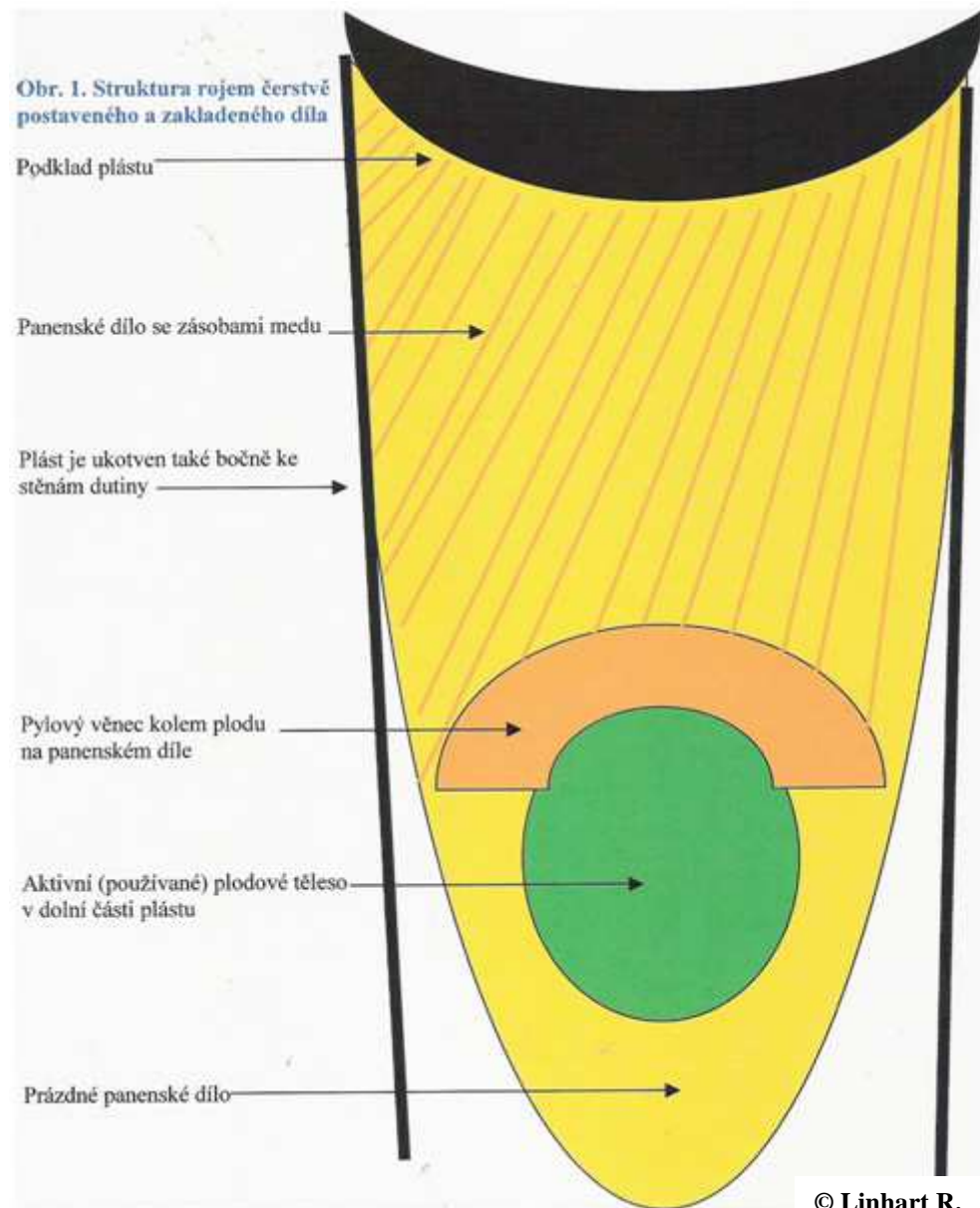
**Mezerovitý plod v klinickém stádiu moru včelího plodu**

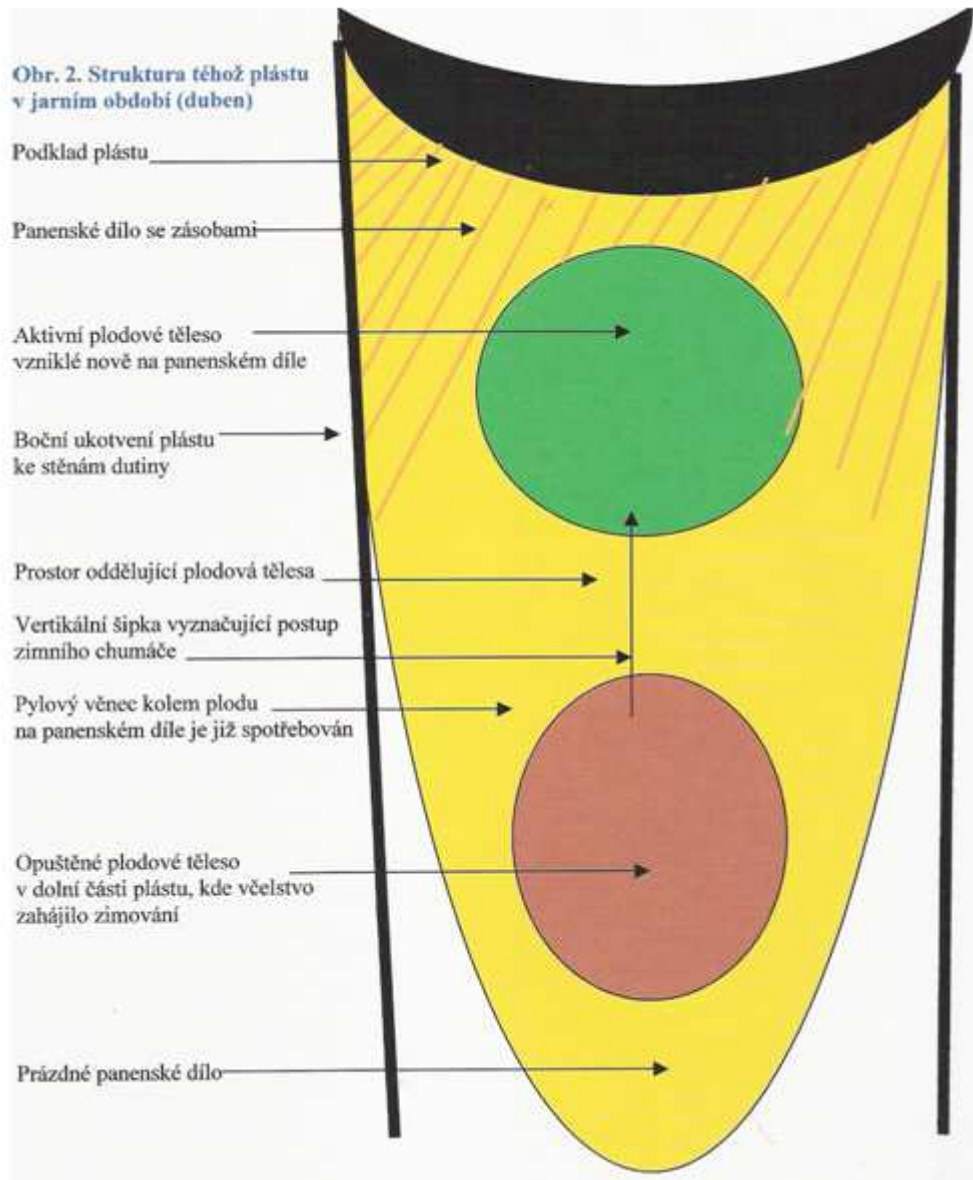
© Titěra D.



## Příloha 3

Schematické znázornění přirozené dynamiky včelího díla v přírodních podmínkách





© Linhart R.

Obr. 3.  
Sestupná jarní fáze  
s výstavbou nového díla  
pod původním plástem

- Podklad původního plástu
- Původní plást**
- Opuštěné plodové těleso  
kde probíhal jarní rozvoj
- Prostor mezi plodovými tělesy
- Opuštěné plodové těleso  
kde probíhalo zázimování
- Linie rozhraní starého a nového  
plástu
- Nový plást**
- Boční ukotvení plástu  
ke stěnám dutiny
- Šipka vyznačující sestup včelstva  
na nově podstavené panenské dílo
- Medné zásoby jsou přenášeny dolů  
do blízkosti nového plodového  
tělesa.
- Prstenec pylu v okolí plodového  
tělesa
- Nové plodové těleso, kde bude  
včelstvo plodovat a zázimovávat
- Stěny dutiny jsou záměrně kresleny  
mírně šikmé, v zájmu názornosti. V  
přírodě bývají kolmé a nové dílo je  
širší

