



Diagnostika moru včelího plodu a epizootologická situace v ČR

Zpracoval: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.,
SVÚ Olomouc, Jakoubka ze Stříbra 1, 779 00 Olomouc

Tel.: 585557223, e.mail: vetmed@seznam.cz

Původce

- *Paenibacillus larvae* (*B. larvae* - *White, 1906*)

je G+ fakultativně anaerobní sporulující tyčka, spory jsou vysoce rezistentní (Destrukce při 121°C po 8,6 min. v medu a až po 30 min. ve vosku) (Hansen a Brødsgaard 1999).

Původce

Biochemické vlastnosti *P. larvae* :

Většina kmenů je kataláza -, roste v přítomnosti 0,001% lysozymu a 2% NaCl, rozkládá želatinu a kasein, využívá D-glukózu, glycerol, D-mannózu, ribózu, D-trehalózu, N-acetylglukosamin, hydrolyzuje eskulin, ostatní aktivity jsou variabilní (Heyndrickx et al, 1996).
Produkce pyrazinů (Bzdil, 2010).
Produkce enolázy (hydrolýza proteinů – faktor patogenity (Antúnez et al, 2010).

Původce

Genotypové vlastnosti *P. larvae* :

Vysoká **genotypová variabilita** prokázaná PCR fingerprintingem.

Systém ERIC 4 genotypové skupiny (I-IV).

Systém BOX 4 genotypové skupiny (A-C, PLP).

Systém BOX A1R a MBO REP1 prokázal 9 různých genotypových podskupin.

Celkem známo **18 různých genotypů** *P. larvae* .

Diagnostika moru včelího plodu

- Klinická prohlídka
- Laboratorní vyšetření
- Epizootologická situace v dané zemi nebo lokalitě

Diagnostika moru včelího plodu

Klinické vyšetření hodnotí:

- sílu včelstva a jeho projevy (15 – 60 tisíc dělnic, 1 matka, 300 – 600 trubců).
- intenzitu plodování, rovnoměrnost zaklazení a kvalitu plodu.
- celkovou úroveň a hygienu chovu.

Diagnostika moru včelího plodu

Odběr vzorků k laboratornímu vyšetření

- Včelí plásty s plodem nebo zásobami
- Med
- Měl, vosk
- Další materiály (pyl, mateří kaše, stěry z prostředí, propolis, dospělé včely...).

Vzorky nutno dobře zabalit a opatřit žádankou / objednávkou vyšetření !

Diagnostika moru včelího plodu

Metody vyšetření:

A) Mikroskopické

- 1) Nativní preparáty (fázová mikroskopie).
- 2) Barvené preparáty (Gram, Schaefer – Fulton acidorezistentní, Schaefer – Fulton malachitová zeleň) .

Diagnostika moru včelího plodu

B) Kultivační metody

- Jsou dobře kvantifikovatelné, lze zpracovávat větší množství vzorků rutinně, porosty lze snadno konfirmovat a archivovat.
- Půdy bývají obohaceny glukózou, thiaminem, kvasničným extraktem, tryptonem, cysteinem. Selektivity je dosaženo přidavkem kyseliny **nalidixové** a **pipemidové**, příp. **Amphotericinu B**.

Diagnostika moru včelího plodu

- Z půd jsou používány například: Krevní agar se 7% ovčí krve (SBA), J-medium, MYPGP agar, , MYPGP (NALPIA A a B), MYPPN agar, BHI agar (BHIA), MYP agar, TMYGP agar, *P. larvae* agar (PLA)...
- Inkubace se provádí obvykle aerobně (mikroaerofilně) při 34-37°C po dobu 2-9 dní.

Kultivace medu

- Smísení 15g medu s 15ml dest. vody.
- Inkubace při 88-92°C po dobu 5 minut.
- Po ochlazení kultivace 0,2ml na 1 KA a 3 MYPPN.
- Inkubace při 35-37,5°C po dobu 7-9 dní.
- Spočtení kolonií a konfirmace původce.

Kultivace měli

- Smísení 1g měli, 8,5ml destilované vody a 0,5ml Tweenu 80 .
- Inkubace 0,5 hodiny při $70\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Přenesení 2-5ml ze dna zkumavky do stejného objemu destilované vody.
- Inkubace při $90\pm 2^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut.
- Ochlazení a kultivace 0,2ml na KA a MYPPN.
- Inkubace ploten při $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ po 5-8 dní.
- Spočtení kolonií a konfirmace původce.

Diagnostika moru včelího plodu

Konfirmace bakteriálních porostů

- Biochemické metody (Pestré řady cukrů, API systém, BIOLOG systém).
- Molekulárně biologické genotypové (PCR).
- Molekulárně biologické fenotypové.
(Analýza profilu metylovaných masných kyselin plynovou chromatografií FAME, MALDI TOF).

Diagnostika moru včelího plodu

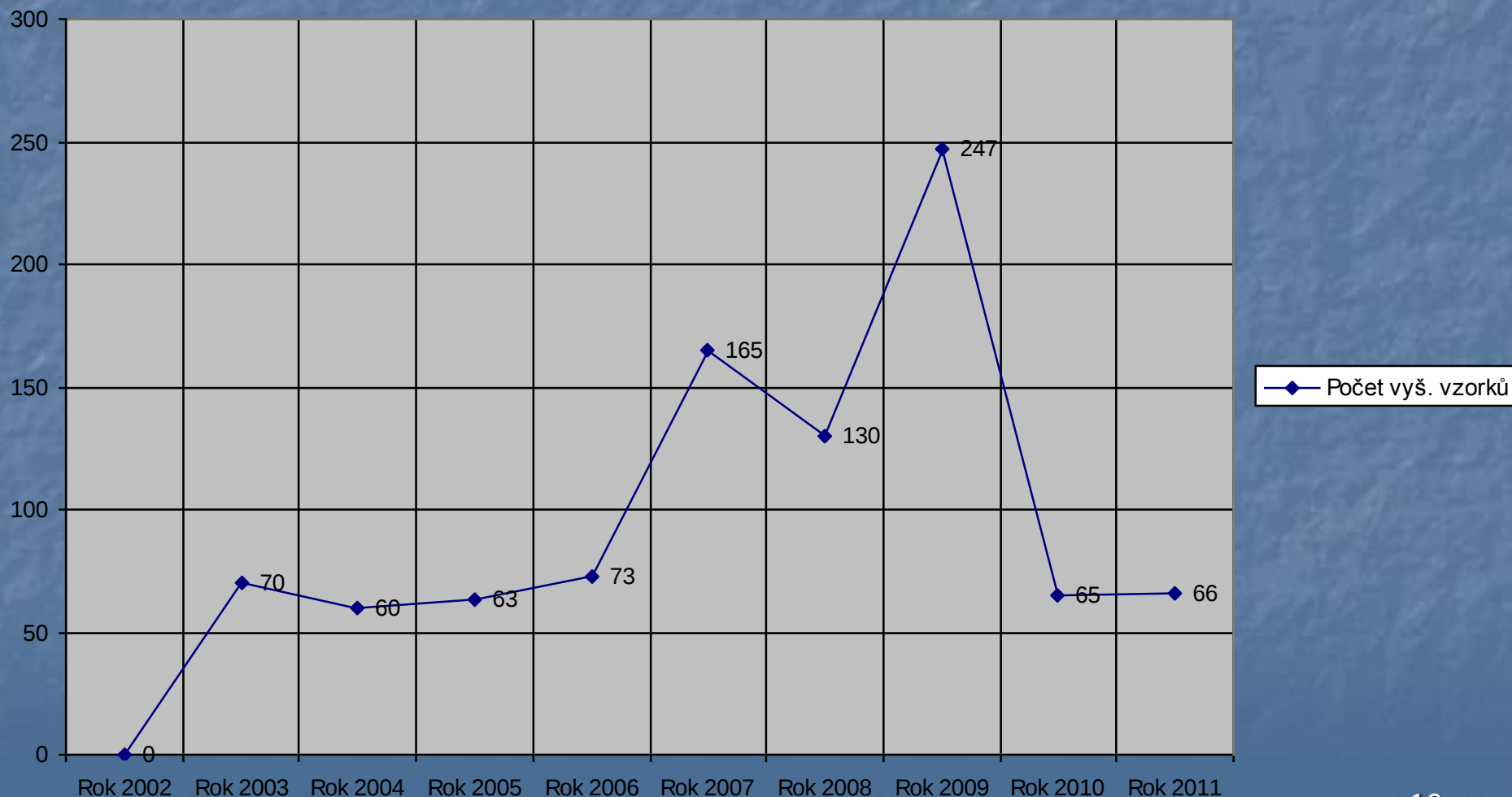
Další metody detekce *P. larvae*:

- 1) Imunologické (ELISA, IDT, IF, Lateral Flow Device Testy) (De Graaf et al, 2006).
- 2) Molekulárně biologické (Fenotypové, genotypové – detekce původce přímo v materiálu) (Ryba et al, 2009), (Martinez et al, 2010).
- 3) Cytochemické a histochemické metody (Gregorc a Bowen, 1998).

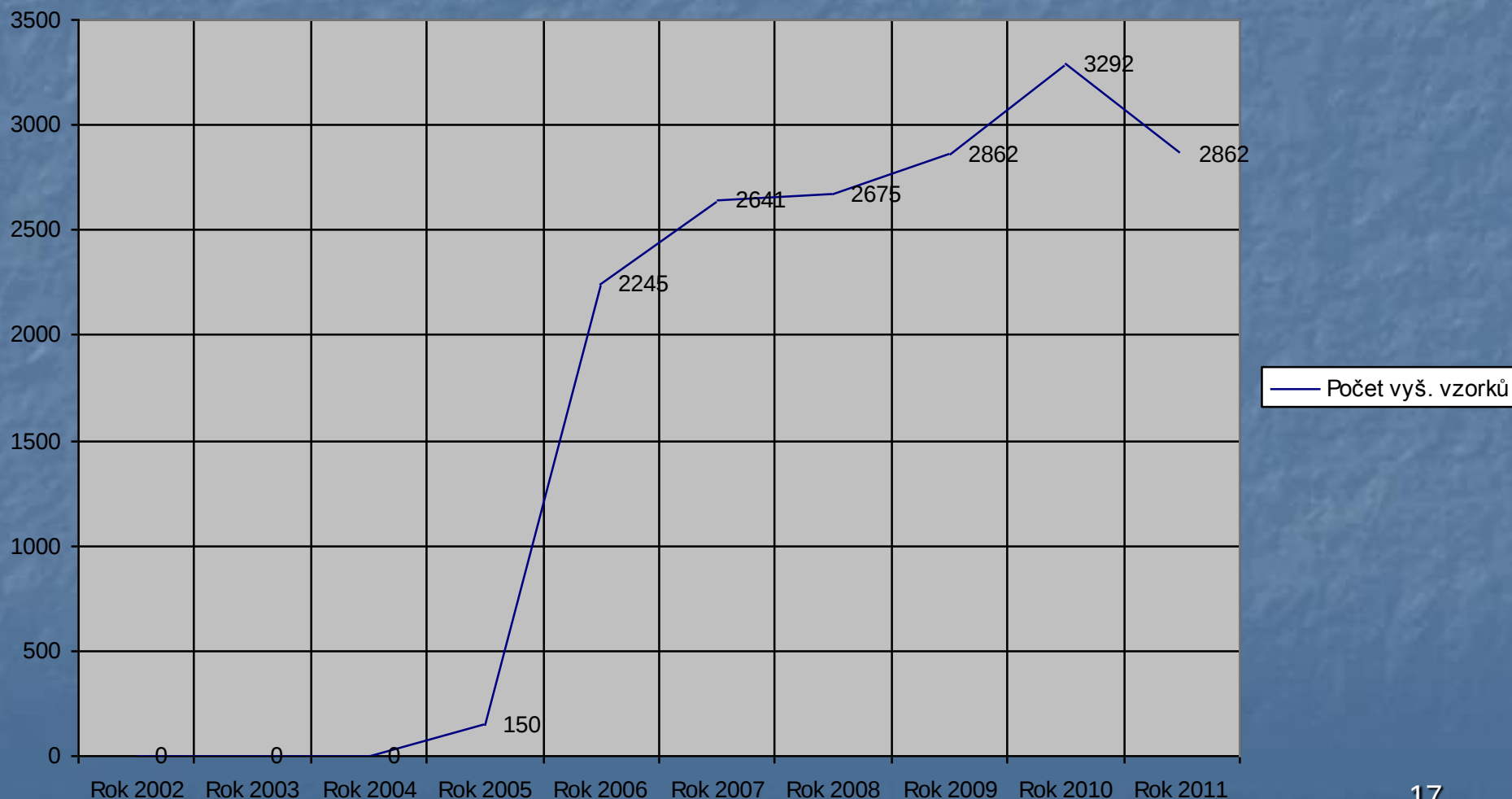
Diagnostika moru včelího plodu

- 4) Elektronová mikroskopie (Gregorc a Bowen, 1998).
- 5) Kombinované metody (FISH – Fluorescence in situ hybridizace) Protilátky značené Indocarbocyaninem a Fluorescein izothiocyánátem se v histologickém preparátu váží na prokaryotní 16S rRNA a eukaryotní 18S rRNA sekvenci) (Yue et al, 2008).
- 6) Detekce pyrazinů (Bzdil, 2010).

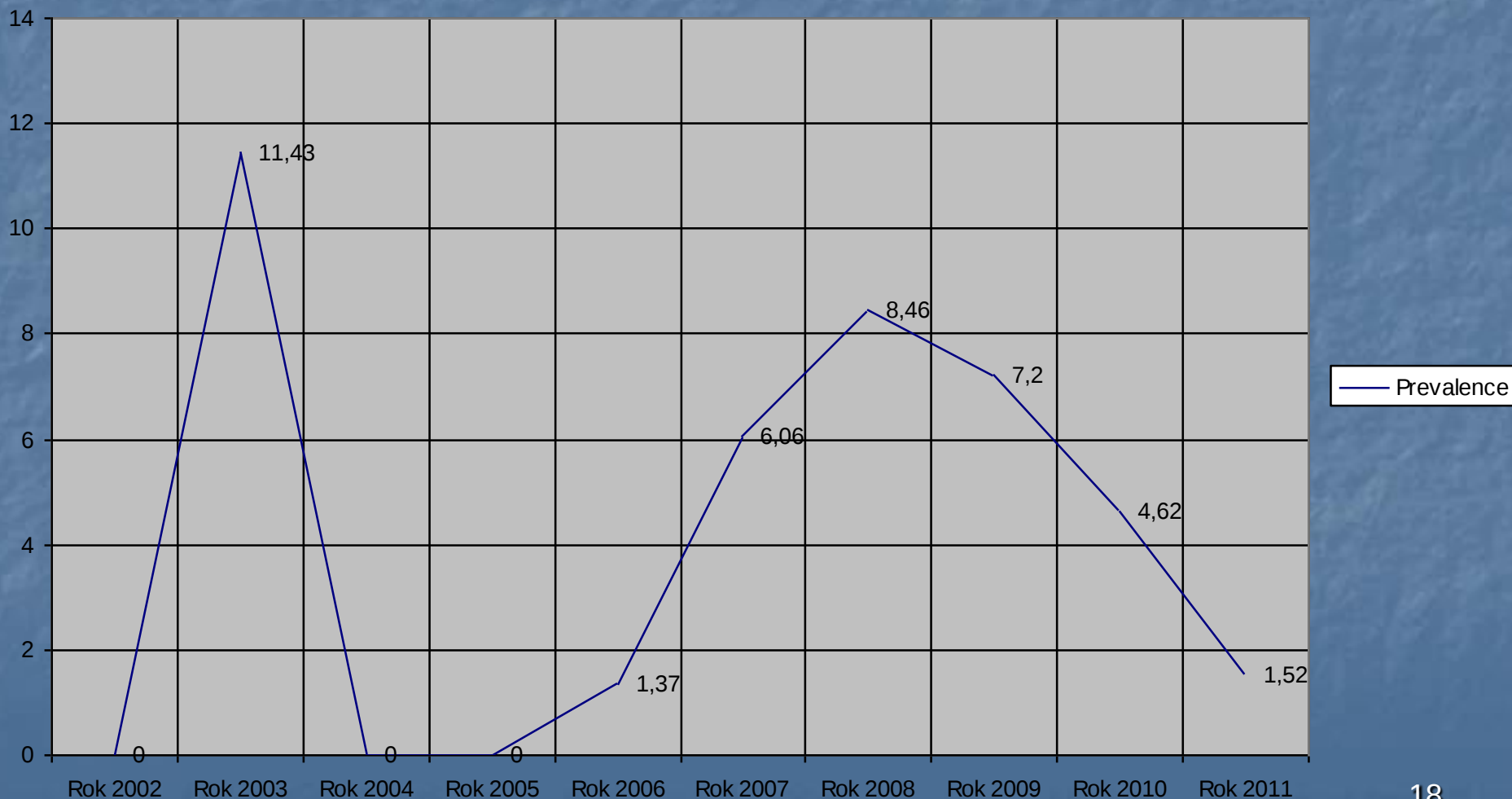
Počty vyš. vzorků medu na SVÚ Olomouc v letech 2002-2011



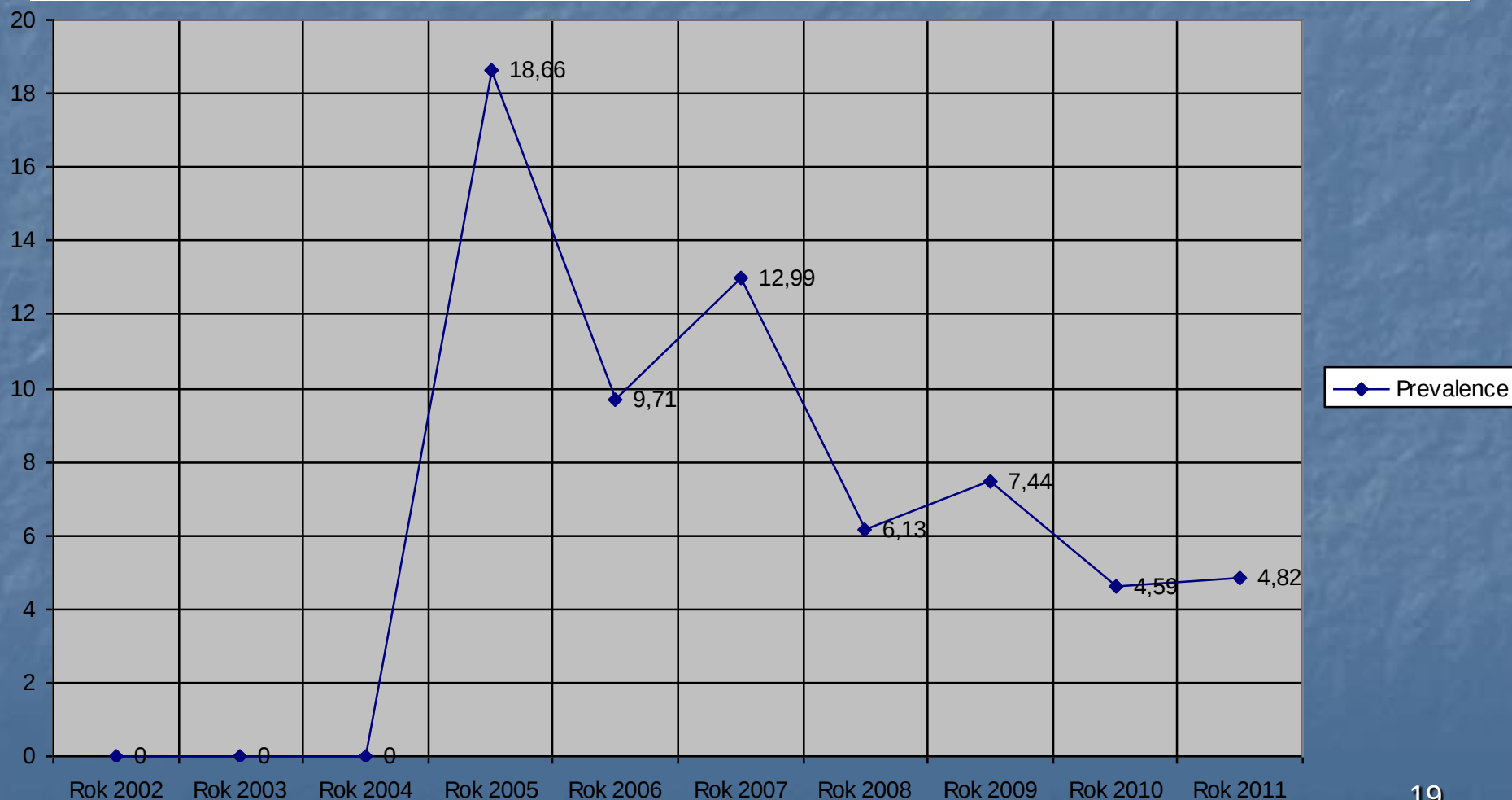
Počty vyšetřených vzorků vosku a měli na SVU Olomouc v letech 2002-2011



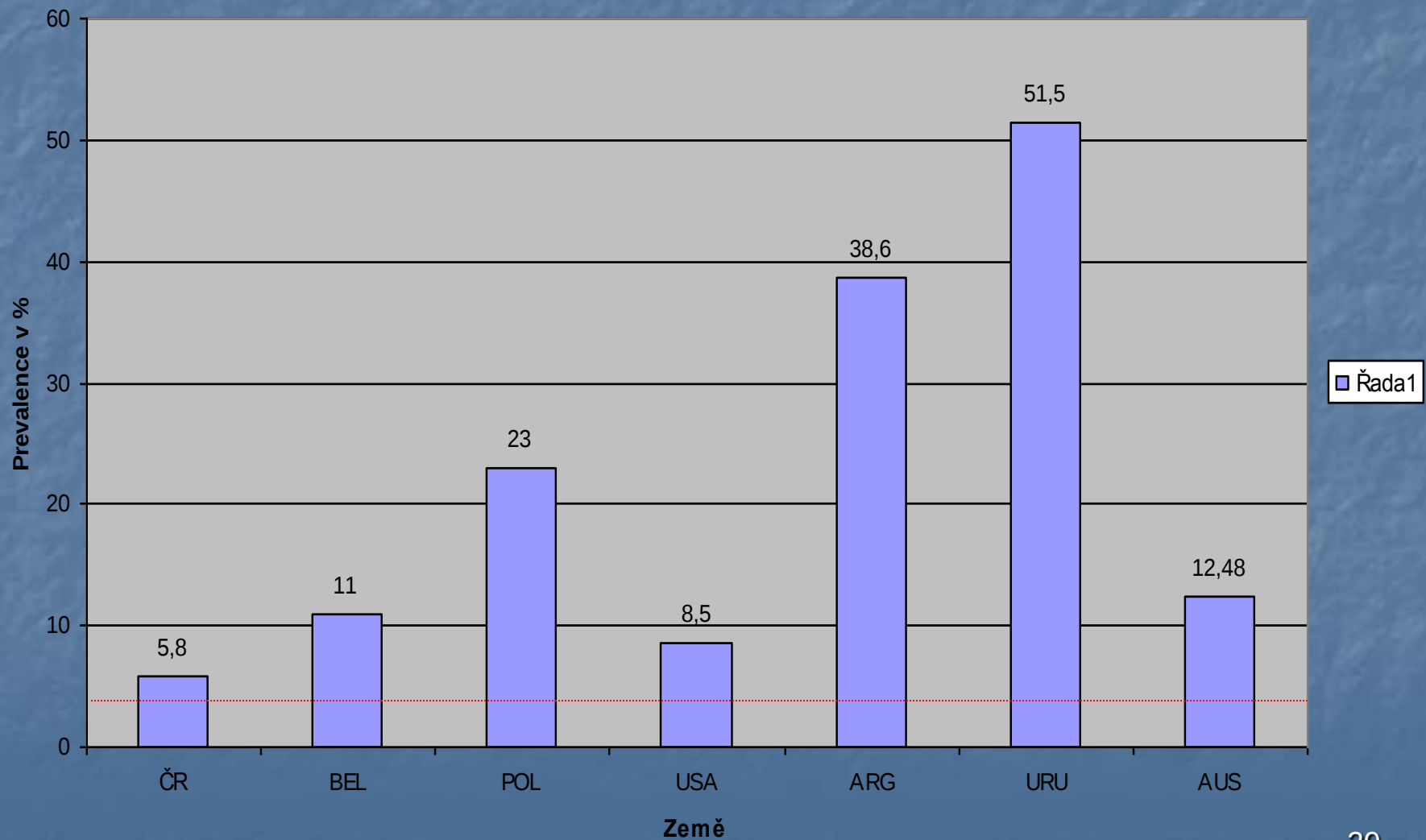
Prevalence P. larvae ve vzorcích medu vyšetřených na SVÚ Olomouc v letech 2002-2011



Prevalence P. larvae ve vzorcích vosku a měli vyšetřených na SVÚ Olomouc v letech 2002-2011.



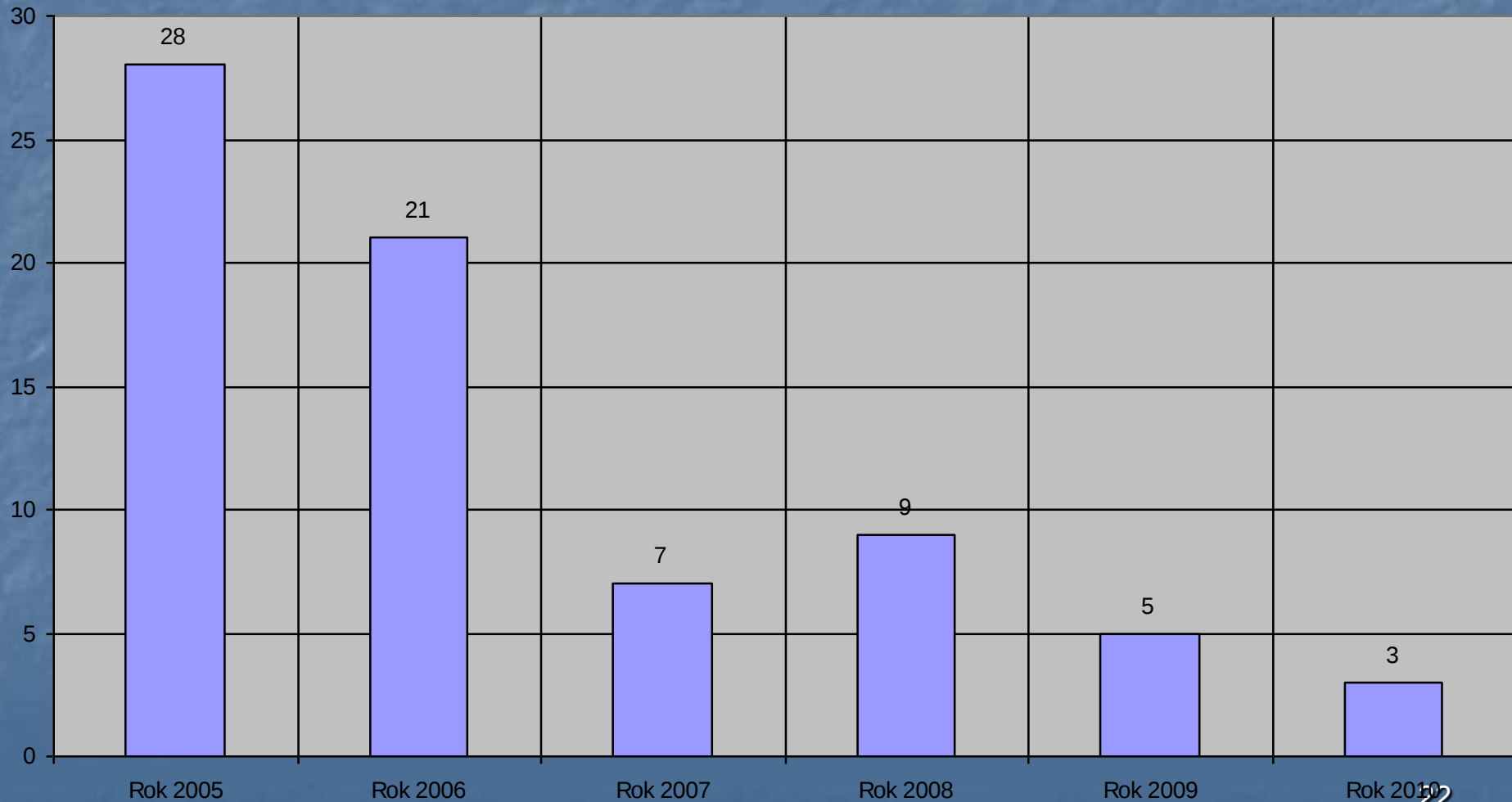
Porovnání prevalencí *P. larvae* v českém medu s literárními údaji.



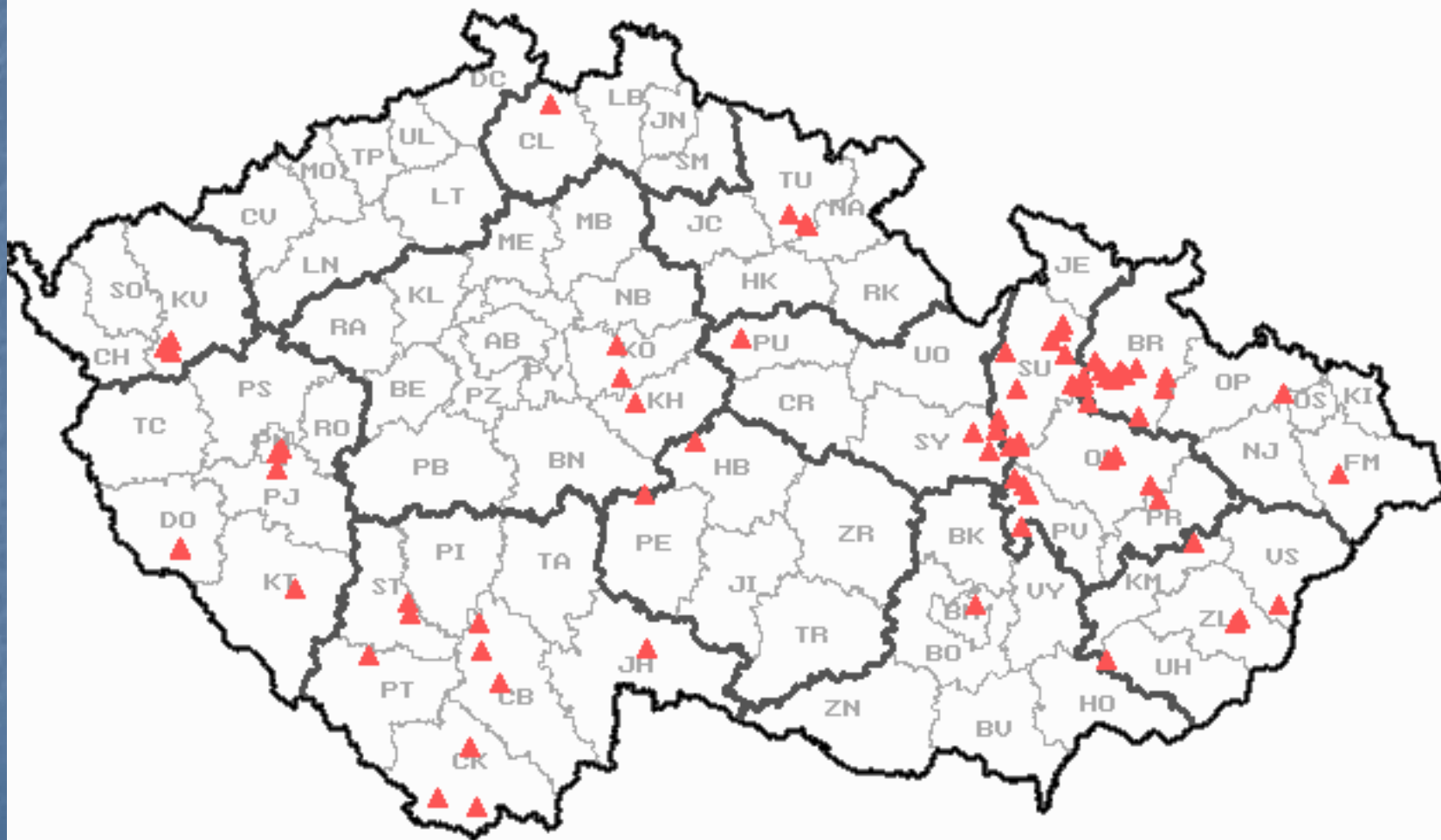
Počty nových a zdolaných ohnisek MVP v pohraničních oblastech ČR v letech 2008-2011

Okres	2008		2009		2010		2011	
	Nová	Zdolaná	Nová	Zdolaná	Nová	Zdolaná	Nová	Zdolaná
Frýdek - Místek	5	6	2	2	3	3	1	1
Vsetín	-	-	-	-	5	5	3	3
Zlín	3	3	7	7	-	-	5	5
Uherské Hradiště	-	-	-	-	-	-	1	1
Hodonín	1	1	-	-	1	1	-	-
Břeclav	5	4	13	14	6	6	-	-

Počty aktivních ohnisek MVP v ČR v letech 2005-2010



Mor včelího plodu (ohniska nově vzniklá v období 1. 1. – 30. 6. 2011)



P. larvae jako zoonotické agens ?

- 5 pozitivních hemokultur na *P.larvae* u humánních pacientů (Rieg et al, 2010).

Všichni pacienti i.v. narkomani, věk 20-35 let. Paralelně probíhající hepatitis B (1x) a hepatitis C (5x).

Sympt.: Horečky 37,8°C – 39,8°C, únava, somnolence, malátnost, 1x peritonitis, 1x anemie, 1x tachypnoe, plicní šelest, 1x krvácení ze sliznic.

Infekce pravděpodobně z inj. Methadonu s příměsí medu.

Klinické symptomy moru včelího plodu



Klinické symptomy moru včelího
plodu.



Klinické symptomy moru včelího
plodu.



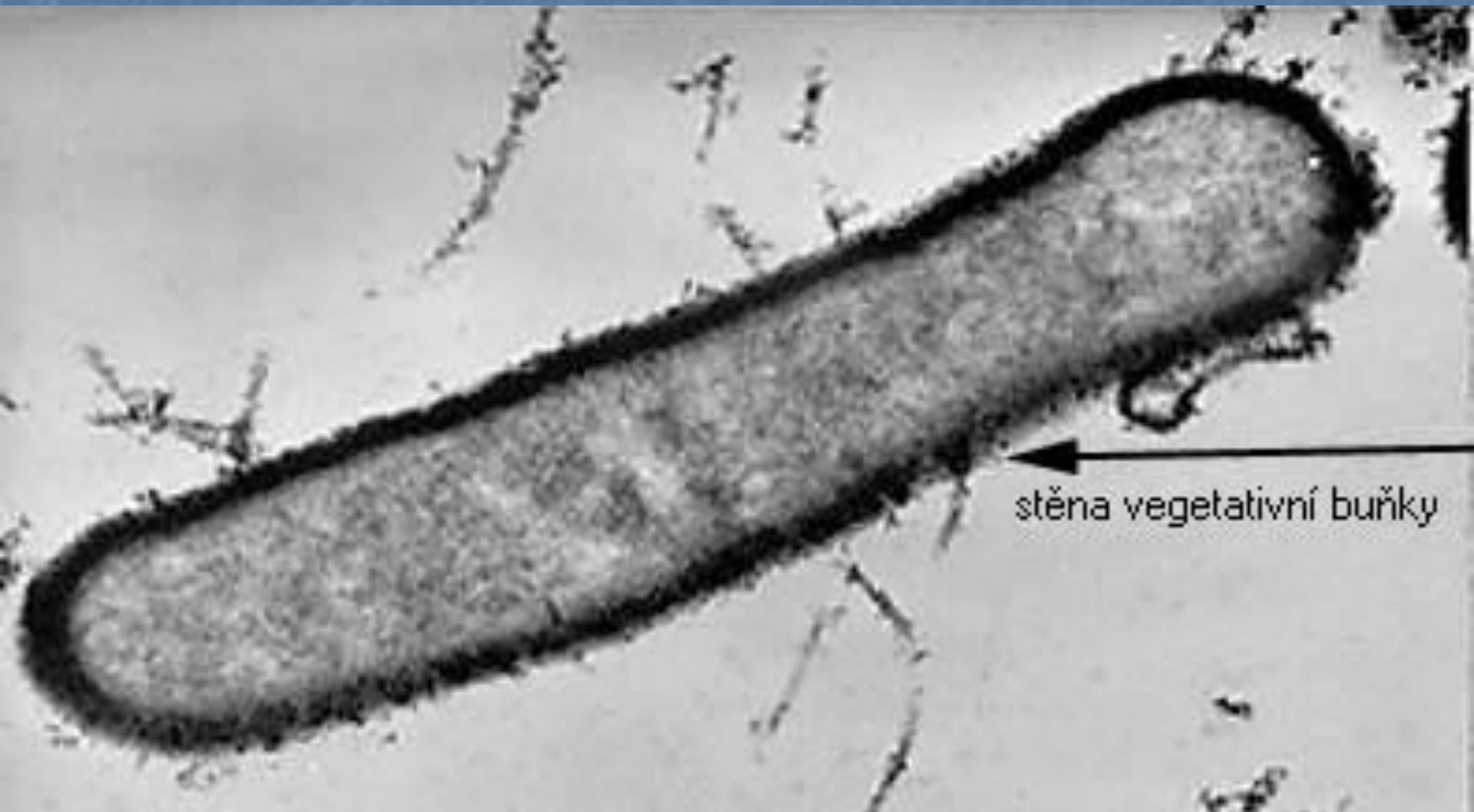
P. larvae Schaefer- Fulton



P. larvae Gram



P. larvae vegetativní buňka



Spora *P. larvae*

lamely
vnitřního
obalu
spory



Měl homogenizovaná Tweenem



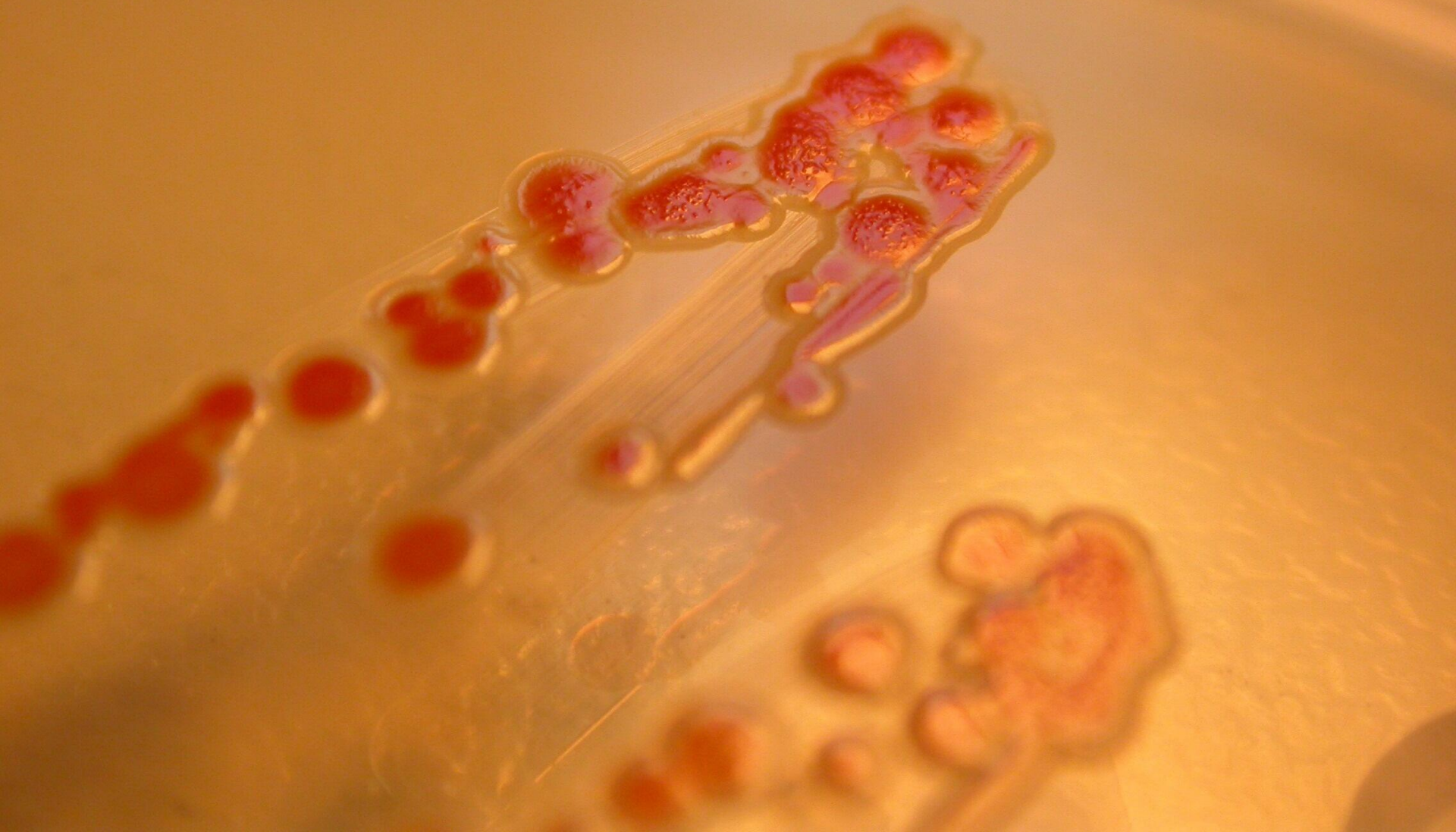
Kultivace včelí měli



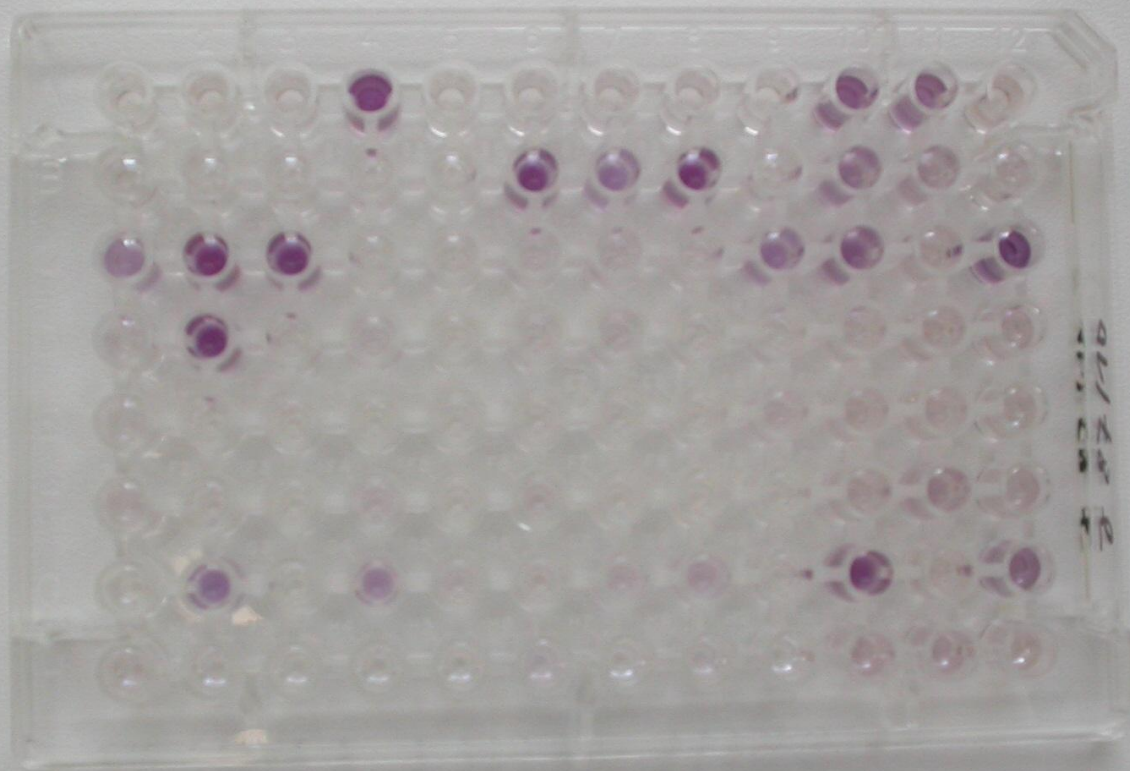
Morfologická variabilita *P. larvae*

P. larvae na MYP agaru

Morfologická variabilita *P. larvae* na MYPPN agaru



System BIOLOG



Molekulární fenotypová diagnostika MALDI

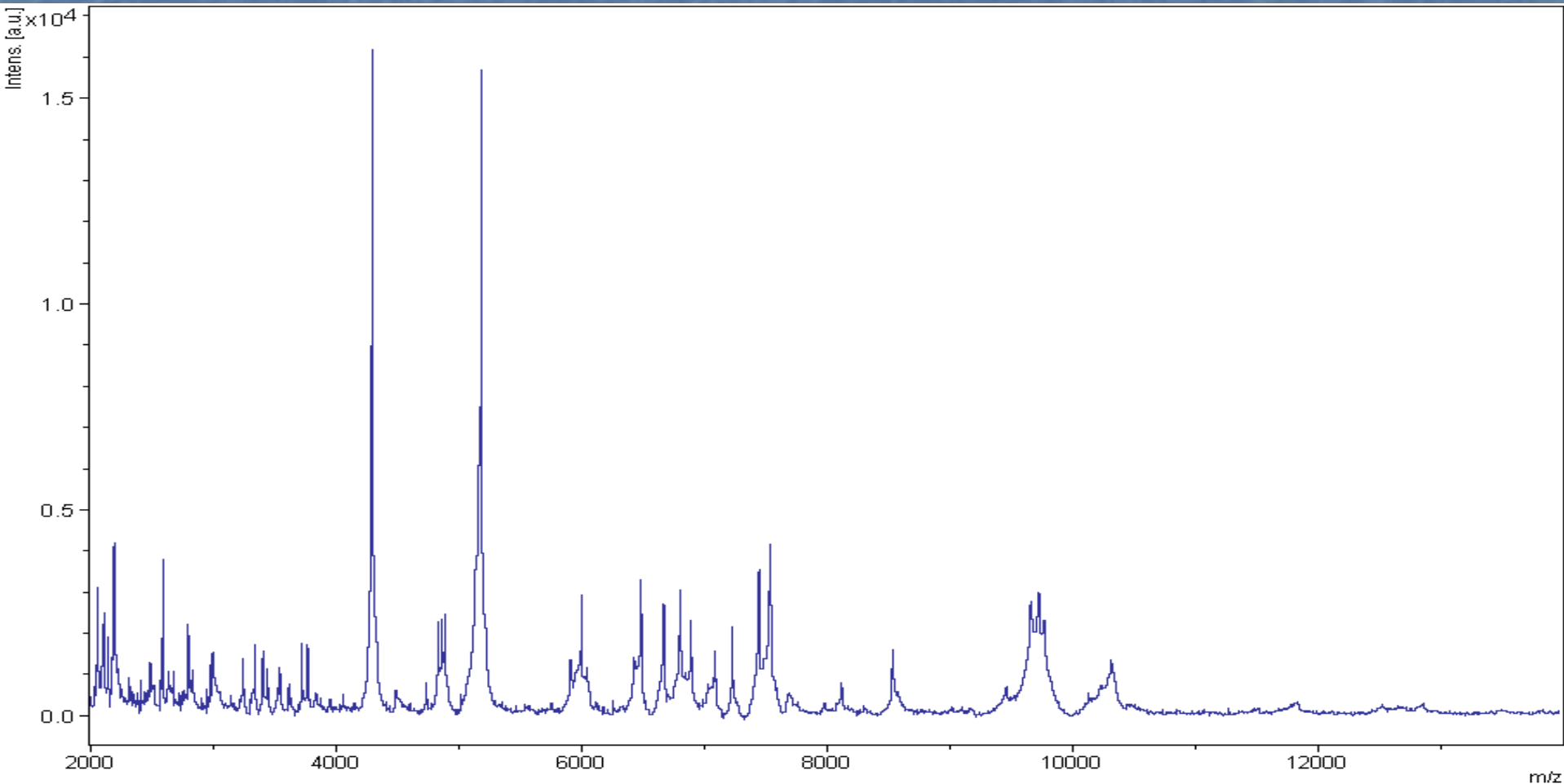


Molekulární fenotypová diagnostika

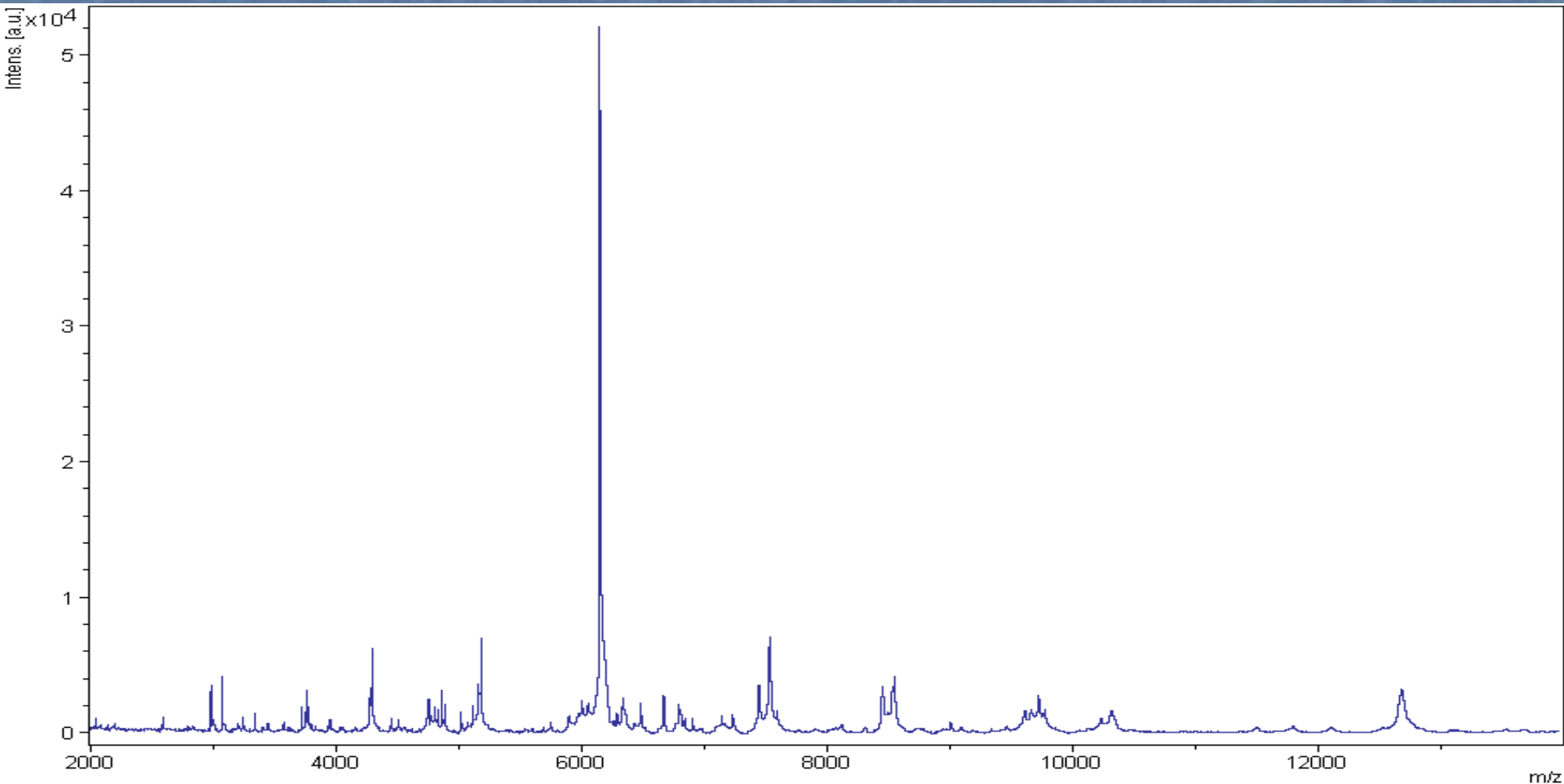
MALDI



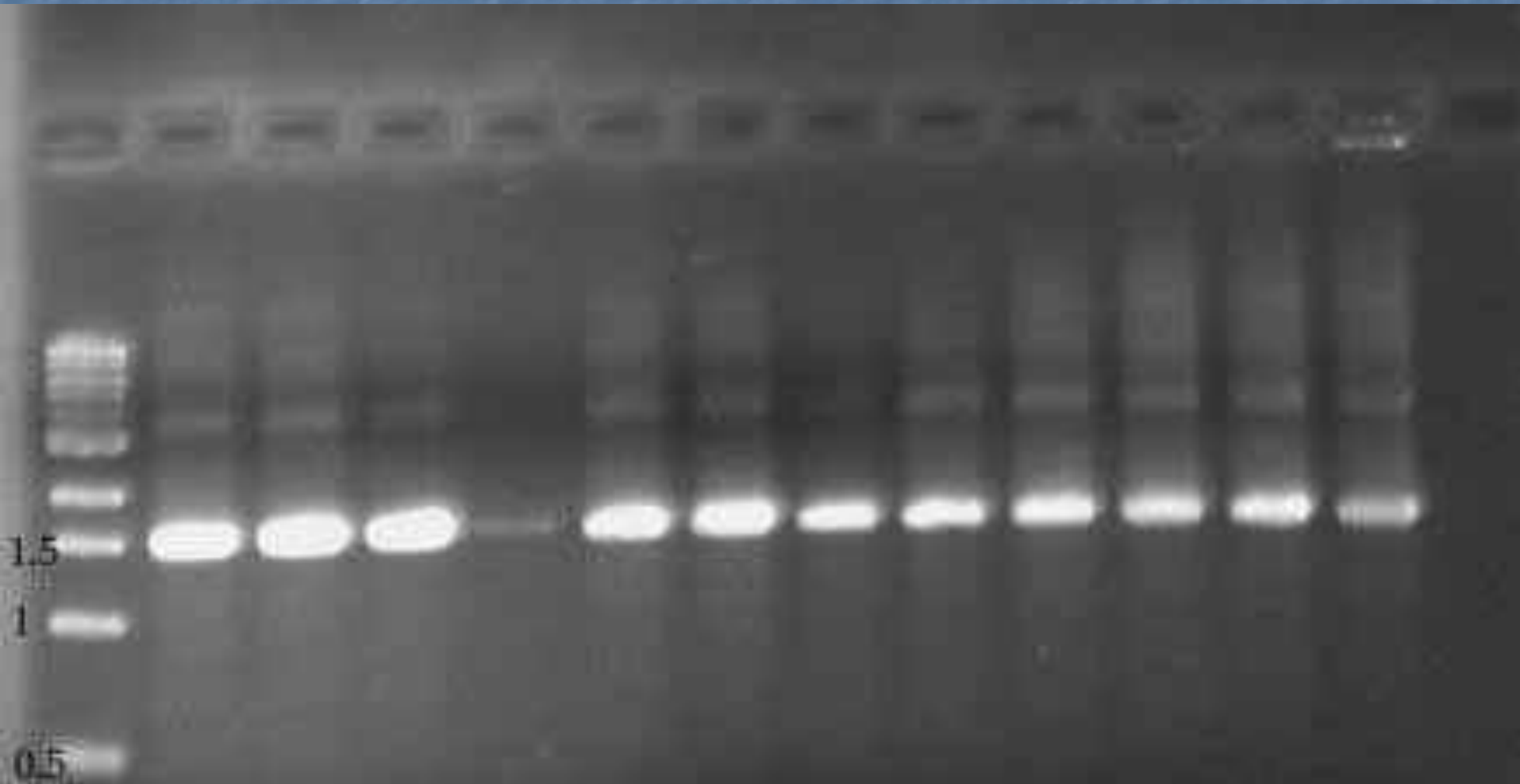
Hmotnostní spektrum *P. larvae* CCM 5680 (MALDI)



Hmotnostní spektrum *P. larvae* CCM 38 (MALDI)



PCR snímek

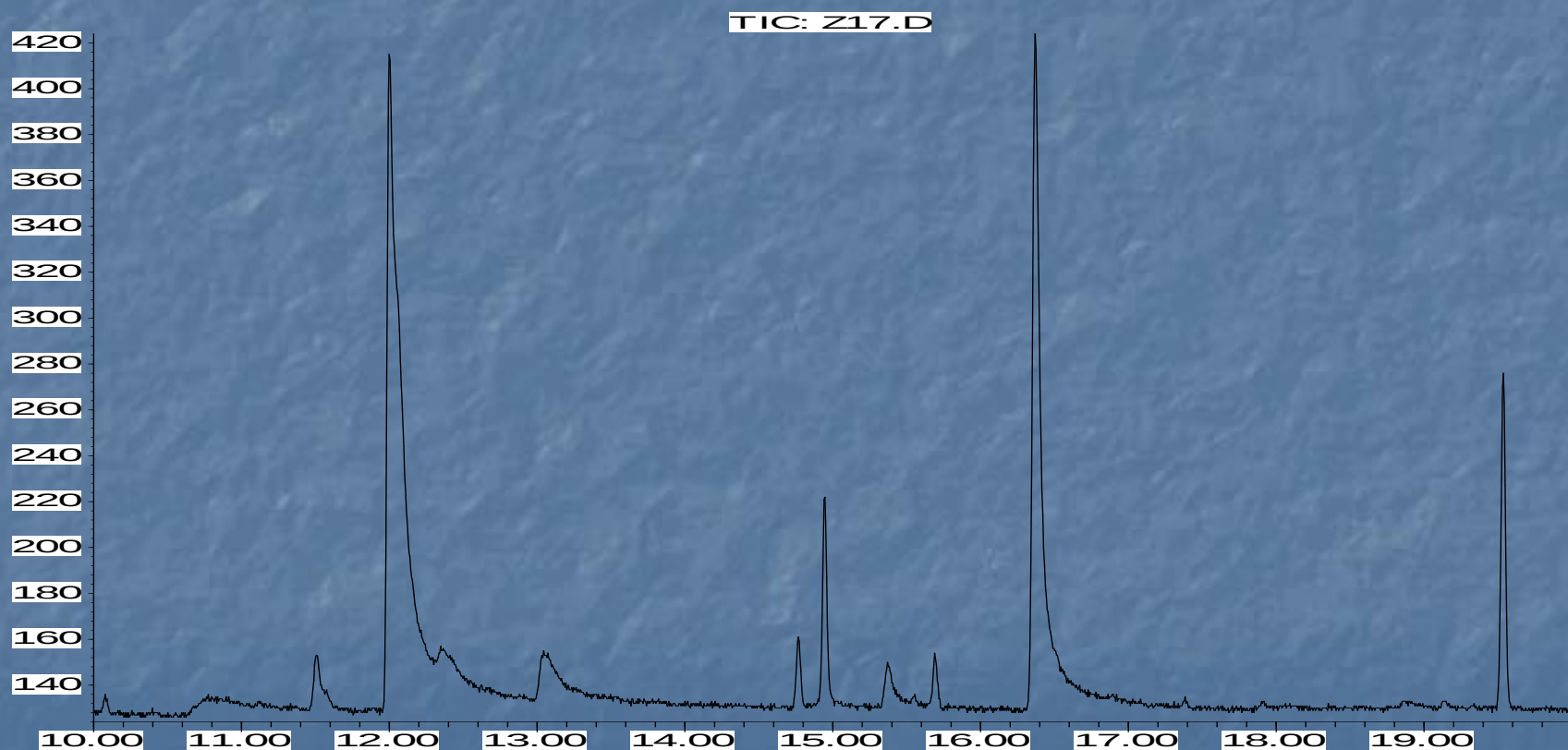


Rozklad indigokarmínu



Pyraziny v chromatogramu

Abundance



Time-->

A close-up photograph of two roses. The rose on the left is white with a yellow center, and the rose on the right is pink with a yellow center. The text "Děkuji za pozornost" is overlaid in red with a black outline. The background is dark green foliage.

Děkuji za pozornost