

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Kateřina Vlková

Genomická analýza *Paenibacillus larvae* ve vztahu k jeho virulenci

Genomic analysis of *Paenibacillus larvae* and its relation to virulence

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 05. 06. 2020

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Ing. Jaroslavu Hrabákovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a veškeré rady, které mi poskytl. Dále také Mgr. Kateřině Chudějové, Ph.D. za zaškolení v laboratoři, Dr. Ibrahimu Bitarovi, Ph.D. za předání jeho zkušeností ohledně celogenomových sekvenací, Mgr. Mateji Medveckému, Ph.D. za zpracování výsledků sekvenace a celému týmu Laboratoře antibiotické rezistence a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii, Biomedicínského centra LFP UK za vřelé přijetí v týmu a podporu během studia. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu nejen během studia.

Abstrakt

Paenibacillus larvae je grampozitivní sporulující bakterie, která je původcem moru včelího plodu. Jedná se o jednoho z nejvýznamnějších bakteriálních patogenů včely medonosné (*Apis mellifera*). Spory *P. larvae* jsou vysoce infekční pro včelí larvu a odolávají fyzikálně-chemickým vlivům. *P. larvae* se subtypizuje za využití repPCR s ERIC primery (Enterobacterial Repetitive Integrance Consensus). Dosud bylo popsáno 5 genotypů ERIC I-V, které se liší morfologií kolonií, metabolismem a především virulencí. Rovněž je mezi jednotlivými izoláty *P. larvae* významná genetická variabilita, která se může podílet na rozdílech ve virulenci.

Izoláty *P. larvae* použité v této práci byly získány z klinických případů moru včelího plodu z celé České republiky ve spolupráci s Výzkumným ústavem včelařským, s.r.o., Dol. Jednalo se o bakteriální kultury získané kultivací infikovaných larev a měli. Také byly použity izoláty z měli získané ze včelstev bez klinických příznaků moru včelího plodu. Metodou SMRT (Single Molecule Real Time) na platformě Sequel (PacBio) byly sekvenovány virulentní i pravděpodobně avirulentní izoláty. Použitá metoda je vhodná pro celogenomové sekvenování bakteriálních genomů, protože umožňuje sekvenování dlouhých úseků DNA s vysokou přesností. Tím je eliminován efekt velkého množství repetitivních sekvencí při skládání jednotlivých contigů a tím usnadněna kompletní rekonstrukce genomu. Dále byla provedena sekvenace na platformě MiSeq (Illumina). Byly získány sekvence ze 16 kmenů, které byly zařazeny do několika skupin (clusterů). Dále byla provedena analýza genů s ohledem na rozdíly mezi izoláty genotypů ERIC I a ERIC II. Vyhledávány byly geny, které mohou mít potenciální vliv na virulenci. K porovnání byla využity kmeny *P. larvae* DSM25430 (ERIC II) a DSM7030 (ERIC I).

Zároveň byla nalezena inzerční sekvence IS256, která je specifická pro *P. larvae*, vyskytující se v genomu s velkým počtem repetit. Tuto sekvenci bude možné využít jako screeningovou metodu k vyšetření moru včelího plodu z měli. Byly navrženy dvě sady oligonukleotidů, které jsou v této práci testovány na vzorcích z čisté kultury *P. larvae* čtyř ERIC genotypů.

Klíčová slova: *Paenibacillus larvae*, virulence, mor včelího plodu, celogenomová sekvenace

Abstract

Paenibacillus larvae is a Gram-positive sporulating bacterium that causes American foulbrood (AFB). It is one of the most dangerous bacterial pathogens of the honeybee (*Apis mellifera*). *P. larvae* spores are highly infectious to bee larvae and resist physicochemical influences. *P. larvae* is subtyped using repPCR with ERIC primers (Enterobacterial Repetitive Integrance Consensus) into five genotypes (ERIC I-V), which possess different colony morphology, metabolism and especially virulence. There is a significant genetic variability among isolates of *P. larvae*, which may contribute to differences in virulence.

P. larvae isolates used in this work were obtained from clinical cases of American foulbrood as well as from a debris collected from bee hives with no American foulbrood symptoms from all over the Czech Republic in cooperation with the Beekeeping Research Institute, s.r.o., Dol. The isolates were obtained from larvae and hive debris. Both virulent and avirulent strains were sequenced using the SMRT (single molecule real time) method on the Sequel platform (PacBio). This method is suitable for Whole Genome Sequencing (WGS), because it allows sequencing of long reads with high accuracy, eliminating the effect of a large number of repetitive sequences during the genome assembly. Furthermore, sequencing was also performed on the MiSeq platform (Illumina). Sequences were obtained from 16 strains, which were classified into several groups (clusters). Gene analysis was performed with respect to the occurrence between isolates of ERIC I and ERIC II genotypes. Genes that may have a potential effect on virulence were searched. Strains of *P. larvae* DSM25430 (ERIC II) and DSM7030 (ERIC I) were used for comparison.

Consequently, an insertion sequence IS256 specific for *P. larvae* was also identified. That element occurs in the genome with a large number of copies. Therefore, it can be potentially used for a PCR screening to identify *P. larvae* from hive debris. Two sets of primers were designed and tested in this work on samples of culture of *P. larvae* of four ERIC genotypes.

Key words: *Paenibacillus larvae*, virulence, American foulbrood, Whole Genome Sequencing

OBSAH

Seznam zkratek	11
1 ÚVOD	12
2 Souhrn literatury	14
2.1 Mor včelího plodu	14
2.1.1 Klinické příznaky	14
2.1.2 Přenos	16
2.1.2.1 Horizontální přenos	16
2.1.2.2 Vertikální přenos	17
2.1.3 Patogeneze	17
2.1.4 Výskyt	20
2.1.5 Diagnostika	20
2.1.5.1 Mikroskopie	20
2.1.5.2 Kultivace	21
2.1.5.3 PCR a sekvenace	21
2.1.5.4 Další metody	21
2.1.6 Epizootologie	22
2.1.7 Prevence	22
2.1.8 Léčba	24
2.2 Paenibacillus larvae	25
2.2.1 Obecná charakteristika	25
2.2.2 Taxonomie	25
2.2.3 Genotypizace	26
2.2.3.1 ERIC I	27
2.2.3.2 ERIC II	27
2.2.3.3 ERIC III a IV	27
2.2.4 Faktory virulence	28

2.2.4.1	Toxiny	28
2.2.4.2	Chitináza P/CBP49	29
2.2.4.3	Protein S-vrstvy SplA	30
2.2.4.4	Sekundární metabolity	30
2.2.4.5	Enoláza.....	32
2.2.4.6	Proteázy.....	33
3	Cíle práce.....	36
4	Materiál a metody.....	37
4.1	Materiál.....	37
4.1.1	Bakteriální kmeny použité k celogenomové sekvenaci	37
4.1.2	Bakteriální kmeny použité k testování nově vyvinuté PCR metody.....	38
4.1.3	Kultivace a ověření bakteriálního druhu na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii.....	38
4.1.4	Izolační kity.....	38
4.1.4.1	Izolace DNA z kmenů k sekvenaci.....	38
4.1.4.2	Izolace DNA z kmenů k validaci screeningové PCR metody	39
4.1.5	Kontrola koncentrace a kvality DNA.....	39
4.1.5.1	Qubit	39
4.1.5.2	Agilent.....	39
4.1.6	Gelová elektroforéza	40
4.1.7	PCR reakce.....	40
4.1.7.1	End-Point PCR.....	40
4.1.7.2	Real-Time PCR.....	40
4.1.8	Čištění produktů PCR.....	41
4.1.9	Sekvence.....	41
4.1.9.1	Sangerova sekvence	41
4.1.9.2	Sekvence kmenů Sequel (PacBio).....	41

4.1.9.3	Sekvenace kmenů Miseq (Illumina)	42
4.2	Metody	43
4.2.1	Kultivace kmenů	43
4.2.2	Izolace DNA na sekvenaci	43
4.2.3	Kontrola koncentrace a kvality DNA	44
4.2.3.1	Qubit	44
4.2.3.2	Agilent	45
4.2.4	Sekvenace izolátů Sequel (PacBio)	46
4.2.5	Sekvenace izolátů MiSeq (Illumina)	52
4.2.6	Bioinformatické zpracování výsledků	57
4.2.7	Testování IS256 sekvence	57
4.2.7.1	Vyhledání úseků IS256 vhodných k vytvoření oligonukleotidů	57
4.2.7.2	Navržení oligonukleotidů	57
4.2.7.3	Kultivace kmenů	57
4.2.7.4	Izolace DNA	57
4.2.7.5	End-point PCR	58
4.2.7.6	Sangerova sekvenace produktů PCR	59
4.2.7.7	Real-time PCR	61
5	Výsledky	63
5.1	Výsledky celogenomové sekvenace	64
5.1.1	Epizootologické srovnání kmenů <i>P. larvae</i>	64
5.1.2	Faktory virulence <i>P. larvae</i>	65
5.1.3	Sekundární metabolity	66
5.1.4	Antibiotická rezistence	68
5.1.5	Další	70
5.2	Validace metody pro screeningovou metodu PCR diagnostiky moru včelího plodu z měli	71

5.2.1	Navržené oligonukleotidy	71
5.2.1.1	Oligonuleotidy FR1	71
5.2.1.2	Oligonukleotidy FR2	71
5.2.2	Výsledky End-point PCR a Sangerovy sekvenace.....	72
5.2.2.1	Výsledky End-point PCR oligonukleotidů FR1 a FR2.....	72
5.2.2.2	Výsledky Sangerovy sekvenace oligonukleotidy FR1	73
5.2.2.3	Výsledky Sangerovy sekvenace oligonukletidy FR2	74
5.2.3	Výsledky Real-time PCR z čistých kultur.....	75
5.2.3.1	Oligonukleotidy FR1	75
5.2.3.2	Oligonukleotidy FR2	76
5.2.4	Výsledky Real-time PCR z ředící řady DNA.....	77
5.2.4.1	Oligonukleotidy FR1	77
5.2.4.2	Oligonukleotidy FR2	78
6	Diskuze.....	79
7	Souhrn	86
8	Seznam použité literatury	87

Seznam zkratek

AFB – angl. American Foulbrood – mor včelího plodu

CAMP – Cationic Antimicrobial Peptides

CCM – Czech Collection of Microorganisms

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ddNTP – dideoxyribonukleosidtrifosfát

dNTP – deoxyribonukleosidtrifosfát

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ERIC – Enterobacterial Repetitive Integrance Consensus

LMG – Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie, Univesitat Gent

LPMO – lytické polysacharidové monooxygenázy

LT100 – letální čas pro 100 % včelích larev

MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Ionization-Time-Of-Flight

MRSA – meticillin rezistentní *Staphylococcus aureus*

MYPGP – Muller-Hinton broth, Yeast extract, Potassium phosphate, Glucose and Pyruvate

NGS – Next Generation Sequencing

NRPS – non-ribosomální peptidová syntéza

PCR – Polymerase Chain Reaction

PKS – polyketid syntáza

PLA – *Paenibacillus larvae* agar

PM – peritrofická matrix

REFP – Restriction Endonuclease Fragment Patterns

REP element – Repetitive Extragenic Palindromic element

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

SMRT – Single Molecule Real Time

VRE – vankomycin rezistentní enterokoky

WGS – angl. Whole Genom Sequencing – celogenomová sekvenace

1 ÚVOD

Paenibacillus larvae patří mezi nejnebezpečnější patogeny včely medonosné (*Apis mellifera*). Jedná se o grampozitivní sporulující bakterii z třídy *Bacilli*, která způsobuje mor včelího plodu. *P. larvae* se na základě repPCR s ERIC primery (enterobacterial repetitive integrance consensus) člení do 5 genotypů ERIC I-V. Tyto genotypy se liší morfologií kolonií, metabolismem a virulencí (Genersch et al., 2006, Beims et al., 2020). V této práci se zaměřuji především na rozdíly ve virulenci.

Mor včelího plodu je vysoce infekční onemocnění včelího plodu. Přenos probíhá sporami, které jsou jediné schopné nakazit včelí larvu. Na včelí larvu jsou přeneseny včelími dělnicemi, které larvu krmí. Spory se usazují v hltanových žlázách včelmladušek, ve kterých se tvoří mateří kašička, jakožto výživa pro larvu. Právě skrze výživu, která v sobě obsahuje spory, se larva nakazí (Lindström, 2007). Následně spory germinují ve střevě a bakterie proniká skrz peritrofickou matrix, epitel střevní sliznice do hemocelu. Tkáně včelí larvy se rozkládají na kašovitou hmotu, která později zasychá a tvoří tzv. příškvár, ve kterém se nachází velké množství infekčních spor (Poppinga, Genersch, 2015). Vzhledem k infekčnosti moru včelího plodu je jediné řešení na zastavení nákazy utracení nakaženého včelstva a spálení úlu (Titěra et al., 2009).

Dělení na ERIC genotypy bylo popsáno v roce 2006 na základě práce E. Genersch a kolektivu. Toto dělení se používá dodnes. Genotyp ERIC I se vyskytuje na evropském i americkém kontinentu. Oproti ostatním genotypům usmrcuje včelí larvu pomaleji, jeho letální čas pro usmrcení 100 % včelích larev (LT_{100}) je 12 dní. Genotyp ERIC II se vyskytuje především v Evropě. U tohoto genotypu je LT_{100} 7 dní, stejně jako u genotypů ERIC III a IV. Genotypy ERIC III a IV nejsou často izolovány z klinických případů, vyskytují se v pár historických izolátech (Genersch et al., 2006). Genotyp ERIC V byl popsán v roce 2020 a vykazuje podobné znaky jako genotypy ERIC III a IV (Beims et al., 2020)

Jednotlivé ERIC genotypy se liší i virulencí a jednotlivými faktory virulence. Faktory virulence byly dosud zkoumány především u genotypů ERIC I a II, které jsou momentálně nejčastějšími genotypy izolovanými z klinických případů. Každý z genotypů má jinou strategii pro proniknutí skrze epitel střeva včelí larvy. Oba z genotypů produkují chitinázu P/CBP49, která rozkládá peritrofickou matrix ve střevě. Bez této chitinázy by *P. larvae* nebyl schopný proniknout skrz epitel střeva. Následně

se ale strategie ERIC genotypů liší. U genotypu ERIC I jsou pravděpodobně nejdůležitějšími faktory virulence toxiny (Plx1, Plx2, C3larvin). Tyto toxiny působí na epitel střeva a díky tomu může skrz něj *P. larvae* genotypu ERIC I proniknout. Oproti tomu u genotypu ERIC II jsou hlavním faktorem virulence proteiny S-vrstvy. Pomocí těchto proteinů se *P. larvae* genotypu ERIC II přichytí na střevní epitel a následně skrz něj proniká. Samozřejmě se na virulenci podílí i další faktory virulence jako jsou proteázy nebo sekundární metabolity (Poppinga & Genersch, 2015).

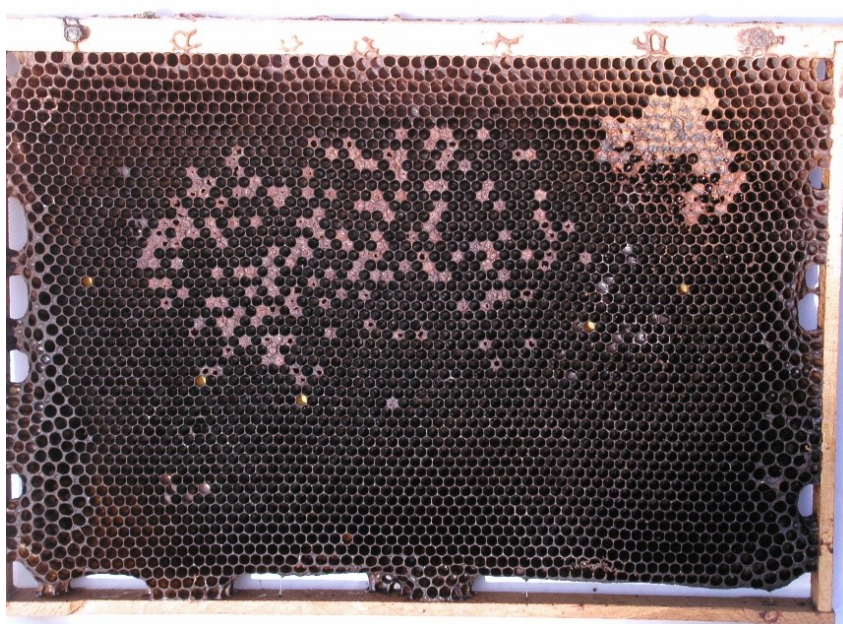
V rámci této diplomové práce byly pomocí celogenomové sekvenace analyzovány izoláty *P. larvae* z území České republiky, které byly rozděleny do skupin (clusterů) podle příbuznosti. Dále byly v genomu vyhledány geny pro potenciální faktory virulence a je porovnán jejich výskyt mezi genotypy ERIC I a II. Byl porovnán jejich výskyt toxinů, proteinů S-vrstvy, proteáz, sekundárních metabolitů a také výskyt genů rezistence k antibiotickým látkám. Dále je v této práci navržena screeningová metoda pro rychlou PCR diagnostiku moru včelího plodu na základě pro *P. larvae* specifické inzerční sekvence IS256.

2 Souhrn literatury

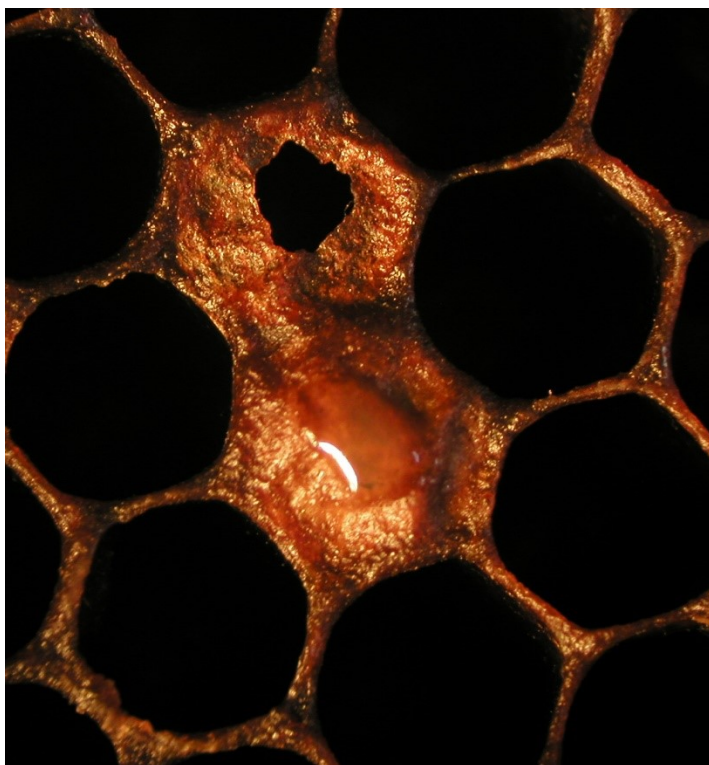
2.1 Mor včelího plodu

2.1.1 Klinické příznaky

Mor včelího plodu lze rozpoznat podle charakteristických změn včelího plodu. Prvním příznakem je mezerovitý plod, jehož plochy jsou v normálních případech ucelené. V klasickém případě klade včelí matka vajíčka pravidelně a sousední buňky se líhnou přibližně ve stejném časovém období. Nepravidelnosti okolo 5 % jsou běžné. Pokud jsou však mezery častější, může to být známka patologického jevu. Neinfekčními příčinami může být přehřátí nebo naopak podchlazení plodu, nebo špatně kladoucí matka. Další příčiny mohou být infekční, způsobené viry, bakteriemi a parazity. Pokud si včelař mezerovitosti všimne, měl by hledat i další klinické příznaky, které mohou naznačovat přítomnost *P. larvae*. Mezi tyto příznaky patří i přítomnost ztmavých propadlých víček buněk, které mohou mít i otvory (Titěra et al., 2009). Dalším příznakem moru včelího plodu jsou zbytky rozložených larev v buňkách. Rozložená larva je hnědá a viskózní. Může se také objevit zápach. Následně po vyschnutí hnědé viskózní hmoty vzniklé rozložením larvy vzniká černý příškvár, který se dá ze spodní strany buňky špatně odstranit (Hansen & Brødsgaard, 1999). Dříve se zbytky rozložených larev dokazovaly tzv. zápalkovým testem. Principem tohoto testu je, že po vložení sirky do buňky a následném vytažení se za sirkou táhne několik centimetrů dlouhé vlákno (Titěra et al., 2009).



Obrázek 2: První příznak moru včelího plodu – mezerovitý plod. Autor: doc. Ing. Jaroslav Hrabák, PhD.



Obrázek 3: Ztmavlá, propadlá víčka buněk s otvory obsahující uhynulé larvy. Někdy může být na víčku přítomná kapka z rozkládající se larvy. Autor: doc. Ing. Jaroslav Hrabák, PhD.



Obrázek 4: Zápalkový test s táhnoucím se vláknem uhynulého plodu. Autor: doc. Ing. Jaroslav Hrabák, PhD.



Obrázek 5: Různá stádia rozkladu nakažené včelí larvy. Autor: doc. Ing. Jaroslav Hrabák, PhD.

2.1.2 Přenos

Mor včelího plodu se nejčastěji do včelstva dostane infikovanou potravou, případně jí zanesou nakažené včely zalétnuté z jiného úlu (Titěra et al., 2009). Přenos moru včelího plodu může být horizontální i vertikální. Horizontální přenos je šíření bakterie v rámci jedné generace mezi včelstvy. Oproti tomu vertikální přenos je roznesení bakterií mezi více generacemi nejčastěji v jednom včelstvu (Lindström et al., 2008). Typ přenosu je důležitým faktorem pro determinaci faktorů virulence. Ve srovnání s patogeny s horizontálním přenosem mají patogeny pouze s vertikálním přenosem sníženou virulenci (Lipsitch et al., 1996).

2.1.2.1 Horizontální přenos

Horizontální přenos je častějším způsobem přenosu než vertikální. *P. larvae* se většinou rozšíří do všech částí úlu. K tomu dochází především při péči o včelí larvu, jako je krmení a čištění (Fries & Camazine, 2001). Při pozření spor dospělou včelou se tyto spory shromažďují v hltanových žlázách, kde je tvořena mateří kašička. Touto kašičkou jsou následně krmeny larvy, u kterých propukne onemocnění (Wilson, 1972).

Další z možností šíření nemoci je v případě úhynu nakaženého včelstva. Následně poté včely z okolních včelstev mohou zásoby z nakaženého a uhynulého včelstva vyloupit a přenést do svého úlu a společně s ním i spory *P. larvae* (Lindström et al., 2008).

Nemoc mohou šířit také včelaři, kteří krmí své včely neznámými krmivy či použitím včelařského vybavení na kterém se mohou spory *P. larvae* nacházet (Fries & Camazine, 2001). Případně také včelaři mohou zakoupit již nakažené včelstvo a tím se následně šíří onemocnění dál (Titěra et al., 2009).

2.1.2.2 Vertikální přenos

Klasický vertikální přenos *P. larvae* hraje méně důležitou roli než horizontální. Tento přenos je teoreticky možný pouze skrze včelí matku do buňky, do níž položí vajíčko (Fries & Camazine, 2001). Podíváme-li se však na včelstvo jako superorganismus, pak za vertikální způsob šíření lze považovat rojení. Pokud bylo původní včelstvo nakaženo, může se mor včelího plodu roznášet rojením i na dlouhé vzdálenosti (Fries et al., 2006).

2.1.3 Patogeneze

Spory *P. larvae* jsou na včelí larvu přeneseny včelími dělnicemi. Pro dospělé jedince včely medonosné (*Apis mellifera*) jsou spory *P. larvae* neinfekční a nezpůsobí u nich onemocnění. Spory projdou skrze trávicí trakt včely, ale větší část z nich se nashromáždí v hltanu a hltanových žlázách, kde se vytváří mateří kašička. Tou jsou krmeny včelí larvy v prvních třech dnech života. Pokud jsou v mateří kašičce přítomny spory *P. larvae*, na ně takto přeneseny (Lindström, 2007).

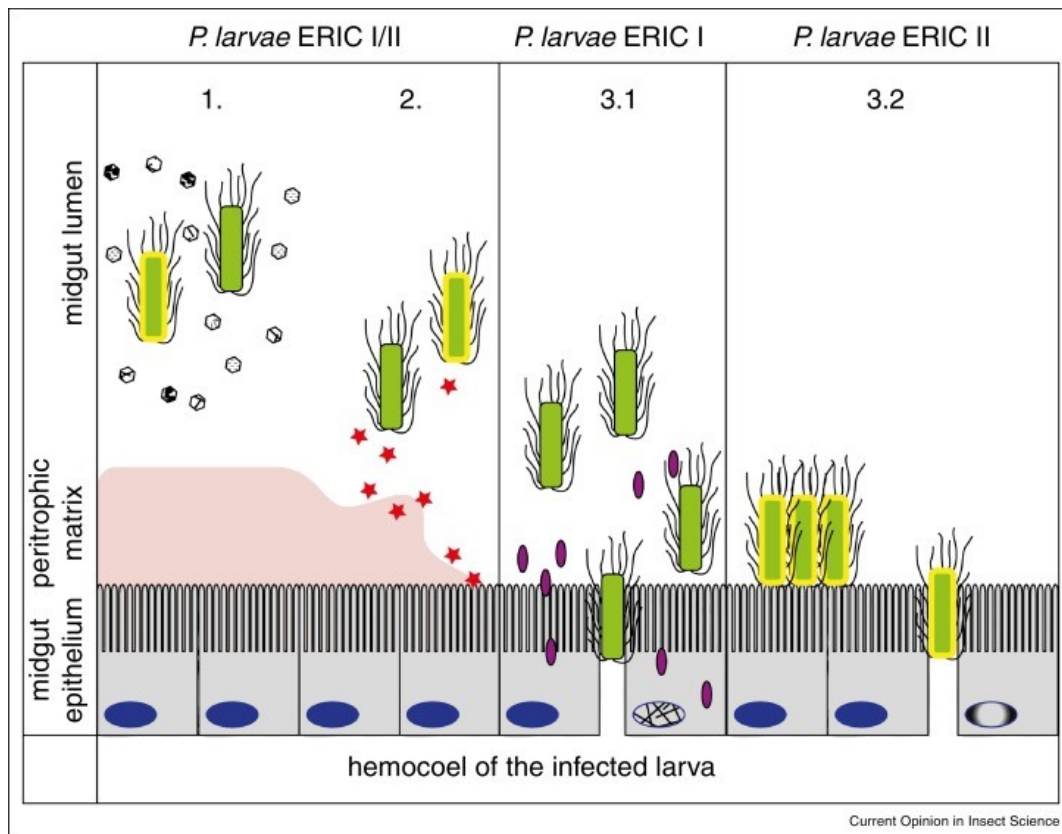
Aby byla včelí larva infikována musí požit spory *P. larvae* do 36 hodin od vylíhnutí (Hoage & Rothenbuhler, 1966). Čím dříve je larva nakažena, tím jednodušší je proniknutí *P. larvae* skrz peritrofickou matrix (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013). Po požití spory začnou uvnitř trávicího traktu nepravidelně klíčit. Následně se vegetativní stádia *P. larvae* masivně množí. V této fázi onemocnění nejsou pozorovatelné žádné klinické příznaky, protože bakterie se v tomto období chová jako komenzál a živí se cukry z potravy obsažené ve střevech (Djukic et al., 2014). V tomto období jsou také do střeva vylučovány sekundární metabolity, které ničí přirozený mikrobiom larvy a mohou také vykazovat cytotoxickou aktivitu (Müller et al., 2015).

Peritrofická matrix (PM) je vrstva oddělující buňky střevního epitelu od střevního obsahu. Chrání střevní epitel před mechanickým poškozením, toxickými látkami a před patogeny. Nejdůležitější složkou PM jsou chitinová vlákna. PM se vyskytuje u většiny

druhů hmyzu (Hegedus, et al., 2009). PM se vyvíjí v prvních dnech života larvy, proto v tomto období *P. larvae* skrze tuto matrix snadněji proniká (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013). Po vyklíčení spor dochází k tvorbě proteáz vázajících chitin, které ničí peritrofickou matrix. Nejdůležitější chitinázou je P/CBP49. Tato chitináza patří ke klíčovým faktorům virulence *P. larvae* (Garcia-Gonzalez et al., 2014c). Více se této chitináze věnuje kapitola 2.2.4.2. Chitináza P/CBP49.

V době, kdy dochází k začátku metamorfózy včelí larvy, začíná *P. larvae* pronikat skrze epitel a přestává žít jako komenzál. Pro *P. larvae* je výhodnější začít invazivní fází až po zavíčkování. Když včelí larvu usmrtí před zavíčkováním, včelí dělnice ji vynesou z úlu a zabrání se tím šíření, což není pro *P. larvae* příliš výhodnou strategií (Spivak & Reuter, 2001).

Bakterie proniká skrze mezibuněčné spoje střevního epitelu do hemocelu. Způsob průniku se liší u jednotlivých genotypů (Poppinga & Genersch, 2015). Genotyp ERIC I pravděpodobně proniká skrz střevní epitel pomocí toxinů, nejčastějšími jsou toxiny Plx, které jsou pro genotyp ERIC I specifické (Djukic et al., 2014). Genotyp ERIC II využívá k průniku protein S-vrstvy SplA, díky kterému je schopen se přichytit ke střevnímu epitelu (Poppinga & Genersch, 2015).



Obrázek 6: Rozdílný průnik skrz střevní epitel u genotypů ERIC I a II (převzato z Poppinga & Genersch, 2015).

1. Sekundární metabolity sekretované *P. larvae* ve střevě včelí larvy (šestihrany)
2. *P. larvae* produkující chitin-degradující enzymy (*P/CBP49*) k narušení peritrofitické matrix (červené hvězdy)
- 3.1 ERIC I genotyp produkující toxiny k průniku skrz střevní epitel (fialové ovály)
- 3.2. ERIC II genotyp, který se váže ke střevnímu epitelu pomocí proteinů S-vrstvy SplA (žlutý okraj)

Když *P. larvae* pronikne skrz střevní epitel do hemocelu, dochází k degradaci tkání a usmrcení larvy. Larva se mění na tekutou, lepkavou, hnědou hmotu s typickým zápachem (Poppinga & Genersch, 2015). Tato hmota následně vysychá s vzniká z ní tzv. příškvar, který obsahuje velké množství spor. Když se tento příškvar snaží včely odstranit, pozřou spory *P. larvae*, které jsou jimi dále roznášeny po úlu (Titěra et al., 2009).

Přítomnost jedné bakterie neznamena vznik onemocnění u dané včelí larvy. S menším množstvím bakterií si je imunitní systém schopen poradit. Problém je až v přítomnosti většího množství bakterií. Odolnost včel proti moru včelího plodu snižuje výskyt jiných onemocnění jako je například varroáza, při které jsou často přenášeny také viry, a ty vyčerpávají imunitní systém včely a následně může snadněji propuknout mor včelího

plodu. Na odolnost včelstva proti moru včelího plodu má vliv také kvalitní potrava a snížení stresových faktorů jako jsou nečistoty, chemické látky a časté přesuny včelstva (Titěra et al., 2009).

2.1.4 Výskyt

Mor včelího plodu je onemocněním, které napadá včelstva po celém světě. Genotyp ERIC I se vyskytuje celosvětově. Genotyp ERIC II byl dosud detekován pouze v Evropě (Genersch et al., 2006). Genotypy ERIC III a IV nejsou častými původci moru včelího plodu. Je možné je nalézt ve sbírkách malém množství historických izolátů. Genotyp ERIC I je nejčastěji se vyskytující. Následován je genotypem ERIC II. V některých oblastech může být ale výskyt genotypů ERIC I a II podobný (Ebeling et al., 2016).

Ohniska moru včelího plodu se v současnosti v České republice se nachází především na Moravě a ve Slezsku. Meziročně nejvíce případů zaznamenává Zlínský, Olomoucký a Moravskoslezský kraj. Avšak pozitivním znakem je, že se od roku 2016 snižuje počet ohnisek. V roce 2016 jich bylo 242, oproti tomu v roce 2017 již pouze 152 a v roce 2018 pouze 113. Tato snižující se tendence může být způsobena efektivnější prevencí moru včelího plodu (www.svscr.cz).

2.1.5 Diagnostika

Včasná diagnostika je vzhledem k závažnosti a infekčnosti onemocnění velmi důležitá. Pokud včelař pozoruje u včelstva výše zmíněné klinické příznaky, je nutné odeslat vzorky do laboratoře (larva, měl, plásty) (Hansen & Brødsgaard, 1999). K laboratorní diagnostice se využívají mikroskopické a kultivační metody, PCR, sekvenace a další metody (de Graaf et al., 2006).

2.1.5.1 Mikroskopie

Mikroskopie je základním mikrobiologickým vyšetřením, které se provádí i při diagnostice moru včelího plodu (Titěra et al., 2009). Test je založen na vyhledávání spor *P. larvae*. Preparát se barví karbol-fuchsinovým barvením (de Graaf et al., 2006). Následně je prohlížen pod optickým mikroskopem při zvětšení 1 000 ×. Pokud je přítomen *P. larvae* je možné rozpoznat vegetativní stádia, sporangia a spory. Pokud tomu tak není, pokračuje se kultivačním vyšetřením. Pozitivita vzorku musí být potvrzena kultivací s následnou taxomickou identifikací *P. larvae* (Titěra et al., 2009).

2.1.5.2 Kultivace

Kultivace patří mezi další základní mikrobiologická vyšetření. Kultivačně je možné *P. larvae* prokázat z plodu, měli, medu, vosku a dalších materiálů (Titěra et al., 2009). Před naočkováním se vzorek zahřívá, aby se z něj odstranily ostatní mikroorganismy a předešlo se kontaminaci. *P. larvae* jakožto sporulující bakterie zahřátí přežije. To nelze použít u měli, kde by se zahřátím slil vosk, z něhož je měl převážně složena. Proto se v tomto případě využívá chemická dekontaminace. Ke kultivaci se rutinně využívá MYPGP (Muller-Hinton broth, yeast extract, potassium phosphate, glucose and pyruvate) agar (de Graaf et al., 2013). Avšak je možné využít také J-agar, krevní agar, PLA agar (*Paenibacillus larvae* Agar) a další (de Graaf et al., 2006). Následně jsou vzorky kultivovány v termostatu při 37 °C za zvýšené tenze CO₂ (5 %). Nárůst kolonií je možné pozorovat po 2–4 dnech. Taxonomická identifikace probíhá na základě morfologie kolonií a jejich charakteristické vůně. Oba znaky se liší podle použitého média. Předběžnou identifikaci je nutné ověřit klasickými metodami (biochemické testy) případně pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Ionization-Time-Of-Flight) (OIE, 2018).

2.1.5.3 PCR a sekvenace

PCR identifikace byla dlouhou dobu založená pouze na základě sekvenace části genu pro 16S rRNA (de Graaf et al., 2006). Metodu lze dále optimalizovat tak, aby umožnila kvantifikaci spor *P. larvae* ve vzorku – qPCR (PCR v reálném čase) (Titěra et al., 2009). Před vlastní PCR je nutné provést extrakci DNA. To je možné provést pomocí komerčních kitů případně jednoduchým zahřátím vzorku na 95 °C po dobu 15 minut (de Graaf et al., 2013).

K bližší identifikaci *P. larvae* pro epizootologické účely je možné také využít sekvenování nové generace. Tato metoda může být využita i na přítomnost *P. larvae* v dělnicích včely medonosné – metagenomické analýzy. Výhodou těchto metod je, že během sekvenace je možné zachytit i další patogeny, které mohou způsobovat jiné infekce (Titěra et al., 2009).

2.1.5.4 Další metody

Mezi další diagnostické metody patří biochemické a imunologické testy. *P. larvae* má specifický biochemický profil, díky kterému je jej možné také diagnostikovat (OIE, 2018). Imunologické testy na *P. larvae* jsou založeny na základě detekce antigenu pomocí specifických protilátek. Zahrnují imunodifuzní test, imunofluorescenci a ELISA

(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Při imunofluorescenci jsou využívány konjugované polyklonální protilátky označené fluorochromy. Při testu ELISA se využívají k detekci bakterie monoklonální protilátky (de Graaf et al., 2006).

2.1.6 Epizootologie

Epizootologické studie jsou založeny na subtypizaci izolovaných kmenů *P. larvae*. Klasické metody k subtypizaci jako je metoda REFP (Restriction Endonuclease Fragment Patterns) a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) nemohou být v případě *P. larvae* použity (Alippi et al., 2002). Avšak pro subtypizaci *P. larvae* mohou být použity metody rep-PCR s použitím REP elementů (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC PCR nebo BOX elementů. ERIC sekvence jsou lokalizované extragenní oblasti bakteriálního genomu obsahující vysoce konzervované oblasti. BOX elementy jsou lokalizovány intragenně a skládají se z několika konzervovaných modulů (boxA, boxB a boxC) (Genersch, 2009). Případně je také možné *P. larvae* typizovat pomocí MLST schématu do 21 klonů (Morrissey et al., 2015).

V současné době se pro epidemiologickou subtypizaci využívají především ERIC sekvence, podle kterých se *P. larvae* dělí na genotypy ERIC I-V (více v kapitole 2.2.3 Genotypizace).

2.1.7 Prevence

Včela medonosná (*A. mellifera*) je velmi důležitou součástí ekosystému, díky své schopnosti opylování, a hraje důležitou roli v zemědělství. Vzhledem k velkému množství patogenů (bakterie, viry, paraziti), které včelu medonosnou napadají, je nutné onemocněním předcházet, výjimkou není ani prevence moru včelího plodu (Morse & Calderone, 2000; Morse & Flottum, 1997).

Základní prevencí moru včelího plodu je včelařská praxe. Včelaři by měli udržovat hygienu včelstva, a to především dezinfekcí nástrojů a úlů. Zároveň je by měl každý včelař provádět kontrolu zdravotního stavu včelstev a chránit je před zdroji nákazy. Zároveň by také včelaři měli zamezovat přístupu včel do neobsazených úlů (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 3). Zároveň by měli pravidelně zasílat měl na vyšetření přítomnosti *P. larvae*, avšak pozitivita laboratorního vyšetření ještě neznamená vypuknutí moru včelího plodu a vyhlášení ohniska. K tomu je ještě potřeba provést prohlídku a ve včelstvu se musí být prokazatelné klinické příznaky (Titěra et al., 2009).

V případě propuknutí onemocnění je provedeno klinické vyšetření včelstev a odebrání vzorků k laboratornímu vyšetření (plásty s klinickými změnami plodu nebo příškvary, měl, medné zásoby) (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 8). Výskyt nákazy je potvrzen, pokud jsou zjištěny klinické příznaky na plodu nebo jsou přítomny příškvary a zároveň je prokázán pozitivní výsledek laboratorního vyšetření odebraných materiálů (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 10). Zároveň podezření na mor včelího plodu je vyloučeno v případě negativních výsledků laboratorního vyšetření (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 9).

V případě potvrzení výskytu nákazy je vymezeno stanoviště výskytu moru včelího plodu jako ohnisko a okolo něj se zřídí ochranné pásmo v okruhu nejméně 3 km. Chovateli v ohnisku nákazy s potvrzeným výskytem moru včelího plodu u více jak 15 % včelstev je nařízeno utracení všech včelstev a likvidace úlů a veškerého spalitelného včelařského vybavení. Chovateli s potvrzeným výskytem moru včelího plodu u méně jak 15 % včelstev, jehož stanoviště je vedeno řádně, jsou povinni utratit nakažená včelstva a zlikvidovat úly a včelařské vybavení. Po utracení včelstev je provedena likvidace včelstva spálením. Med, vosk, propolis a mateří kašička pocházející z ohniska nákazy musí být odstraněny nebo ošetřeny (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 11).

Chovatelům v ochranném pásmu je Krajskou veterinární správou nařízeno zajistit odběr vzorků včel ošetřujících včelí plod nebo měli ze všech úlů k bakteriologickému vyšetření, pokud toto vyšetření nebylo provedeno v posledních 12 měsících. Každý vzorek je tvořen smísením včel nebo měli z maximálně 10 úlů na stanovišti včelstev. Zároveň se chovatelům v ochranném pásmu zakázáno přemísťování včel a včelstev z ochranného pásma. V rámci ochranného pásma je možné přemísťování včel a včelstev se souhlasem krajské veterinární správy na základě žádosti chovatele s doloženým negativním výsledkem laboratorního vyšetření směsného vzorku měli ne starším 12 měsíců (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 11).

Opatření jsou ukončena nejdříve 6 měsíců ode dne likvidace utracených včelstev a likvidace včelařského vybavení v ohnisku, pokud odebrané vzorky prokázaly negativní výsledek. Pokud nedošlo v ochranném pásmu ke splnění ochranných opatření (odběry vzorků s negativním výsledkem), jsou opatření ukončena nejdříve 12 měsíců ode dne likvidace utracených včelstev a včelařského vybavení (Vyhláška č. 18/2018 Sb., § 11).

2.1.8 Léčba

Dříve se v některých evropských státech k léčbě moru včelího plodu užívala antibiotika například tetracykliny nebo makrolidy. Na tato antibiotika však velmi rychle vznikla rezistence (Evans, 2003). Dalším problémem je, že *P. larvae* patří mezi sporulující bakterie. Antibiotika jsou schopna působit pouze na vegetativní stádia bakterií a nepůsobí na spory. Proto po vysazení antibiotik dochází znovu k propuknutí nákazy (Titěra et al., 2009). Dalším problémem při užívání antibiotik je, že mohou pronikat do včelích produktů, především do medu a z něj následně i do ekosystému, včetně lidského organismu (Bogdanov, 2005). Antibiotika mají také negativní vliv na mikrobiom včel. Vzhledem k výše zmíněným důvodům je v Evropské unii antibiotická léčba moru včelího plodu zakázána (Titěra et al., 2009).

Velmi zajímavou alternativou k léčbě antibiotiky by v budoucnu mohla být léčba pomocí bakteriofágů. Bakteriofágy napadají pouze svou cílovou bakterii (v tomto případě *P. larvae*). Ostatní buňky napadeny nejsou. Tato léčba by neměla mít negativní vliv na včelu samotnou, ale ani na její mikrobiom. Zároveň by také mohly bakteriofágy působit v rámci prevence, kdy při přítomnosti fágů ve včelstvu by mor včelího plodu neměl propuknout (Brady et al., 2017).

2.2 Paenibacillus larvae

2.2.1 Obecná charakteristika

Paenibacillus larvae je grampozitivní sporulující bakterie, která je patogenem včely medonosné (*Apis mellifera*). Způsobuje mor včelího plodu (angl. American foulbrood – AFB) (Hansen & Brødsgaard, 1999). Jedná se o aerobní až mikroaerofilní bakterii. V nepříznivých podmínkách tvoří endospory, které jsou vysoce infekční pro včelí larvy. Spory jsou rezistentní k chemickým i fyzikálním vlivům a dokážou přežít mnoho let (Genersch, 2009). *Paenibacillus larvae* je bakterie tyčinkovitého tvaru široká 0,5-0,8 µm a 1,5-6 µm dlouhá. Vyskytuje se jako samostatná buňka nebo ve vláknech. Většina kmenů je pohyblivá (Heyndrickx et al., 1996).

2.2.2 Taxonomie

Říše: *Bacteria*

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Bacillales*

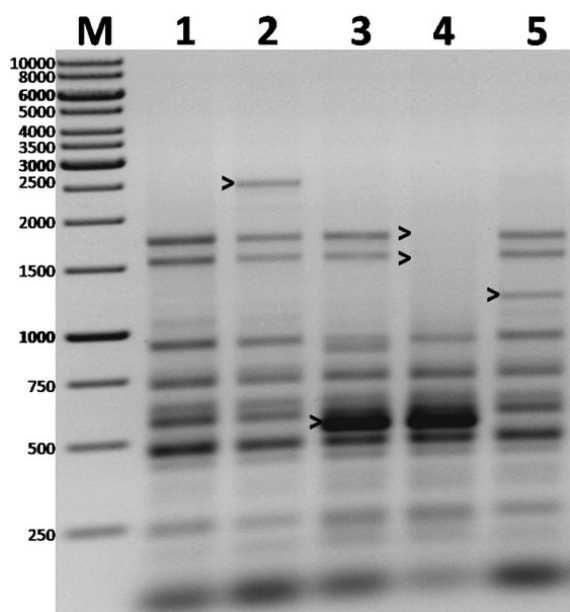
Čeleď: *Paenibacillales*

Paenibacillus larvae byl poprvé vykultivován a popsán v roce 1906 G. F. Whitem, který jej nazval *Bacillus larvae*. Jako další byl popsán druh *Bacillus pulvifaciens* H. Katznelsonem (1950), jakožto bakterie také spjatá s onemocněním včelího plodu. Na základě rRNA analýzy byl ustanoven nový rod *Paenibacillus* do něhož byly přeřazeny *Bacillus larvae* a *Bacillus pulvifaciens* (Ash et al., 1993). V roce 1996 byla provedena detailní biochemicko-genetická studie, kde byl *P. larvae* a *P. pulvifaciens* spojen do jednoho druhu a rozdělen do dvou poddruhů *P. larvae subsp. larvae* a *P. larvae subsp. pulvifaciens* (Heyndrickx et al., 1996). Zatím poslední změna v taxonomii byla provedena v roce 2006, kdy bylo zrušeno členění do poddruhů a zůstal jediný druh *Paenibacillus larvae* (Genersch et al., 2006). V této práci byla také použita rep-PCR pomocí ERIC primerů (enterobacterial repetitive integrance consensus), kde byl *P. larvae* rozdělen do 4 genotypů ERIC I-IV.

2.2.3 Genotypizace

Současná genotypizace vychází z práce E. Genersch a kolektivu (2006). *P. larvae* se pomocí rep-PCR (repetitive element PCR) s ERIC primery (Enterobacterial Repetitive Integrance Consensus) dělí na 5 genotypů ERIC I-V. Ty se liší morfologií kolonií, metabolismem a především virulencí. Všechny genotypy jsou patogenní pro včelu medonosnou (*Apis mellifera*). ERIC I je izolován z klinických případů v Evropě i na Americkém kontinentu, zatímco ERIC II je izolován z klinických případů v Evropě. ERIC III a IV v současné době nejsou izolovány z klinických případů. Nově objevený genotyp ERIC V byl prozatím popsán u jednoho izolátu (Genersch et al., 2006, Beims et al., 2020). Genotypy se liší i ve své patogenезi a průběhu infekce.

Na začátku roku 2020 byl publikován článek o objevu nového hypotetického ERIC genotypu pojmenovaném ERIC V, jedná se o izolát ze Španělska (DSM 106052). Tento izolát vykazuje podobné vlastnosti jako genotypy ERIC III a IV, jako je hemolýza na krevním agaru, vrásčitý povrch spor, krátký LT₁₀₀ a podobné faktory virulence. Nový genotyp ERIC V bude nutné potvrdit a ověřit jeho vlastnosti (Beims et al., 2020).



Obrázek 1: Genotypizace *P. larvae* na ERIC I-V, M-marker, 1-ERIC I, 2-ERIC II, 3-ERIC III, 4-ERIC IV a 5-ERIC V (převzato z Beims et al., 2020)

2.2.3.1 *ERIC I*

Genotyp *ERIC I* netvoří na agaru barevné kolonie ani hemolýzu. Fermentačně zpracovává salicin, nikoliv manitol. Povrch spory je hladký. LT_{100} včelích larev je přibližně 12 dní (Genersch et al., 2006). Specifickými faktory virulence pro *ERIC I* jsou toxiny Plx1 a 2. Dále se zde vyskytuje enoláza v nejvyšším množství ze všech genotypů. V genotypu *ERIC I* není oproti ostatním genotypům exprimována kolagenáza Cola a imunitní inhibitor InhA (Erban et al., 2019).

2.2.3.2 *ERIC II*

Genotyp *ERIC II* roste na krevním agaru s pigmentem bez hemolýzy. Fermentuje manitol, nikoli však salicin. Spora není na povrchu hladká. *ERIC II* má letální čas (LT_{100}) přibližně 7 dní (Genersch et al., 2006). Specifickými faktory virulence pro *ERIC II* jsou protein S-vrstvy SplA a paenilarvin. Dále se zde vyskytuje chitin degradující enzym P/CBP49 exprimovaný v nejvyšší koncentraci ze všech genotypů (Erban et al., 2019).

2.2.3.3 *ERIC III a IV*

Mezi genotypy *ERIC III* a *IV* patří kmeny původně zařazené jako *Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens*. Genotyp *ERIC III* tvoří na agaru barevné kolonie s hemolýzou. Genotyp *ERIC IV* tvoří kolonie bez pigmentace a bez hemolýzy. Oba genotypy fermentují mannitol a nafermentují salicin. Povrch spor je vrásčitý. Pro tyto genotypy je LT_{100} přibližně 7 dní (Genersch et al., 2006).

Tabulka 1: Rozdíly mezi genotypy *Paenibacillus larvae* (převzato z Genersch et al., 2006).

	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
<i>Patogenicita</i>	+	+	+	+
<i>LT₁₀₀</i>	12 dní	7 dní	7 dní	7 dní
<i>Hemolýza na krevním agaru</i>	-	-	+	-
<i>Fermentace mannitolu</i>	-	+	+	+
<i>Fermentace salicinu</i>	+	-	-	-
<i>Barevnost kolonií</i>	-	+	+	-
<i>Povrch spor</i>	hladký	hrubý	vrásčitý	vrásčitý

2.2.4 Faktory virulence

Stejně jako u ostatních patogenů, *Paenibacillus larvae* má různé faktory virulence k úspěšnému napadení včelí larvy. Jedná se o různé toxiny, chitinázy, proteázy, sekundární metabolity a proteiny na membráně.

2.2.4.1 Toxiny

V genomu *P. larvae* se nachází lokusy různých potenciálně funkčních toxinů, které jsou rozdílné u různých genotypů. Toxiny umožňují napadení střevních epiteliálních buněk včelí larvy bez nutnosti kontaktu s buňkou (Ebeling et al., 2016). Toxiny jsou u všech patogenů důležitým faktorem virulence, které vedou k usmrcení nebo modifikaci funkce hostitelské buňky (Fünfhaus et al., 2013).

Nejčastěji vyskytujícími se toxiny jsou AB toxiny. Jedná se o exotoxiny, které jsou uvolňovány do extracelulárního prostředí. Tyto toxiny se skládají ze dvou podjednotek A a B. Podjednotka A má katalytickou funkci (Cherubin et al., 2016). Podjednotka B se váže na buněčný povrch a zprostředkovává vazbu A podjednotky na membránu a její transport do hostitelské buňky. Podjednotka A poté enzymaticky inhibuje normální buněčné funkce (Djukic et al., 2014).

Toxiny Plx1 a Plx2

Toxin Plx1 vykazuje homologii s proteinem MTX1, který je produkován během vegetativního růstu bakterie *Lysinibacillus sphaericus*. Funkce Plx1 je především v působení proti larválním stádiím hmyzu, touto funkcí se podobá MTX1, avšak sekvenčně je podobný piersin-like toxinu, které jsou produkovány skupinou motýlů čeledi *Pieridae*. Předpokládá se, že enzymatickou funkcí Plx1 toxinu je ADP-ribosylace (Fünfhaus et al., 2013).

Plx2 toxin je binárním AB toxinem se dvěma rozdílnými ORFs kódující A a B podjednotku. Podjednotka A Plx2A se řadí mezi C3-like exoenzymy a je podobná Rho-ADP-ribosylačním toxinům (Ebeling et al., 2017). Podjednotka B zase odpovídá C2 binárnímu toxinu *Clostridium botulinum* (Djukic et al., 2014). Tento toxin může vést v hostitelské buňce ke ztrátě cytoskeletu, vedoucí k poškození buňky, což je pozorováno ve střevním epitelu včelí larvy infikované morem včelího plodu (Fünfhaus et al., 2013).

Oba toxiny jsou produkovány genotypem ERIC I. Toxiny se navzájem neovlivňují, ale mohou vzájemně kompenzovat svoje ztráty. Oba tyto toxiny jsou zapojeny do virulence *P. larvae*, avšak nejedná se o klíčové faktory virulence. Bylo prokázáno, že při knock-outu těchto toxinů je stále *P. larvae* virulentní (Fünfhaus et al., 2013).

C3larvin toxin

C3larvin toxin je také AB toxin. Jedná se toxin s glykohydrolázovou a transferázovou aktivitou. Tento toxin je prvním toxinem *P. larvae* s prokázanou enzymatickou aktivitou (Poppinga & Genersch, 2015). Podjednotka B C3larvinB vykazuje podobnost s protektivním antigenem (PA) *Bacillus anthracis*, který je podjednotkou antraxového toxinu (Ebeling et al., 2019). Tento toxin je pravděpodobně exprimovaný v genotypěch ERIC I a II. Ukázalo se, že C3larvin je novým členem rodiny C3 toxinů s mART (mono-ADP-ribosyltransferace) aktivitou (Krska et al., 2015). Z výsledku celogenomové sekvenace (WGS) genotypů ERIC I a II (Djukic et al., 2014) vyplývá, že C3larvin gen je součástí lokusu homologního toxinu Tx7 a TxIII (Ebeling et al., 2019). C3larvin vykazuje vysokou toxicitu při expresi do cytoplazmy kvasinek. Cílem C3larvinu je RhoA, intracelulární GTPáza podílející se na řídicích drahách klíčových buněčných funkcí, jedná se o substrát pro transferázovou reakci (Krska et al., 2015). Ukázalo se, že oproti ostatním C3 toxinům má rozdílný mechanismus vniknutí do hostitelské buňky (Lugo et al., 2016). Strukturní analýza odhalila v N-terminální části několik chybějících konzervovaných zbytků, které mohou hrát roli v průniku do buňky (Krska et al., 2015). C3larvinB působí jako faktor virulence v kmenech *P. larvae*, které mají jeho plnou délku. Mají tedy funkční lokus C3larvinAB (Ebeling et al., 2019).

Cytolysin TlyA

Cytolysiny, někdy také hemolysiny, jsou bakteriální toxiny, způsobující lyzi buňky degradací buněčné membrány enzymaticky nebo tvorbou pórů. Vyskytují se u mnoha patogenních bakterií (Javadi & Katzenmeier, 2016). TlyA patří mezi cytolysiny tvořící póry. Cytolysin TlyA může hrát důležitou roli v patogenezi *P. larvae* (Djukic et al., 2014).

2.2.4.2 Chitináza P/CBP49

První bariérou pro vniknutí *P. larvae* do střevního epitelu je peritrofická matrix, která se skládá z chitinové a glykoproteinové vrstvy, chránící střevní epitel včelí larvy (Djukic et al., 2014). Degradace matrix peritrofické membrány je klíčovým krokem v patogenezi *P. larvae* (Garcia-Gonzalez & Genersch, 2013), Nalezen byl chitin

degradující enzym P/CBP49, který byl izolován z kultury *P. larvae*. Jedná se o člena skupiny AA10 (Auxiliary activity) lytických polysacharidových monooxygenáz (LPMOs). Funkce P/CBP49 v patogenezi moru včelího plodu byla prokázána. Kmeny *P. larvae* s mutovaným genem pro P/CBP49 nebyly schopné degradovat peritrofickou matrix, a tím se staly téměř avirulentními (Garcia-Gonzalez et al., 2014c). Proto je P/CBP49 klíčovým faktorem virulence *P. larvae*. Narušení integrity peritrofické matrix aktivitou P/CBP49 může být předpokladem pro vliv dalších faktorů virulence na hostitelskou buňku (Ebeling et al., 2016).

2.2.4.3 Protein S-vrstvy SplA

Proteiny S-vrstvy SplA se exprimují pouze u genotypů ERIC II. Analýza genů splA ukázala bodovou mutaci tohoto genu v analyzovaných kmenech ERIC I (Poppinga & Genersch, 2015). Proteiny S-vrstvy jsou ve vodě nerozpustné, které mají schopnost se skládat a pokrývat povrch bakteriálních buněk. Bylo prokázáno, že se proteiny S-vrstvy podílejí na mechanismu kolonizace a adheze ke střevnímu epitelu (Poppinga et al., 2012). SplA je pravděpodobně klíčovým faktorem virulence kmenů ERIC II. Jeho relativní molekulová hmotnost je 100 000 (Fünfhaus & Genersch, 2012). SplA se váže na membránu hostitelské buňky, což je možné pouze po rozložení peritrofické matrix pomocí P/CBP49 (Garcia-Gonzalez et al., 2014c).

2.2.4.4 Sekundární metabolity

Paenibacillus larvae musí ve střevech včelí larvy soutěžit o místo se střevním mikrobiomem, který musí úspěšně eliminovat (Ebeling et al., 2016). V tom hrají roli sekundární metabolity, které slouží k obraně, ale také k úspěšné eliminaci ostatních bakterií (Djukic et al., 2014). V genomu *P. larvae* se vyskytují clustery pro non-ribosomální peptidovou syntézu (NRPS) a hybridní NRPS/polyketid syntázu (PKS). Tyto enzymové komplexy tvoří sekundární metabolity, které mají antibakteriální, antifungální, nebo také cytotoxickou aktivitu (Poppinga & Genersch, 2015).

Bacillibactin

Bacillibactin je siderofor, který umožňuje vychytávat železo v podmínkách, kde je jeho nízká koncentrace. Pro patogenní bakterie je železo důležité. Jedná se o omezující faktor, o který soutěží s hostitelem. Proto je pro patogenní bakterie důležitá přítomnost sideroforů, díky kterým je železo získáváno (Müller et al., 2015). Bacillibactin byl poprvé popsán u *Bacillus subtilis*. Ukázalo se, že bacillibactin *Paenibacillus larvae* je homologní s dříve popsáným u *Bacillus subtilis*. Zároveň byly nalezeny homologie i s genovým clusterem pro paenibactin, který se nachází v *Paenibacillus elgii*. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo potvrzeno, že *P. larvae* produkuje bacillibactin (gen *dhb*), katecholový typ sideroforů (Poppinga & Genersch, 2015). Avšak bacillibactin nejde považovat za faktor virulence v pravém slova smyslu, protože při inaktivační mutaci tohoto genu se neprojevila žádná změna ve virulenci (mortalita, progresse onemocnění) v porovnání s wild-typem (Hertlein et al., 2014).

Paenilarviny

Paenilarviny jsou iturin-like lipopeptidy, které jsou podobné s ituriny A a mycosubtiliny rodu *Bacillus* (Müller et al., 2015). U *P. larvae* byly nalezeny tři paenilarviny (A, B, C). Obecně vykazují ituriny silnou antifungální a hemolytickou aktivitu. Antifungální aktivita byla potvrzena i u paenilarvinů (Sood et al., 2014). Paenilarviny stejně jako bacillibactin není faktorem virulence v pravém slova smyslu. Nejedná se o esenciální faktor virulence, ale svojí antifungální aktivitou eliminuje konkurenty ve střevech včelí larvy (Hertlein et al. 2016).

Dále bylo prokázáno, že paenilarviny jsou produkovány v genotypu ERIC II. U tohoto genotypu byla prokázána také motilita označovaná jako „swarming“, která u genotypu ERIC I pozorována nebyla. Swarming motilita je koordinovaný pohyb bičíkatých bakterií, díky kterému je možný rychlý pohyb. U *P. larvae* je to rychlá kolonizace epitelu střeva včelí larvy. Důvodem pro výskyt swarming motility pouze u genotypu ERIC II může být produkce paenilarvinů. Paenilarviny v tomto případě mohou působit jako biosurfaktanty. Paenilarviny nejsou pro swarming esenciální, při jejich snížené expresi se swarming motilita snížila, avšak nebyla úplně zastavena (Fünfhaus et al. 2018b).

Sevadicin

Sevadicin je první geneticky, molekulárně a funkčně potvrzený neribozomální peptid v genomu *P. larvae* (Garcia-Gonzalez et al., 2014a). Nachází se na genovém clusteru

sev s geny *sevA* a *sevB*. Má slabou antibakteriální aktivitu (především proti rodu *Bacillus*) (Müller et al., 2015). Jedná se o tripeptid vyskytující se v genotypu ERIC II. Předpokládá se, že *sevadycin* by mohl mít i alternativní funkci a to, že by mohl mít vliv na mezibuněčnou komunikaci a regulaci exprese (Garcia-Gonzalez et al., 2014a).

Paenilamicin

Paenilamicin je kódován NRPS/PKS hybridním clusterem *pam*, který se složen z genů *pamA-H* a *pamN* (Müller et al., 2014). *Paenilamicin* má silnou antifungální a antibakteriální aktivitu (proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím). Zároveň se předpokládá i cytotoxická funkce na hmyzí buňky. Byl ověřen vliv na mortalitu včelích larev při mutaci genu *pam*, kdy u mutovaného kmene, byl prodloužen letální čas pro usmrcení všech larev (LT₁₀₀). U divokého typu to bylo přibližně 8 dní, u mutovaného kmene přibližně 12 dní. Avšak funkce *paenilamicinu* jakožto toxinu ještě nebyla úplně ověřena (Garcia-Gonzalez et al., 2014b).

Další sekundární metabolity

V genomu *P. larvae* nalezen NRPS/PKS cluster podobný *gramicidin S* syntáze. *Gramicidin S* je silné cyklopeptidové antibiotikum narušující buněčnou membránu mikroorganismů (Djukic et al., 2014).

Dále byly v genom *P. larvae* nalezeny ORF kódující proteiny podobné *lanthionine* syntáze, což vede k předpokladu, že některé kmeny *P. larvae* produkují lantibiotika (Djukic et al., 2014). Lantibiotika jsou malé peptidové antimikrobiální látky odvozené od ribosomálně syntetizovaných proteinů. Patří mezi ně například *mersacidin*, *mutacin*, *subtilin* a *nisin*. Jedná se o baktericidní antibiotika účinkující proti grampozitivním bakteriím. Některá z lantibiotik jsou účinná na MRSA (*methicillin* rezistentní *Staphylococcus aureus*), VRE (*vancomycin* rezistentní enterokoky) a některé další grampozitivní bakterie rezistentní k *oxacilinu* (Willey & van der Donk, 2007).

2.2.4.5 *Enoláza*

Enoláza je cytosolický enzym, který je zapojen do glykolýzy. Má toxický a imunogenní efekt na včelí larvu. Její produkce je detekována ve vegetativních buňkách *P. larvae*, na povrchu spor a je také secernována do okolního prostředí (Antúnez, Anido et al., 2011). *Enoláza* byla detekována ve všech genotypch *P. larvae*. V genotypu ERIC I je jí však největší množství. Tím se ukázalo, že *enoláza* není esenciálním faktorem virulence, ale svůj podíl na patogenitě má ve všech genotypch. Význam však může mít

v genotypu ERIC I, kde je jí nejvyšší množství a zároveň v ERIC I chybí důležité faktory virulence nacházející se v ostatních genotypech (Erban et al., 2019).

2.2.4.6 Proteázy

Proteolytické enzymy hrají důležitou roli ve virulenci a patogenezi mnoha patogenních bakterií, virů i parazitů. Umožňují například snadnější vstup do buňky hostitele, trávení proteinů, únik imunitnímu systému apod. U *P. larvae* byly prokázány proteázy s rozdílnou proteolytickou aktivitou. Nejvíce se zde vyskytují metalloproteázy a následně pak serinové a cysteinové proteázy (Hrabák & Martínek, 2007).

Metalloproteázy

Metalloproteázy jsou jedním z nejvýznamnějších faktorů virulence u mnoha bakteriálních patogenů (Antúnez et al., 2009). Pro *Paenibacillus larvae* jsou metalloproteázy nejvýznamnější a nejčastější skupinou proteáz. Nejvíce zastoupené jsou zinek dependentní metalloproteázy (Hrabák & Martínek, 2007). Nejspíše se podílejí na degradaci antimikrobiálních peptidů a tkání včelí larvy (Antúnez, Arredondo, et al., 2011).

Jednou z metalloproteáz je kolagenáza ColA, která byla detekována v genotypch ERIC II-IV (Erban et al., 2019). Bakteriální kolagenázy představují významný faktor virulence, protože degradují povrchové buněčné struktury (Duarte et al, 2014).

Další metalloproteázou je imunitní inhibitor InhA, patřící do skupiny M6. Analýza jeho struktury ukázala, že by mohl patřit do skupiny thuringilysinů, které jsou produkovány *Bacillus thuringiensis* a eliminují antibakteriální proteiny. InhA také hydrolyzuje cecropiny v hemolymfě hmyzu, čímž inhibuje imunitní odpověď (Lövgren et al., 1990). Předpokládá se, že InhA napomáhá uniknutí a přežití imunitní odpovědi včelí larvy (Djukic et al., 2014).

Kolagenáza ColA i imunitní inhibitor InhA nejsou exprimovány v genotypu ERIC I. Vzhledem k rozdílné expresi těchto proteinů v rámci genotypů mohou být ColA a InhA důležitými faktory virulence způsobující rozdíly ve virulenci mezi jednotlivými ERIC genotypy (Erban et al., 2019).

Velmi zajímavým faktorem je bacillolysin, který se vyskytuje pouze u ERIC IV (Erban et al., 2019). Bacillolysin je zinek dependentní metalloproteáza vyskytující se u jiných příslušníků rodu *Bacillus* (Narasaki et al., 2005).

Serinová proteáza HtrA

Serinová proteáza HtrA je významným faktorem virulence patogenní bakterie *Streptococcus pneumoniae*. HtrA (high-temperature requirement A) je důležitá pro bakteriální odpověď na stres. HtrA se jakožto posttranslační regulátor podílí na bakteriocinové aktivitě a dělení buněk (De Stoppelaar et al., 2013). Proteáza HtrA byla detekována také v *Paenibacillus larvae*. Nachází se ve všech genotypech, avšak v ERIC I se jí nachází nejmenší koncentrace. HtrA může být dalším významným faktorem virulence v patogenicitě moru včelího plodu (Erban et al., 2019).

Další proteázy

P. larvae produkuje i další proteázy, které mohou mít vliv na virulenci. Patří mezi ně například enhancinu podobné proteáza, která napomáhá narušit peritrofickou matrix ve střevě larvy (Djukic et al., 2014). Mezi další proteázy patří endopeptidáza LytE, endopeptidáza buněčné stěny ze skupiny M23/M37, peptidáza M20, a další (Erban et al., 2019).

Tabulka 2: Faktory virulence u jednotlivých ERIC genotypů *P. larvae*. Zdroj vlastní.

	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
<i>Toxiny Plx1 a 2</i>	+	-	-	-
<i>C3larvin toxin</i>	+	+	×	×
<i>Cytolysin TlyA</i>	+	+	×	×
<i>Chitináza P/CBP49</i>	+	+ (největší množství)	+	+
<i>Protein SplA</i>	-	+	-	-
<i>Bacillibactin</i>	+	+	×	×
<i>Paenilarviny</i>	-	+	×	×
<i>Sevadicin</i>	-	+	×	×
<i>Paenilamicin</i>	+	+	+	+
<i>Enoláza</i>	+	+	+	+
	(největší množství)			
<i>Kolagenáza ColA</i>	-	+	+	+
<i>Imunitní inhibitor InhA</i>	-	+	+	+
<i>Bacillolysin</i>	-	-	-	+
<i>Proteáza HtrA</i>	+	+	+	+

+ faktor virulence se v genotypu nachází

- faktor virulence se v genotypu nenachází

× v literatuře není psáno, zda se faktor virulence v genotypu nachází či nikoliv

3 Cíle práce

- 1) Na základě celogenomové sekvenace provést epizootologické srovnání sbírkových a historických kmenů *P. larvae*.
- 2) Vyhledat geny, které by se potenciálně mohly podílet na virulenci a porovnat jejich výskyt mezi genotypy *P. larvae* ERIC I a II.
- 3) Navrhnout rychlou screeningovou PCR metodu k diagnostice moru včelího plodu.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny použité k celogenomové sekvenaci

K celogenomové sekvenaci byly použity kmeny *P. larvae* genotypů ERIC I-III. Bylo osekvenováno 16 kmenů *P. larvae*. Z toho 5 kmenů patří mezi sbírkové referenční kmeny. Zbýlých 11 kmenů bylo získáno z Výzkumného ústavu včelařského, s.r.o, Dol. Původ těchto kmenů je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Seznam kmenů použitých k WGS.

Kmen	Zdroj	ERIC genotyp
DSM7030	DSMZ ¹	I
CCM4484	CCM ²	I
DSM25430	DSMZ ¹	II
LMG16252 bílý	LMG ³	III
LMG16252 červený	LMG ³	III
1682 07	VÚVč Dol ⁴ , Brno	×
2567 15	VÚVč Dol ⁴ , Kyje, P-9	×
2677 09	VÚVč Dol ⁴ , Hradec Králové	×
317 80	VÚVč Dol ⁴ , Klůček	×
2630 09	VÚVč Dol ⁴ , Vídeň	×
1569 07	VÚVč Dol ⁴ , Písek	×
1497 07	VÚVč Dol ⁴ , Písek	×
P8 89	VÚVč Dol ⁴ , Prostějov	×
206 77	VÚVč Dol ⁴ , Spořilov	×
596 83	VÚVč Dol ⁴ , Bezděčín	×
757 82	VÚVč Dol ⁴ , Ouběnice	×

¹Sbírkové kmeny Leibnitz Institute – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Německo

²Sbírkové kmeny Czech Collection of Microorganism, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

³Sbírkové kmeny Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie, Univesitat Gent, Belgie

⁴Historické kmeny z Výzkumného ústavu včelařského, Dol

4.1.2 Bakteriální kmeny použité k testování nově vyvinuté PCR metody

K testování screeningové PCR metody k detekci moru včelího byly použity sbírkové referenční kmeny genotypů ERIC I-IV. Následně byla ještě DNA z kmene DSM7030 (ERIC I) nařaděna v desítkovém ředění a otestována senzitivita metody.

Tabulka 4: Seznam použitých kmenů k testování nově vyvinuté metody.

Číslo vzorku	Původ	ERIC genotyp
DSM7030	DSMZ ¹	I
DSM25430	DSMZ ¹	II
LMG16252	LMG ²	III
DSM3615	DSMZ ¹	IV

¹Sbírkové kmeny Leibnitz Institute – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Německo

²Sbírkové kmeny Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie, Univesitat Gent, Belgie

4.1.3 Kultivace a ověření bakteriálního druhu na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii

a) Materiál

- PVX agar (čokoládový agar) (Biomérieux)
- Matrice na MALDI TOF - kyselina alfa-cyano-4-hydroxyskořicová o koncentraci 10 mg/ml (Bruker Daltonik) v 50% acetonitrilu (Sigma-Aldrich) s přidavkem kyseliny trifluoroctové (2,5 %, v/v, Sigma-Aldrich)

b) Vybavení

- Jednorázové bakteriologické kličky
- Termostat se zvýšenou tenzí CO₂ (10 %)
- MALDI destička (Bruker Daltonik)
- hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MicroFlex LT (Bruker Daltonik)
- MBT Compass software

4.1.4 Izolační kity

4.1.4.1 Izolace DNA z kmenů k sekvenaci

a) Reagencie

- Izolační kit **NucleoSpin® Microbial DNA** (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) obsahující MG Lysis Buffer, BE Elution Buffer, BW Wash Buffer, B5 Wash Buffer, Liquid Proteinase K, NucleoSpin® Bead Tubes Type B, NucleoSpin® Microbial DNA Columns, sběrné zkumavky

b) Vybavení

- Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf)
- Jednorázová bakteriologická klička
- Třepačka
- Pipety a špičky (Eppendorf)
- 1,5ml zkumavky (Eppendorf)

4.1.4.2 Izolace DNA z kmenů k validaci screeningové PCR metody

- dH₂O
- jednorázová bakteriologická klička
- centrifuga MiniSpin® (Eppendorf)
- 1,5ml zkumavky (Eppendorf)

4.1.5 Kontrola koncentrace a kvality DNA

4.1.5.1 Qubit

a) Reagencie

- Qubit® dsDNA HS Assay kit (Invitrogen™) obsahující Qubit® dsDNA HS Reagent, Qubit® dsDNA HS Buffer a standard 1 a 2

b) Vybavení

- Qubit® Fluorometer (Invitrogen™)
- Vortex
- Pipety a špičky (Eppendorf)
- Qubit® tubes (Invitrogen™)

4.1.5.2 Agilent

a) Reagencie

- High Sensitivity D5000 Sample Buffer (Agilent Technologies, Inc.)
- High Sensitivity D5000 Ladder (Agilent Technologies, Inc.)
- High Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent Technologies, Inc.)

b) Vybavení

- 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Inc.)
- 0,2 ml strip s víčky
- Pipety a špičky (Eppendorf)
- vortex
- centrifuga MiniSpin® (Eppendorf)
- 2200 TapeStation Controller Software (Agilent Technologies, Inc.)

4.1.6 Gelová elektroforéza

a) Reagencie

- Certified™ Molecular Biology Agarose (Bio-Rad s. r. o.)
- TBE pufr (500 ml dH₂O, 0,89 M kyselina boritá, 0,89 M TRIS, 20 mM EDTA) – před použitím se takto připravený pufr 10x ředí s destilovanou vodou
- Ethidium bromid roztok (Sigma-Aldrich, Inc., 10 mg/ml)

b) Vybavení

- Owl EasyCast™ B1 (Thermo Scientific)
- Elektrický zdroj - Consort EV243
- Pipeta a špičky (Eppendorf)
- Mikrovlnná trouba

4.1.7 PCR reakce

4.1.7.1 End-Point PCR

a) Reagencie

- Red Taq 2X Master Mix (VWR International)
- Sada oligonukleotidů (sekvence dostupné ve výsledcích)
- dH₂O

b) Vybavení

- Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™)
- Vortex
- Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf)
- Pipety a špičky (Eppendorf)

4.1.7.2 Real-Time PCR

a) Reagencie

- TaqMan® Multiplex Master Mix (Applied Biosystems™)
- Sada oligonukleotidů (sekvence dostupné ve výsledcích)
- dH₂O

b) Vybavení

- MIC qPCR cycler (Bio Molecular Systems)
- Vortex
- Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf)
- Pipety a špičky (Eppendorf)

4.1.8 Čištění produktů PCR

a) Reagencie

- AMPure® XP magnetické kuličky (Beckman Coulter, Inc.)
- 70% etanol
- dH₂O

b) Vybavení

- DynaMag™-96 Side magnet (Invitrogen™)
- Pipety a špičky (Eppendorf)
- Zkumavky (Eppendorf)

4.1.9 Sekvence

4.1.9.1 Sangerova sekvenace

a) Reagencie

- BigDye® Terminator 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems™)
- BigDye® Terminator Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems™)
- Sada oligonukleotidů (sekvence dostupné ve výsledcích)

b) Vybavení

- Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™)
- Sekvenační destička - MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems™)
- 3500 Dx Series Genetic Analyzer CS2 (Applied Biosystems™)

4.1.9.2 Sekvence kmenů Sequel (PacBio)

a) Reagencie

- **SMRTbell Express Template Prep kit 2.0** (Pacific Biosciences) obsahující DNA Prep Buffer, NAD, Enzyme Dilution Buffer, Nuclease-free voda, DNA Prep Additive, DNA Prep Enzyme, DNA Damage Repair Mix v2, End Prep Mix, Overhang Adapter v3, Ligation Mix, Ligation Additive, Ligation Enhancer, Sequencing primer v4, 10× Primer Buffer v2, 1× Elution Buffer
- Barcoded Overhang Adapter Kit (Pacific Biosciences)
- AMPure® PB Beads (Pacific Biosciences)
- Absolutní etanol molekulární čistoty

b) Vybavení

- Pipety a Lo-Retention špičky (Eppendorf)
- Lo-bind zkumavky (Eppendorf)
- g-TUBE (Covaris Inc.)
- magnetický stojánek

- Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf)
- Vortex
- Termoblok
- Sekvenátor Sequel (Pacific Biosciences)

4.1.9.3 *Sekvenace kmenů Miseq (Illumina)*

a) Reagencie

- **Nextera® XT DNA Library Preparation Kit** (Illumina) obsahující ATM Amplicon Tagement Mix, TD Tagment DNA Buffer, NT Neutrralize Tagment Buffer, NPM Nexter PCR Master mix, index primery i5 a i7, AMPure XP kuličky, RSB Resuspension Buffer, HT1 Hybridization Buffer
- MiSeq reagent cartridge (Illumina)
- Absolutní etanol molekulární čistoty
- 1M NaOH

b) Vybavení

- Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf)
- Hard-Shell® 96-Well PCR Plates (Bio-Rad)
- Vortex
- Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™)
- Pipety a Lo-Retention špičky (Eppendorf)
- Magnetický stojánek
- Sekvenátor MiSeq (Illumina)

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace kmenů

- 1) Kmeny, které byly uchovány v glycerol-sérovém bujonu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, vyočkujeme na PVX agar (čokoládový agar) (Biomerieux, CZ)
- 2) Kmeny byly kultivovány v termostatu se zvýšenou tenzí CO_2 při teplotě $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 dnů.
- 3) Bakteriální druh po nárůstu byl zkontrolován pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF MicroFlex LT (Bruker Daltonik) za použití softwaru MBT Compass. Jako matrice byla použita kyselina alfa-cyano-4-hydroxykyselinová o koncentraci 10 mg/ml (Bruker Daltonik) v 50% acetonitrilu (Sigma-Aldrich) s přidavkem kyseliny trifluoroctové (2,5 %, v/v, Sigma-Aldrich)

4.2.2 Izolace DNA na sekvenaci

Izolace DNA byla provedena pomocí izolačního kitu NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG).

- 1) **Příprava vzorku:** Bakteriální kultura byla resuspendována jednorázovou bakteriologickou kličkou ve 100 μl roztoku BE.
- 2) **Lyze vzorku:**
 - a) Bakteriální suspenze byla přenesena do NucleoSpin® Bead Tube Type B. Následně byl přidán 40 μl MG pufu a 10 μl Proteinasy K.
 - b) Následně byly zkumavky třepány na třepačce na maximální otáčky při pokojové teplotě po dobu 12 minut.
 - c) Zkumavky byly poté centrifugovány po dobu 30 s při $11\ 000 \times g$.
- 3) **Převedení DNA do pufu:**
 - a) Do zkumavek bylo přidáno 600 μl MG pufu a promícháno na vortexu po dobu minimálně 3 s.
 - b) Následně byly zkumavky centrifugovány po dobu 30 s při $11\ 000 \times g$.
- 4) **Navázání DNA na membránu:**
 - a) Supernatant byl přenesen do NucleoSpin® Microbial DNA Column, které byly vloženy do 2 ml sběrné zkumavky
 - b) Zkumavky byly centrifugovány 30 s při $11\ 000 \times g$.
 - c) Kolonky byly umístěny do nové sběrné 2 ml zkumavky.

5) Promytí membrány:

- a) Při prvním promytí bylo přidáno 500 µl BW pufru a následně byly zkumavky centrifugovány 30 s při $11\,000 \times g$.
- b) Proteklá tekutina byla vylita a kolonky byly následně vráceny zpět do prázdné sběrné zkumavky.
- c) Při druhém promytí bylo přidáno 500 µl B5 pufru a následně byly zkumavky centrifugovány 30 s při $11\,000 \times g$.
- d) Proteklá tekutina byla vylita a kolonky byly následně vráceny zpět do prázdné sběrné zkumavky.

6) Sušení membrány:

- a) Kolonky byly ve sběrné zkumavce znovu centrifugovány po dobu 30 s při $11\,000 \times g$.

7) Eluce DNA:

- a) Kolonky byly umístěny do 1,5 ml nuclease-free zkumavek.
- b) Do kolonky bylo přidáno 100 µl BE pufru.
- c) Následně byly kolonky inkubovány při pokojové teplotě po dobu 1 minuty.
- d) Zkumavky s kolonkou byly centrifugovány po dobu 30 s při $11\,000 \times g$. V proteklé tekutině se nacházela DNA.

4.2.3 Kontrola koncentrace a kvality DNA

4.2.3.1 Qubit

K měření koncentrace DNA na Qubit[®] Fluorometer byly využity reagenty Qubit[®] dsDNA HS Assay kit (ThermoFisher Scientific, Inc.).

Nejdříve si byl smíchán Qubit[®] dsDNA HS Reagent s Qubit[®] dsDNA HS Buffer v poměru 1:200. Můžeme si připravit větší množství pracovního roztoku pro více vzorků.

1) Kalibrace přístroje

Kalibrace probíhá pomocí dvou komerčních standardů o různé koncentraci DNA.

- a) Do dvou tenkostěnných zkumavek vhodných pro měření na Qubit[®] fluometru bylo dáno 190 µl pracovního roztoku.
- b) Do zkumavek bylo přidáno 10 µl standardu 1 a 2, poté byly zvortexovány minimálně 2 s. Dáme pozor, aby se nevytvořily bubliny.
- c) Následně proběhla inkubace 2 minuty a poté byla změřena koncentrace DNA na přístroji.

2) Měření vzorků

- a) Do 2 tenkostěnných zkumavek vhodných pro měření na Qubit[®] fluometru bylo dáno 198 μ l pracovního roztoku.
- b) Následně bylo přidáno 2 μ l vzorku a zvortexováno minimálně 2 s. Dáme pozor, aby se nevytvořily bubliny.
- c) Následně proběhla inkubace 2 minuty a poté byla změřena koncentrace DNA na přístroji.

4.2.3.2 *Agilent*

Ke kontrole kvality byl využit přístroj 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Inc.) se softwarem 2200 TapeStation Controller Software a reagentie TapeStation System HS D5000 (Agilent Technologies, Inc.).

- a) Reagentie byly temperovány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
- b) Reagentie byly zvortexovány.
- c) Byly připraveny 0,2 ml zkumavky (strip) určené pro přístroj Agilent.
- d) Do první zkumavky byl připraven velikostní marker smícháním 2 μ l High Sensitivity D5000 Sample Buffer s 2 μ l High Sensitivity D5000 Ladder.
- e) Do zbylých pozic byly připraveny vzorky smícháním 2 μ l High Sensitivity D5000 Sample Buffer s 2 μ l vzorku.
- f) Strip byl zvortexován a následně krátce centrifugován, aby tekutina nezůstala na víčku.
- g) Do přístroje byl vložen High Sensitivity D5000 ScreenTape, vzorky a potřebný počet špiček.
- h) Následně byla spuštěna analýza.

4.2.4 Sekvenace izolátů Sequel (PacBio)

1) Princip

U tohoto typu sekvenace je využívána metoda SMRT (Single Molecule Real Time), která patří mezi NGS (Next Generation Sequencing) metody. Tato metoda sleduje syntézu DNA v reálném čase. Nejdříve se z úseků dsDNA za přidání adaptérů vytvoří cirkulární templát. Dále je přidána polymeráza a primery. Sekvenace probíhá v jamkách, do kterých se vejde pouze jedna molekula DNA. Jakmile se aktivuje polymeráza, začne dosyntetizovávat druhé vlákno DNA. Nukleotidy jsou fluorescenčně značené. Během syntézy se jednotlivé fluorescenční barvy uvolňují a záření je emitováno. Toto záření je následně zachycováno detektorem a vyhodnoceno (www.pacb.com).

2) Měření koncentrace vyizolované DNA na Qubitu

Postupovali jsme podle návodu v bodě 4.2.3.1. Qubit

3) Stříhání genomové DNA za použití Covaris g-TUBE

- a) Jednotlivé vzorky byly naředěny pomocí elučního pufru na finální koncentraci 10 ng/μl v objemu 100 μl (celková koncentrace DNA = 1,0 μg)
- b) Naředěná gDNA byla přenesena do g-TUBE a centrifugována 2 minuty při 2029 × g pro dosažení cílové velikosti 10-15 kb.
- c) Centrifugace byla opakována, dokud veškerá gDNA neprošla skrz membránu zkumavky. (2-3 centrifugace)
- d) Poté byly g-TUBE obráceny a opět centrifugovány 2 minuty při 2029 × g.
- e) Centrifugaci byla opakována, dokud veškerá gDNA neprošla skrz membránu zkumavky. (2-3 centrifugace)
- f) Nastříhanou gDNA byla přesunuta to čisté 1,5 ml Lo-bind zkumavky.

4) Koncentrování nastříhané gDNA za použití AMPure PB Beads

- a) Ke každému nastříhanému vzorku gDNA byl přidán 0,45násobek objemu AMPure PB
- b) 15–20x byl promíchán pipetou se špičkou se širokým koncem.
- c) Vzorek byl rychle centrifugován po dobu 1 s k zachycení kuliček na dně zkumavky.
- d) Vzorky byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě.

- e) Poté byly zkumavky umístěny do magnetického stojánu, aby došlo k zachycení kuliček na stěnu zkumavky a vyčerení roztoku.
- f) Zkumavky byly nechány stále na magnetickém stojánu a byl odpipetován supernatant a uložen do jiné zkumavky pro případ kontroly. Nesmíme poškodit peletu a nasát kuličky.
- g) Kuličky byly promyty čerstvě připraveným 80% etanolem.
- Zkumavky byly nechány na magnetickém stojánu.
 - Bylo přidáno dostatečné množství 80% etanolu k promytí (cca 1ml). Etanol byl přidáván pomalu po opačné straně zkumavky, než jsou kuličky, aby nedošlo k porušení pelety.
 - Po 30 s byl opatrně odsán etanol, bez porušení pelety.
 - Tento krok byl 2x opakován.
- h) Následně byl odstraněn zbytkový etanol
- Zkumavky byly vyndány z magnetické destičky a krátce centrifugovány (asi 1 s). Kuličky i etanol byli na dně zkumavky
 - Zkumavky byly umístěny znovu do magnetické destičky a kuličky byly odděleny.
 - Zbytkový etanol byl odpipetován.
- i) Bylo zkontrolováno, zda nezůstaly ve zkumavce kapky etanolu. Pokud ano předchozí krok byl zopakován.
- j) Eluce čisté DNA
- Do zkumavky ke kuličkám bylo přidáno 16 μ l elučního pufru.
 - Obsah zkumavky byl 15x pořádně promíchán pipetou se špičkou se širokým koncem, aby byla směs homogenní.
 - Vzorek byl inkubován 15 minut při 37 °C
 - Zkumavky byly krátce centrifugovány a umístěny znovu do magnetického stojánu.
 - Kuličky se oddělily a supernatant obsahující čistou gDNA byl přenesen do nové 1,5 ml Lo-Bind zkumavky.
- k) Nastříhanou DNA je možné uchovávat maximálně 2 týdny při 4 °C nebo při – 20 °C delší dobu.

5) Kvantifikace a kontrola kvality nastříhané gDNA

- a) Bylo naředěno 1 μl purifikované gDNA s 9 μl elučního pufru. Jeden μl této naředěné gDNA byl použit ke změření její koncentraci na Qubit® fluorometru za použití Qubit® HS DNA reagensií. (viz kapitola 4.2.3.1. Qubit)
- b) Následně zbylých 9 μl gDNA bylo použito ještě pro kontrolu kvality a zjištění velikosti fragmentů na přístroji Agilent. (viz kapitola 4.2.3.2. Agilent)

6) Odstranění jednovláknových převisů

- a) Pomocí elučního pufru byla upravena koncentraci nastříhané gDNA na hodnotu 33ng/ μl a poté bylo 14,6 μl přepipetováno do nové zkumavky.
- b) Byl naředěn 1 μl DNA Prep Additive ve 4 μl Enzyme Dilution Buffer. Takto naředěný DNA Prep Additive musí být použit vždy čerstvý, neskladujeme jej.
- c) Byl připraven DNA Prep Master Mix podle tabulky 5.

Tabulka 5: Příprava DNA Prep Master Mixu.

Reagencie	Množství na N-plex (μl)
DNA Prep Buffer	N x 2,33 x 1,25
NAD	N x 0,33 x 1,25
Diluted DNA Prep Additive (viz krok b)	N x 0,33 x 1,25
DNA Prep Enzyme	N x 0,33 x 1,25

V mixu se počítá s 25 % navíc, kvůli chybám v pipetování.

- d) Bylo smícháno 3,3 μl připraveného DNA Prep Master Mix s 14,6 μl naštěpené gDNA (následný celkový objem je 17,9 μl).
- e) Směs byla zamíchána jemným poklepáním prstu na zkumavky a jemně centrifugována, aby byl obsah navrácen na dno zkumavky.
- f) Vzorek byl inkubován 15 minut při 37 °C a poté byl uložen na led.

7) Oprava poškozené DNA

- a) Byl připraven DNA Damage Master Mix podle tabulky 6.

Tabulka 6: Příprava DNA Damage Master mixu

Reagencie	Množství na N-plex (μl)
DNA Damage Repair Mix v2	N x 0,67 x 1,25
Enzyme Dilution Buffer	N x 0,33 x 1,25

V mixu se počítá s 25 % navíc, kvůli chybám v pipetování.

- b) Byl smíchán 1 μl DNA Damage Master Mixu s 17,9 μl vzorku (následný celkový objem je 18,9 μl).
- c) Směs byla zamíchána jemným poklepáním prstu na zkumavky a jemně centrifugována, aby byl obsah navrácen na dno zkumavky.
- d) Vzorek byl inkubován 30 minut při 37 °C a poté uložen na led.

8) End-Repair/A-tailing

- a) Byl smíchán 1 μl End Prep Mixu s 18,9 μl vzorku (následný celkový objem je 19,9 μl)
- b) Směs byla zamíchána jemným poklepáním prstu na zkumavky a jemně centrifugována, aby byl obsah navrácen na dno zkumavky.
- c) Vzorek byl inkubován 10 minut při 20 °C a poté 30 minut při 65 °C. Poté byly zkumavky umístěny na led.

9) Ligace značených adaptérů (barcode)

- a) Byly smíchány 2 μl Barcoded overhang adapter s 19,9 μl A-tailed sample (pro každý vzorek je nutné vybrat specifický adaptér; následný celkový objem je 21,9 μl)
- b) Směs byla zamíchána jemným poklepáním prstu na zkumavky a jemně centrifugována, aby byl obsah navrácen na dno zkumavky.
- c) Vzorek byl uložen na led.
- d) Byl připraven Ligation Master Mix podle tabulky 7.

Tabulka 7: Příprava Ligation Master Mixu.

Reagencie	Množství na N-plex (μl)
Ligation Mix	N x 10,0 x 1,10
Ligation Additive	N x 0,33 x 1,10
Ligation Enhancer	N x 0,33 x 1,10

V mixu se počítá s 10 % navíc, kvůli chybám v pipetování.

- e) Bylo smícháno 10,7 μl Ligation Master mix s 21,9 μl vzorku z předchozího kroku (následný celkový objem směsi je 32,6 μl)
- f) Směs byla zamíchána jemným poklepáním prstu na zkumavky a jemně centrifugována, aby byl obsah navrácen na dno zkumavky.
- g) Vzorek byl inkubován 60 minut při 20 °C.
- h) Následně byl vzorek inkubován 10 minut při 65 °C

10) Poolování vzorků

- a) Byla změřena koncentraci DNA na přístroji Qubit® Fluorometer (viz kapitola 4.2.3.1. Qubit)
- b) Pomocí programu Microbial Multiplexing Calculator bylo spočítáno množství jednotlivých vzorků do poolu a v tomto poměru byly smíchány na celkový objem 100 μl.

11) Čistění připravené knihovny pomocí AMPure® PB Beads

- a) Ke vzorku byl přidán 0,45násobek objemu AMPure PB kuliček.
- b) Směs byla zamíchána jemným poklepáním prstu na zkumavky a jemně centrifugována, aby byl obsah navrácen na dno zkumavky.
- c) Vzorek byl inkubován na stole 5 minut při pokojové teplotě.
- d) Následně byl vzorek krátce centrifugován, aby se veškerý objem zkumavky vrátil na dno.
- e) Zkumavky byly umístěny do magnetického stojánku.
- f) Když se supernatant vyčeřil, byl odsán a přenesen do jiné zkumavky, pro případ kontroly. Nesmějí být narušeny kuličky.
- g) Vzorek byl promyt čerstvě připraveným 80% etanolem.

- Zkumavky byly ponechány v magnetickém stojánku a naplněny zkumavku do plna 80% etanolem. Dali jsme si pozor, abychom nenarušili kuličky.
- Po 30 s byl etanol opatrně odsán pipetou.
- h) Předchozí krok byl opakován.
- i) Zbytkový etanol byl odstraněn.
- Zkumavky byly sundány z magnetického stojánku a krátce centrifugován.
- Zkumavky byly vráceny na magnetický stojánek
- Zbytkový etanol byl odsán.
- j) Pokud ve zkumavce zůstaly kapičky etanolu, předchozí krok byl opakován.
- k) Následně byl vzorek eluován 20 μ l elučního pufru.
- Směs byla zamíchána jemným poklepáním prstu na zkumavky a jemně centrifugována, aby byl obsah navrácen na dno zkumavky.
- Eluovanou DNA byla inkubována 15 minut při 37 °C
- Zkumavka byla krátce centrifugována a umístěna zpět na magnetický stojánek, kde se kuličky separovaly, dokud se supernatant nevyčeřil.
- Supernatant obsahující připravenou DNA byl odsán do nové 1,5 ml DNA Lo-Bind zkumavky.
- Zkumavky s kuličkami byly vyhozeny.

12) Kvantifikace a kvalifikace finální poolované SMRTbell knihovny

- a) Byl smíchán 1 μ l finální poolované SMRTbell knihovny s 9 μ l elučního pufru. Dva μ l takto naředěného vzorku byly použity ke změření koncentrace na Qubit® fluorometru s použitím Qubit® HS DNA reagensí. (viz kapitola 4.2.3.1. Qubit)
- b) DNA byla také změřena na Agilent 2200 Tape Station s využitím Agilent High Sensitivity D5000 reagensí, ke zjištění kvality DNA a velikosti výsledných fragmentů. (viz kapitola 4.2.3.2. Agilent)

13) Příprava knihoven na spouštění analýzy

Dále bylo pokračováno dle instrukcí software SMRT Link (v7.0.1), který individuálně na základě naměřených koncentrací a velikostí fragmentů upravuje množství dalších přidávaných reagensí.

14) Posledním krokem bylo spuštění analýzy na přístroji Sequel (Pacific Biosciences, USA)

4.2.5 Sekvenace izolátů MiSeq (Illumina)

1) Princip

U tohoto typu sekvenace je DNA rozštěpena na menší fragmenty, na které jsou připojeny adaptéry. Díky těmto adaptérům se DNA váže kovalentní vazbou na povrch sklíčka, na němž jsou oligonukleotidy komplementární s adaptéry. Následně probíhá amplifikace a ohnutí DNA a vytvoření tzv. můstků, tvořených dsDNA. Poté dochází k denuraci a narovnání můstků. Takto probíhá několik cyklů. Namnožené fragmenty se shlukují a tvoří klastry. Po tomto kroku následuje vlastní sekvenování za pomoci primerů a fluorescenčně značených nukleotidů. Postupně se do řetězce začleňují značené nukleotidy, které emitují záření. Toto záření je detekováno (www.illumina.com).

2) Tagmentace vstupní genomické DNA (gDNA)

Během tohoto kroku pomocí Nextera XT transpozomu docházelo zároveň k fragmentaci vstupní DNA a přidání adaptérové sekvence na její konce, což umožní PCR amplifikaci v dalším kroku.

a) Příprava potřebných reagensů

- Reagencie ATM (Amplicon Tagment Mix), TD (Tagment DNA pufr) a vstupní gDNA byly vyndány z mrazáku a rozmrazeny na ledu.
- Vizuálně byl zkontrolován NT pufr (Neutralize Tagment Buffer), zda neobsahuje precipitáty. Pokud ano, byl vortexován dokud se všechny částice nerozpustily.
- Po rozmražení byly reagencie zamíchány, tím že byly 3 - 5x jemně obráceny a poté rychle centrifugovány na mikrocentrifuze.

b) Postup

- Nová 96jamková destička byla označena. Do každé jamky (dle počtu vzorků) bylo napipetováno 10 μ l TD pufru.
- Do každé jamky bylo přidáno 5 μ l vstupní gDNA o koncentraci 0,2 ng/ μ l (celková vstupní koncentrace je 1 ng).
- Pomocí multikanálové pipety byly vzorky promíchány. (10x nahoru a dolů)
- Poté bylo do každé jamky přidáno 5 μ l ATM pufru.
- Pomocí multikanálové pipety byly vzorky promíchány. (10x nahoru a dolů)
- Destička byla uzavřena pomocí adhezivní fólie.

- Destička byla centrifugována 1 minutu při $280 \times g$, při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Destička byla umístěna do cycleru, kde byl puštěn program na $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut a následně byl vzorek zchlazen na teplotu $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Jakmile vzorky dosáhly teploty $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, bylo pokračováno okamžitě v dalším kroku, dokud byl transpozom stále aktivní.
- Destička byla opatrně otevřena a do každé jamky bylo přidáno $5\text{ }\mu\text{l}$ NT pufru.
- Pomocí multikanálové pipety byly vzorky promíchány. (10x nahoru a dolů)
- Destička byla uzavřena adhezivní fólií a centrifugována 1 minutu při $280 \times g$, při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Následně byl vzorek inkubován při pokojové teplotě po dobu 5 minut.

3) PCR amplifikace

V tomto kroku značená a fragmentovaná DNA je byla amplifikována pomocí PCR. Během PCR byl také přidán index 1(i7) a index 2 (i5) a sekvence potřebné pro vytvoření clusterů. Bylo důležité použít plné množství vstupní DNA, které je doporučené a nepřidávat navíc PCR cykly, aby byla zajištěna vysoká kvalita sekvenačních výsledků.

a) Příprava potřebných reagensů

- Byly vyndány NPM mix (Nextera PCR Master mix) a index primery (i5 a i7) z mrazáku a nechány rozmrazit při pokojové teplotě.
- Po rozmražení byly reagensie promíchány, tím že byly 3 - 5x jemně obráceny a poté rychle centrifugovány na mikrocentrifuze

b) Postup

- Do každé jamky bylo přidáno $15\text{ }\mu\text{l}$ NPM mixu (Nextera PCR Master mix).
- Pomocí multikanálové pipety byly vzorky promíchány (10x nahoru a dolů).
- Do každé jamky byla přidána originální kombinaci indexů i5 a i7, vždy po $5\text{ }\mu\text{l}$ od každého.
- Pomocí multikanálové pipety byly vzorky promíchány (10x nahoru a dolů).
- Destička byla překryta adhezivní fólií a centrifugována 1 minutu při $280 \times g$ při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Následně byla spuštěna PCR reakce s těmito parametry:

72 °C po dobu 3 minut

95 °C po dobu 30 sekund

12 cyklů: 95 °C po dobu 10 sekund

55 °C po dobu 30 sekund

72 °C po dobu 30 sekund

72 °C po dobu 5 minut

Chlazení na 4 °C

4) Čistění knihoven po PCR reakci

V tomto kroku byly použity AMPure XP kuličky k vyčištění DNA knihoven, což umožňuje výběr úseků DNA podle velikosti, čímž se odstraní krátké fragmenty DNA.

a) Příprava potřebných reagensů

- AMPure XP kuličky byla vytemperována na pokojovou teplotu.
- Byl připraven 80% etanol naředěním z absolutního etanolu molekulární čistoty. Etanol musí být vždy připraven čerstvě.
- Resuspenzní pufř RSB byl rozmražen.

b) Postup

- Destička byla centrifugována 1 minutu při $280 \times g$ při teplotě 20 °C
- Nová destička byla označena a pomocí multikanálové pipety do ní bylo přeneseno 50 μ l od každého PCR produktu.
- AMPure XP kuličky byly vortexovány 30 s, aby se roztok stal homogenním.
- Ke každému vzorku pomocí multikanálové pipety bylo přidáno 30 μ l AMPure XP kuliček.
- Následně byly vzorky jemně promíchány 10x pipetou.
- Destička byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 minut bez třepání.
- Destička byla umístěna na magnetický stojánek na 2 minuty, dokud se supernatant nevyčehil.
- Pomocí multikanálové pipety byl odsán supernatant, který byl schován pro případ kontroly. Destička zůstala stále na magnetickém stojánku.
- Destička na magnetickém stojánku byla promyta čerstvě připraveným 80% etanolem. Pomocí multikanálové pipety bylo do každé jamky přidáno 200 μ l 80%

etanolu. Následně byly vzorky inkubovány při pokojové teplotě po dobu 30 s a poté opatrně odsán supernatant. Tento krok byl zopakován.

- Zbytkový etanol byl odstraněn pomocí špiček s malým objemem (10 μ l).
- Destička zůstala stále na magnetickém stojánku. Kuličky se sušily po dobu 15 minut.
- Destička byla sundána z magnetického stojánku a do každé jamky bylo přidáno 52,5 μ l RSB pufu.
- Vzorky byly 10x jemně promíchány pomocí pipety.
- Destička byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 2 minut
- Destičku byla umístěna do magnetického stojánku po dobu 2 minut, dokud se supernatant nevyčeřil.
- Pomocí multikanálové pipety bylo opatrně přesunuto 50 μ l supernatantu z původní destičky do nové označené destičky.

5) Kontrola kvality knihovny

Bylo možné zkontrolovat velikost fragmentů DNA pomocí Agilent Technology 2100 Bioanalyzer s High Sensitivity chipem (viz kapitola 4.2.3.2 Agilent). Množství malých fragmentů pod 100bp by mělo být maximálně 10 %. Pokud bylo toto množství větší, bylo možné DNA znovu přechistit pomocí AMPure XP kuliček. Následně byla změřena koncentraci DNA pomocí Qubit® fluorometru (viz kapitola 4.2.3.1 Qubit)

6) Smíchání knihoven

a) Příprava potřebných reagensů

- Z mrazáku byla vyndána MiSeq reagent cartridge a nechána rozmraznout ve studené vodě.
- HS D5000 ScenTape a Qubit DNA kit byl vytemperován na pokojovou teplotu.

b) Postup

- Jednotlivé vzorky byly naředěny na potřebnou koncentraci 5 ng/ μ l o výsledném objemu 10 μ l.
- Výsledná koncentrace byla zkontrolována pomocí Qubit® fluorometru (viz kapitola 4.2.3.1 Qubit). Následně byla také u všech vzorků zkontrolována velikost fragmentů pomocí přístroje Agilent (viz kapitola 4.2.3.2 Agilent).

- Do jedné zkumavky byly všechny vzorky smíchány po 5 µl od každého. Následně byly jemně promíchány, aby nedošlo k polámání gDNA a krátce centrifugovány.
- Opět byla změřena koncentrace a velikost fragmentů metodou Qubit (viz kapitola 4.2.3.1 Qubit) a Agilent (viz kapitola 4.2.3.2 Agilent).
- Na základě výsledné koncentrace mixu a průměrné velikosti fragmentů byla vypočítána aktuální molární koncentraci směsi dle vzorce:

$$c[\text{nM}] = \frac{\text{koncentrace} [\text{ng}/\mu\text{l}]}{660 \text{ Da} \cdot \bar{x} \text{ délka fragmentů}} \cdot 10^6$$

- Po výpočtu molární koncentrace byla směs naředěna na 4 nM.

7) Denaturace a diluce DNA

a) Příprava potřebných reagensů

- Nejdříve si byl připraven čerstvý 1M NaOH (2 g NaOH v 50 ml destilované vody)
- Následně byl připraven 1 ml 0,2 M NaOH naředěním 200 µl 1M NaOH do 800 µl destilované vody.
- Byl rozmražen HT1 pufr (Hybridization Buffer)

b) Denaturace DNA

- Bylo smícháno 5 µl 4nM vzorku DNA a 5 µl čerstvě připraveného 0,2M NaOH
- Vzorky byly lehce vortexovány a centrifugovány 1 minutu při 280 × g.
- Vzorky byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě, aby došlo k denuraci dsDNA na jednovláknovou
- Bylo smícháno 10 µl denaturované DNA s 990 ul nachlazeného HT1. Výsledkem byl 20 pM denaturovaná knihovna v 1mM NaOH
- Denaturovaná DNA byla umístěna na led, dokud nebyla provedena finální diluce.

c) Diluce denaturované DNA

- Denaturovaná DNA byla zředěna smícháním 240 µl 20 pM denaturované DNA s 360 µl předchlazeného HT1. Výsledná koncentrace byla 8pM.
- Zkumavka byla několikrát obrácen, aby se obsah promíchal a krátce centrifugována.
- Denaturovaná a zředěná DNA byla umístěna na led, dokud nebyl vzorek vložen do cartridge pro přístroj MiSeq

8) Spuštění sekvenační analýzy na přístroji MiSeq (Illumina, USA)

4.2.6 Bioinformatické zpracování výsledků

Základní výsledky z celogenomové sekvenace byly zpracovány Mgr. Matejem Medveckým, Ph.D., jejichž výsledkem bylo klastrování jednotlivých kmenů dle příbuznosti a seznam genů v genomu kmenů DSM7030 (ERIC I) a DSM25430 (ERIC II) a porovnání jejich kopií v jednotlivých genomech.

Následně byly veškeré geny vyhodnocovány, zda se jedná o geny, které by se mohly potenciálně podílet na virulenci pomocí databáze UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

4.2.7 Testování IS256 sekvence

Ve výsledcích celogenomové sekvenace byla zjištěna sekvence IS256 ve velkém množství repetit. Tato sekvence má velkou část úseku specifickou pro *P. larvae*, jak bylo ověřeno z databáze BLAST, a proto by mohla být využita k rychlé diagnostice moru včelího plodu z měli.

4.2.7.1 Vyhledání úseků IS256 vhodných k vytvoření oligonukleotidů

Nejdříve byly pomocí programu BLAST vyhledány úseky IS256, které jsou specifické pro *P. larvae* a u jiných bakterií se tato část inzerční sekvence nevyskytuje. (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

4.2.7.2 Navržení oligonukleotidů

Následně byly z těchto úseků inzerční sekvence IS256 navrženy oligonukleotidy pomocí programu PrimerBLAST. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)

4.2.7.3 Kultivace kmenů

Kultivace kmenů byla provedena stejně jako v kapitole 4.2.1. Kultivace kmenů

4.2.7.4 Izolace DNA

1) Izolace DNA z čistých kultur

Izolace DNA z čistých kultur *P. larvae* byla provedena centrifugací.

- a) Ve 100 μ l sterilní vody byla resuspendována jedna plná klička bakteriální kultury.
- b) Zkumavka byla centrifugována po dobu 5 minut při 11 000 \times g.
- c) Do nové sterilní 1,5 ml zkumavky bylo přepipetováno 60 μ l supernatantu, ve kterém se nacházela DNA.

4.2.7.5 End-point PCR

1) Míchání reakce

Směs pro PCR byla namíchána podle tabulky 8.

Tabulka 8: Master mix pro End-Point PCR reakci.

Reagencie	Množství na 1 reakci (μl)
VWR Red Taq 2X Master Mix	12,5
Primer FW	0,5
Primer RV	0,5
dH ₂ O	10,5
DNA	1

2) Program

PCR reakce probíhala na cycleru Veriti™ 96-Well Thermal Cycler podle programu v tabulce 9.

Tabulka 9: Program pro End-point PCR reakci.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (minuty)	Opakování
Denaturace	95,0	3	-
Denaturace	95,0	0,5	35x
Annealing	60,0	0,5	
Elongace	72,0	1	
Finální elongace	72,0	10	-

3) Gelová elektroforéza

Elektroforéza probíhá 45 minut v 1,4% agaróze, při elektrickém napětí 100 V a elektrickém proudu 65 mA. Agaróza je připravená smícháním 1,3 g Bio-Rad Certified™ Molecular Biology Agarose s 90 ml TBE pufru a následným rozvařením 2 minuty v mikrovlnné troubě. Poté gel zchladíme a přidáme 20 μl ethidium bromidu (10 mg/ml). Do gelu bylo použito 5 μl produktu.

4.2.7.6 Sangerova sekvenace produktů PCR

1) Princip

Sangerova sekvenace patří mezi klasické sekvenační metody fungující na základě inkorporace značených dideoxynukleotidů pomocí DNA polymerázy během replikace. Probíhá po PCR reakci, ve které si naamplifikujeme určenou sekvenci. K této sekvenci se následně přidají dNTP a ddNTP. Pokud se do místa naváže komplementární dNTP syntéza vlákna pokračuje dál. Pokud se ale naváže komplementární ddNTP, syntéza se ukončí. Po ukončení sekvenační reakce získáme mix různě dlouhých úseků DNA ukončených ddNTP (Sanger et al., 1977). Následně probíhá sekvenační analýza pomocí gelové či kapilární elektroforézy. U kapilární elektroforézy je každý z ddNTP značený jinou fluorescenční barvou, na základě toho můžeme od sebe jednotlivé ddNTP odlišit (www.thermofisher.com).

2) Čištění PCR produktů pomocí kuliček

Před namícháním sekvenační reakce byla potřeba vyčistit PCR produkty od komponent PCR směsi. K čištění byly použity AMPure® XP kuličky.

- a) Produkty PCR (20 µl) byly smíchány s 36 µl AMPure® XP kuliček a promíchány 10x pipetou.
- b) Vzorky byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě.
- c) Zkumavky byly umístěny na magnet DynaMag™-96 Side a nechaly se stát 2 minuty nebo dokud je supernatant nevyčeříl.
- d) Supernatant byl odsán.
- e) Následně byly kuličky vyčištěny přidáním 200 µl předem namraženého 70% etanolu. Vzorky byly inkubovány 30 s.
- f) Etanol byl odsán pomocí pipety.
- g) Kroky e-f byly zopakovány.
- h) Zkumavky byly nechány otevřené a kuličky byly sušeny při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
- i) Bylo přidáno 40 µl sterilní vody a směs byla 10x promíchána pipetou.
- j) Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 5 minut.
- k) Zkumavky byly umístěny na magnet DynaMag™-96 Side a nechaly se stát 2 minuty nebo dokud je supernatant nevyčeří.
- l) Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky.

3) Míchání reakce

Sekvenační reakce probíhá pro každý z primerů zvlášť (FW nebo RV). Směs pro sekvenační reakci byla namíchána podle tabulky 10.

Tabulka 10: Příprava Master mixu pro sekvenační reakci.

Reagencie	Množství na 1 reakci (μl)
BigDye® Terminator 5X Sequencing Buffer	1
BigDye® Terminator Cycle Sequencing RR-100	2
Primer (FW nebo RV)	1
Produkty PCR	6

4) Program

Sekvenační reakce probíhala v cycleru Veriti™ 96-Well Thermal Cycler podle programu v tabulce 11.

Tabulka 11: Program sekvenační reakce.

Fáze	Teplota (°C)	Čas	Opakování
Denaturace	96,0	60 s	-
Denaturace	96,0	10 s	50x
Annealing	50,0	5 s	
Elongace	60,0	4 minuty	

5) Čištění sekvenačních produktů kuličkami

Po proběhnutí sekvenační reakce je potřeba před vložením do sekvenátoru vyčistit produkty kuličkami. K čištění byly použity AMPure® XP kuličky.

- Produkty PCR (10 μl) byly smíchány s 18 μl AMPure® XP kuliček a promíchány 10x pipetou.
- Vzorky byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě.
- Zkumavky byly umístěny na magnet DynaMag™-96 Side a nechaly se stát 2 minuty nebo dokud je supernatant nevyčeril.
- Supernatant byl odsán.
- Následně byly kuličky vyčištěny přidáním 200 μl předem namraženého 70% etanolu. Vzorky byly inkubovány 30 s.
- Etanol byl odsán pomocí pipety.

- g) Kroky e-f byly zopakovány.
- h) Zkumavky byly nechány otevřené a kuličky byly sušeny při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
- i) Bylo přidáno 40 μ l sterilní vody a směs byla 10x promíchána pipetou.
- j) Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 5 minut.
- k) Zkumavky byly umístěny na magnet DynaMag™-96 Side a nechaly se stát 2 minuty nebo dokud je supernatant nevyčeří.
- l) Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky.

6) Pouštění do přístroje

Sekvenace probíhala na sekvenátoru 3500 Dx Series Genetic Analyzer CS2 (Applied Biosystems™).

4.2.7.7 Real-time PCR

1) Míchání reakce

Směs pro Real-time PCR byla namíchána podle tabulky 12.

Tabulka 12: Příprava mixu pro Real-time PCR reakci.

Reagencie	Množství na 1 reakci (μ l)
TaqMan® Multiplex Master Mix	10
Primer FW	0,5
Primer RV	0,5
Proba (3x ředěná)	0,5
dH ₂ O	6,5
DNA	2

2) Program

PCR reakce byla spuštěna na přístroji MIC qPCR cyclor (Bio Molecular Systems) podle tabulky 13 pro oligonukleotidy FR1 a podle tabulky 14 pro oligonukleotidy FR2.

a) Program pro oligonukleotidy FR1

Tabulka 13: Program pro Real-time PCR reakci oligonukleotidů FR1.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Opakování
Aktivace	95,0	20	-
Denaturace	95,0	3	35x
Annealing	60,0	90	

Během annealingu detekujeme signál v oblasti zeleného světla (520-565 nm).

b) Program pro oligonukleotidy FR2

Tabulka 14: Program pro Real-time PCR reakci promerů FR2.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Opakování
Aktivace	95,0	20	-
Denaturace	95,0	3	35x
Annealing	60,0	50	

Během annealingu detekuje signál v oblasti zeleného světla (520-565 nm).

5 Výsledky

V první části této kapitoly jsou uvedeny výsledky ze sekvenace na platformách Sequel (PacBio) a MiSeq (Illumina). V této části jsou uvedeny výsledky z epizootologického srovnání historických izolátů z České republiky se sbírkovými kmeny genotypů ERIC I-III. Dále jsou zde porovnány geny související s virulencí mezi genotypy ERIC I a II. Také jsou zde vyhledány geny rezistence k antibiotickým látkám, které jsou porovnány také mezi genotypy ERIC I a II.

V druhé části jsou uvedeny výsledky navržené rychlé screeningové metody k diagnostice moru včelího plodu pomocí qPCR na základě inzerční sekvence IS256. Tato sekvence byla objevena v rámci sekvenace kmenů *P. larvae* a byla vyhodnocena jako vhodná k možné screeningové diagnostice moru včelího plodu, vzhledem k velkému množství jejích kopií v genomu a specifitě pro *P. larvae*. Byly navrženy oligonukleotidy pro sekvenci IS256 a následně jsou zde uvedeny výsledky z testování těchto oligonukleotidů na vzorcích DNA z čisté kultury *P. larvae* sbírkových kmenů.

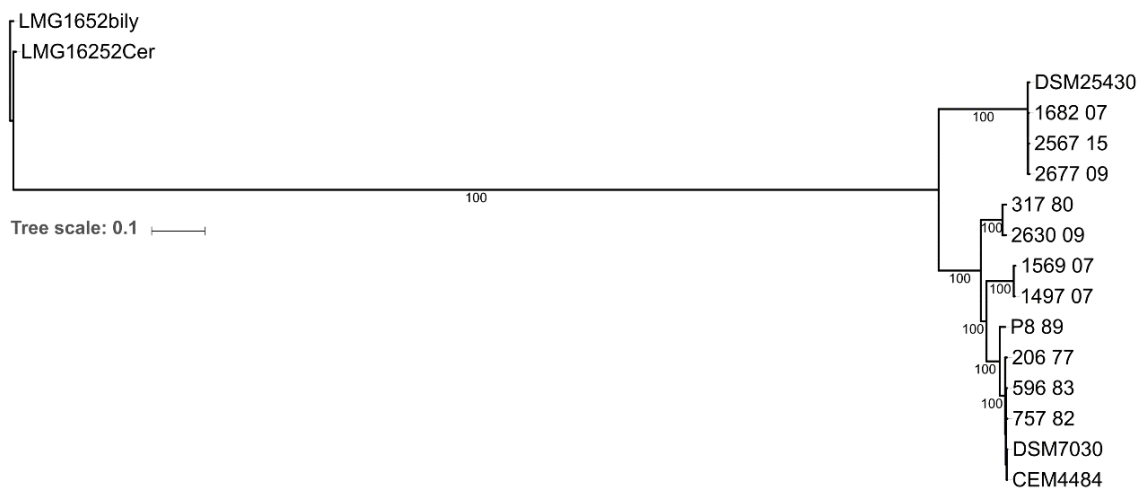
5.1 Výsledky celogenomové sekvenace

V této části práce jsou porovnány geny faktorů virulence a rezistence k antibiotikům mezi kmeny *P. larvae* DSM7030 (ERIC I) a DSM25430 (ERIC II). Také jsou zde uvedeny výsledky epizootologického srovnání jednotlivých kmenů *P. larvae*.

5.1.1 Epizootologické srovnání kmenů *P. larvae*

Na obrázku 7 jsou ilustrovány výsledky epizootologické studie historických izolátů z České republiky. Je vidět, že ke genotypu ERIC III zastoupeným sbírkovými kmeny LMG16252 neklastruje žádný z izolátů. Tedy v našem vzorku se nenachází žádný izolát, který by vykazoval příbuznost s genotypem ERIC III. Jako sbírkový kmen genotypu ERIC II byl použit kmen DSM25430. K tomuto kmeni vykazují příbuznost 3 historické izoláty a to 1682 07, 2567 15 a 2677 09. Jako sbírkové kmeny genotypu ERIC I byly použity kmeny DSM7030 a CCM4484. K těmto kmenům klastruje nejvíce historických izolátů a to 8. Je zde tedy patrné, že v rámci historických izolátů vykazuje příbuznost 73 % z nich ke genotypu ERIC I a 27 % z nich ke genotypu ERIC II.

Obrázek 7: Klastrování jednotlivých historických izolátů ke sbírkovým kmenům a jednotlivým ERIC genotypům.



5.1.2 Faktory virulence *P. larvae*

V tabulce 15 jsou shrnuty rozdíly ve virulenčních genech mezi kmeny DSM7030 (ERIC I) a DSM25430 (ERIC II). Je zde patrné, že se faktory virulence mezi kmeny liší. Například geny pro proteiny S-vrstvy, sloužící k nasednutí na epitel střeva včelí larvy, se vyskytují ve větším množství u kmene DSM25430, který patří do genotypu ERIC II. Proteiny S-vrstvy jsou majoritním faktorem virulence *P. larvae* genotypu ERIC II. Dále je zde vidět, že ve větším množství se v genomu kmene DSM7030 vyskytují toxiny Plx. Zato toxin C3larvin se v genomech obou kmenů vyskytuje ve stejném množství kopií. Geny pro proteázy narušující stěnu střeva včelí larvy, jako je chitináza P/CBP49, kolagenáza ColA, imunitní inhibitor A či hemolysin TlyA, se také v obou kmenech vyskytují ve stejném množství. Je zde tedy patrné, že rozdíly ve faktorech virulence těchto kmenů jsou především v proteinech S vrstvy, které se vyskytují u genotypu ERIC II, a v množství toxinů, kde se toxin Plx vyskytuje u genotypu ERIC I.

Tabulka 15: Porovnání genů pro faktory virulence kmenů DSM7030 (ERIC I) a DSM 25430 (ERIC II).

Gen	DSM7030	DSM25430	Význam
S-layer protein SplA	1	1	protein S vstvy
S-layer protein sap	1	0	protein S vstvy
Cell surface glycoprotein 2	0	1	protein S vstvy
C3larvin, chain A	1	1	součást C3larvin toxinu (A podjednotka)
C3larvin, chain B	1	1	součást C3larvin toxinu (B podjednotka)
Chitin-binding protein 49	1	1	chitináza P/CBP49
GlcNAc-binding protein A	1	1	Chitin-binding protein
Immune inhibitor A (EC 3.4.24.-)	1	1	metalloproteáza
Hemolysin TlyA	1	1	cytolysin tvořící póry
Putative serine protease HtrA	2	1	proteáza
Microbial collagenase ColA	1	1	metalloproteáza
Enolase	1	1	enoláza
Toxin Plx1	2	1	toxin Plx1
Toxin Plx2, chain A	3	2	toxin Plx2, podjednotka A
Toxin Plx2, chain B	2	0	toxin Plx2, podjednotka B
Putative peptidoglycan endopeptidase LytE	1	1	Cysteinová peptidáza

5.1.3 Sekundární metabolity

V tabulce 16 jsou sumarizovány rozdíly v sekundárních metabolitech mezi kmeny DSM7030 (ERIC I) a DSM25430 (ERIC II). Velká část z nich se vyskytuje u obou genotypů, avšak pár z nich je rozdílných. Nejvýznamnějšími sekundárními metabolity *P. larvae* jsou paenilarviny, bacillibactin a sevadicin, které se podílí na jeho virulenci. Všechny tyto sekundární metabolity byly nalezeny v genomu obou kmenů DSM7030 a DSM25430. Dále je v genomech přítomen i bacillolysin, který má metalloproteázovou aktivitu a vyskytuje se u zástupců třídy *Bacilli*. Bacillithiol patří také k významným sekundárním metabolitům, protože hraje významnou roli v rezistenci k fosfomycinu. Vyskytuje se také u zástupců třídy *Bacilli*. Bacillaene je polyenové antibiotikum, působící proti širokému spektru bakterií. Dále v genomech byla objevena lantibiotika. Jedná se o peptidová antibiotika řadící se mezi bakteriociny. V genomu se také nachází i další sekundární metabolity, jedná se hlavně o látky s antibiotickým účinkem či siderofory.

Tabulka 16: Porovnání genů pro sekundární metabolity kmenů DSM7030 (ERIC I) a DSM 25430 (ERIC II).

Gen	DSM7030	DSM25430	Význam
2-deoxystreptamine N-acetyl-D-glucosaminyltransferase	1	1	Syntéza neomycinu
2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	1	1	Syntéza enterobactinu
Enterobactin exporter EntS	1	0	Export enterobactinu
Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC	2	1	Import enterobactinu s navázaným železem
Iron-uptake system permease protein FeuB	1	1	import bacillibactinu nebo enterobactinu ABC transporšní systém
Iron-uptake system permease protein FeuC	1	1	import bacillibactinu nebo enterobactinu
Iron-uptake system-binding protein FeuA	1	1	import bacillibactinu nebo enterobactinu
2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	1	1	Syntéza bacillibactinu
Dimodular nonribosomal peptide synthase	1	1	syntéza bacillibactinu
Bacillibactin exporter	1	1	sekrece bacillibactinu
Ferri-bacillibactin esterase BesA	1	1	tvorba monomerů bacillibactinu
Bacillithiol biosynthesis deacetylase BshB1	1	1	syntéza bacillithiolu
Bacillithiol biosynthesis cysteine-adding enzyme BshC	1	1	syntéza bacillithiolu
N-acetyl-alpha-D-glucosaminyl L-malate synthase BshA	1	1	syntéza bacillithiolu

putative N-acetyl-alpha-D-glucosaminyl L-malate deacetylase 2	1	0	syntéza bacillithiolu
Nisin biosynthesis protein NisB	1	1	syntéza lantibiotika nisin
Nisin biosynthesis protein NisC	0	1	export nisinu
Alanine--anticapsin ligase	1	1	syntéza bacilysinu
Dihydroanticapsin 7-dehydrogenase	1	1	syntéza bacilysinu
Transaminase BacF	1	1	syntéza bacilysinu
SevA	2	1	Sevadicin, podjednotka A
SevB	5	4	Sevadicin, podjednotka B
Bacteriocin uberolysin	1	1	uberolysin
Polyketide biosynthesis cytochrome P450 PksS	1	1	tvorba ATB bacillaene
Polyketide biosynthesis malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase BaeC	1	1	tvorba ATB bacillaene
Polyketide synthase PksJ	1	1	tvorba ATB bacillaene
Bacillolysin	3	3	bacillolysin
Phospholipase YtpA	0	1	syntéza bacillolysinu
Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	1	1	Syntéza paenilarvinů
Putative non-ribosomal peptide ligase/polyketide synthase hybrid	1	1	Syntéza paenilarvinů
nonribosomal peptide ligase subunit	0	2	Syntéza paenilarvinů
Gramicidin S synthase like protein	3	2	Syntéza gramicidinu

5.1.4 Antibiotická rezistence

V tabulce 17 jsou shrnuty rozdíly v rezistencích mezi kmeny DSM7030 a DSM25430. V genomu *P. larvae* se nachází mnoho genů podílejících se na rezistenci vůči antibiotikům a antimikrobiálním peptidům. Jejich výskyt se u námi sledovaných kmenů DSM7030 (ERIC I) a DSM25430 (ERIC II) nijak významně neliší. Ukazuje se ale, že léčba antibiotiky u onemocnění moru včelího plodu opravdu není na místě, vzhledem k velkému množství rezistencí. Oba kmeny v genomu vykazují rezistenční geny vůči tetracyklinům, jedná se o effluxní pumpy. Tetracykliny se využívají v některých zemích k léčbě moru včelího plodu. Genom kmene DSM7030 navíc ale obsahuje přímo rezistenční gen ke chloramfenikolu, kmen DSM25430 nikoli. Makrolidy jsou také využívány v jiných státech k léčbě moru včelího plodu. Výsledky sekvenace kmenů DSM7030 a DSM25430 ukazují, že v genomu obou kmenů se vyskytují geny pro export makrolidů z buňky, čímž může být zapříčiněna rezistence *P. larvae* k těmto antibiotikům. Dále se v genomech obou kmenů vyskytují rezistenční geny k antimikrobiálním peptidům, glykopeptidovým antibiotikům, bacitracinu, daunorubicinu, doxorubicinu a dalším.

Tabulka 17: Porovnání genů antibiotické rezistence a rezistence vůči antimikrobiálním peptidům mezi kmeny DSM7030 (ERIC I) a DSM 25430 (ERIC II).

Gen	DSM7030	DSM25430	Význam
23S rRNA (uridine(2479)-2'-O)-methyltransferase	1	1	Rezistence k avilamycinu
ABC transporter ATP-binding/permease protein YojI	1	1	Rezistence k microcinu J25
Bicyclomycin resistance protein	1	1	Rezistence k bicyclomycinu
Bacitracin export ATP-binding protein BceA	1	1	Rezistence k bacitracinu
Bacitracin export permease protein BceB	3	2	Rezistence k bacitracinu
Putative undecaprenyl-diphosphatase YbjG	1	1	rezistence k bacitracinu
Undecaprenyl-diphosphatase	1	1	rezistence k bacitracinu
Undecaprenyl-diphosphatase BcrC	1	1	rezistence k bacitracinu
Daunorubicin/doxorubicin resistance ABC transporter permease protein DrrB	1	1	Rezistence k daunorubicinu a doxorubicinu
Daunorubicin/doxorubicin resistance ATP-binding protein DrrA	3	3	Rezistence k daunorubicinu a doxorubicinu
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	1	1	Rezistence k rifampicinu a dalším
Doxorubicin resistance ATP-binding protein DrrA	1	1	Rezistence k doxorubicinu

Fluoroquinolones export ATP-binding protein	1	1	Rezistence k fluorochinolonům
Fosmidomycin resistance protein	1	1	Rezistence k fosmidomycinu
Chloramphenicol acetyltransferase	1	0	rezistence k chloramfenikolu
Macrolide export ATP-binding/permease protein MacB	2	3	Rezistence k makrolidům
MATE family efflux transporter	1	1	Multidrug rezistence
Multidrug resistance protein 3	5	5	Rezistence k norfloxacinu, puromycinu a tosufloxacinu
Multidrug resistance protein EbrA	1	1	rezistence k ethidium bomidu, acriflavinu, pyroninu Y a safraninu O
Multidrug resistance protein EbrB	1	1	rezistence k ethidium bromidu, acriflavinu, pyroninu Y a safraninu O
Multidrug resistance protein MdtG	1	1	rezistence k fosfomycinu a deoxycholátu
Multidrug resistance protein MdtH	2	3	rezistence k norfloxacinu a enoxacinu
Multidrug resistance protein NorM	1	1	rezistence k norfloxacinu, ciprofloxacinu, kanamycinu a streptomycinu
Regulatory protein MsrR	1	1	Rezistence k oxacillinu a teicoplaninu, exprese faktorů virulence
Sensor histidine kinase GraS	1	1	rezistence k antimikrobiálním peptidům
Response regulator protein GraR	1	1	rezistence k antimikrobiálním peptidům
Phosphatidylglycerol lysyltransferase	1	2	rezistenční mechanismu proti cationic antimicrobial peptides(CAMP),
Ribosomal RNA large subunit methyltransferase Cfr	1	1	rezistence k ATB (phenicolů, lincosamidy, oxazolidinony, pleuromutiliny a streptogramin A
Tetracycline resistance MFS efflux pump	3	3	rezistence k tetracyklinům
Vancomycin B-type resistance protein VanW	1	1	rezistence k vankomycinu
D-alanine--(R)-lactate ligase VanF	2	1	rezistence ke glykopeptidovým ATB
Multidrug resistance protein YkkD	0	1	Multidrug rezistence
Sensor histidine kinase LiaS	4	3	odpověď na CAMP a ATB (bacitracin, nisin, ramoplanin a vankomycin)
Transcriptional regulatory protein LiaR	3	3	patří k LisA, dvoukomponentový systém, odpověď na CAMP a ATB

5.1.5 Další

V tabulce 18 jsou demonstrovány rozdíly mezi kmeny DSM7030 a DSM25430 v dalších genech, které by mohly mít potenciální vliv na virulenci. V genomu *P. larvae* kmenů DSM7030 a DSM25430 byly nalezeny geny zodpovídající za adhezi a tvorbu biofilmu. V genomu kmene DSM7030 byly také nalezeny geny pro endonukleázy CRISPR/Cas systému, které u kmene DSM25430 nalezeny nebyly. Dále se také oproti kmeni DSM25430 v genomu kmene DSM7030 vyskytují geny pro proteiny spojené s *quorum sensing* bakterií.

Tabulka 18: Porovnání dalších genů, které by mohly mít vliv na virulenci u kmenů DSM7030 (ERIC I) a DSM 25430 (ERIC II).

Gen	DSM7030	DSM25430	Význam
Conserved virulence factor B	1	1	exprese faktorů virulence, hemolysiny, DNázy, proteázy a protein A
Poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine N-deacetylase like protein	3	3	adheze, tvorba biofilmu
Phosphate-binding protein PstS 1 like protein	1	1	adheze, fagocytóza
Autotransporter adhesin EhaG like protein	1	1	adheze k epitelu
Response regulator ArlR like protein	1	1	adheze, virulence a rezistence, dvoukomponentový systém
Signal transduction histidine-protein kinase ArlS like protein	2	2	adheze, virulence a rezistence, dvoukomponentový systém
CRISPR-associated endonuclease Cas1	1	0	Prokaryotická imunita, ochrana před fagy, plazmidy, ...
CRISPR-associated endonuclease Cas2	1	0	Prokaryotická imunita, ochrana před fagy, plazmidy, ...
Acyl-homoserine lactone acylase QuiP	1	0	Quorum sensing

5.2 Validace metody pro screeningovou metodu PCR diagnostiky moru včelího plodu z měli

5.2.1 Navržené oligonukleotidy

Oligonukleotidy pro screeningovou metodu PCR diagnostiky moru včelího plodu z měli na základ inzerční sekvence IS256 byly navrženy pomocí programu PrimerBLAST. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

Navržené primery (FV, RW) byly navrženy tak, aby annealing při PCR odpovídal 60 °C. Dále byly navrženy hydrolyzační próby, kde byla na 5' konec navázána fluorescenční barva FAM a na 3' konec BHQ (Black Hole Quencher) ukončující replikaci.

5.2.1.1 Oligonuleotidy FR1

Oligonukleotidy FR1 pro úsek na sekvenci IS256 jsou navrženy v délce 417bp.

Tabulka 19: Navržené oligonukleotidy pro FR1 úsek sekvence IS256.

Název oligonukleotidů	Sekvence
P_larvae_IS256_F	5'-TCCACGTCCTTTTAGAGAGCTG-3'
P_larvae_IS256_R1	5'- GACGGGAAGTTCACGACAG-3'
P_larvae_IS256_probe1	[FAM]-CGGAAAGAGGCTGTCTGCCAGG- [BHQ]

5.2.1.2 Oligonukleotidy FR2

Oligonukleotidy FR2 pro úsek na sekvenci IS256 jsou navrženy v délce 215bp.

Tabulka 20: Navržené oligonukleotidy pro FR2 úsek sekvence IS256.

Název oligonukleotidů	Sekvence
P_larvae_IS256_F	5'-TCCACGTCCTTTTAGAGAGCTG-3'
P_larvae_IS256_R2	5'- ATAATCGAAGCCTGGCAGACA-3'
P_larvae_IS256_probe2	[FAM]-CCCAGCATCAGGCCAAGGACTTC-[BHQ]

5.2.2 Výsledky End-point PCR a Sangerovy sekvenace

End-point PCR a Sangerova sekvenace se prováděla u DNA izolované z čistých kultur pro kontrolu specifity oligonukleotidů.

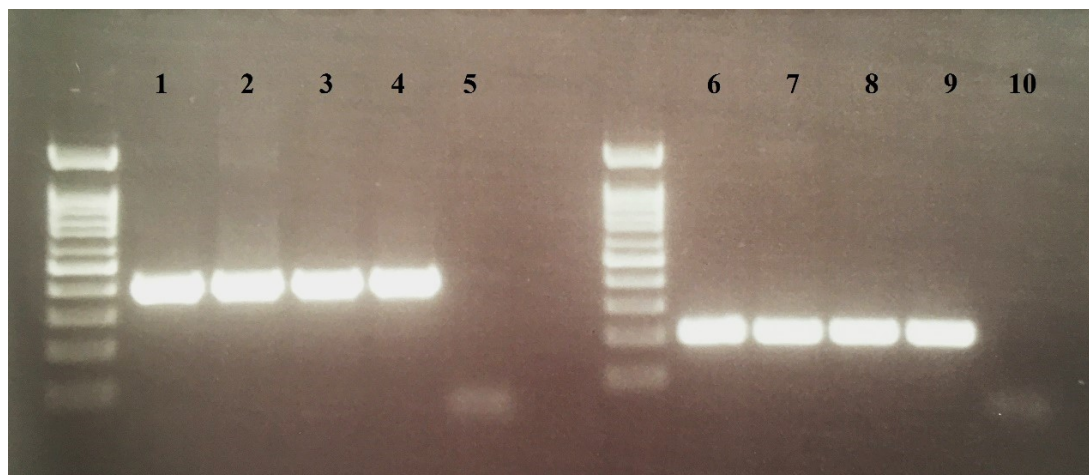
5.2.2.1 Výsledky End-point PCR oligonukleotidů FR1 a FR2

Na obrázku 8 je vidět výsledek End-point PCR části úseku IS256 ohraničené oligonukleotidy FR1 (1-5) a FR2 (6-10) po elektroforéze na agarózovém gelu. Oba úseky FR1 i FR2 se vyskytují v genomu u všech vybraných zástupců genotypů ERIC I-IV.

Obrázek 8: Výsledky End-point PCR oligonukleotidů FR1 a FR2 na agarózovém gelu.

Oligonukleotidy FR1: 1-DSM7030 ERIC I, 2-DSM25430 ERIC II, 3-LMG16252 ERIC III, 4-DSM 3615 ERIC IV, 5-negativní kontrola

Oligonukleotidy FR2: 6-DSM7030 ERIC I, 7-DSM25430 ERIC II, 8-LMG16252 ERIC III, 9-DSM 3615 ERIC IV, 10-negativní kontrola



5.2.2.2 Výsledky Sangerovy sekvenace oligonukleotidy FR1

Na základě Sangerovy sekvenace části úseku sekvenace IS256 ohraničené oligonukleotidy FR1 je patrné, že tato část sekvenace se vyskytuje pouze u *P. larvae* a *Paenibacillus* bakteriofágů (obrázek 9). Je zde také vidět, že na základě IS256 sekvenace nejsme schopni od sebe rozlišit jednotlivé ERIC genotypy. Tato sekvenace je u zástupců všech genotypů shodná.

Obrázek 9: Výsledky Sangerovy sekvenace úseků IS256 ohraničených oligonukleotidy FR1.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae DSM 25430 chromosome, complete genome	676	1.533e+05	98%	0.0	98.94%	CP019652.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae DSM 25430, complete genome	676	1.479e+05	98%	0.0	98.94%	CP003355.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae DSM 25430 plasmid unnamed1, complete sequence	671	3357	98%	0.0	98.94%	CP019653.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_IV plasmid unnamed2, complete sequence	671	671	97%	0.0	98.94%	CP019661.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_IV plasmid unnamed1, complete sequence	671	671	97%	0.0	98.94%	CP019660.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_III plasmid unnamed3, complete sequence	671	671	97%	0.0	98.94%	CP019658.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_III plasmid unnamed2, complete sequence	671	671	97%	0.0	98.94%	CP019657.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain SAG 10367, complete genome	671	4678	98%	0.0	98.94%	CP020557.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain CCM 38 plasmid pPLP1, complete sequence	671	671	97%	0.0	98.94%	CP020328.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain ATCC 13537 plasmid pPLP2, complete sequence	671	671	97%	0.0	98.94%	CP019796.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain ATCC 13537 plasmid pPLP1, complete sequence	671	671	97%	0.0	98.94%	CP019795.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus phage Diane, complete genome	671	671	97%	0.0	98.94%	KT361657.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus phage Vadim, complete genome	671	671	97%	0.0	98.94%	KT361656.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus phage Vegas, complete genome	671	671	97%	0.0	98.94%	KT361654.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_V chromosome, complete genome	671	5371	98%	0.0	98.68%	CP019717.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_IV chromosome, complete genome	671	16109	98%	0.0	98.68%	CP019659.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_III chromosome, complete genome	671	15437	98%	0.0	98.68%	CP019655.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain ERIC_I chromosome, complete genome	671	14764	98%	0.0	98.68%	CP019651.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus phage BN12, complete genome	671	671	98%	0.0	98.68%	MG727695.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain CCM 38 plasmid pPLP2.1, complete sequence	671	1342	98%	0.0	98.68%	CP020329.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain CCM 38, complete genome	671	16109	98%	0.0	98.68%	CP020327.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain ATCC 13537, complete genome	671	17452	98%	0.0	98.68%	CP019794.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain ATCC 9545 chromosome, complete genome	671	14762	98%	0.0	98.68%	CP019687.1

5.2.2.3 Výsledky Sangerovy sekvenace oligonukletidy FR2

Na obrázku 10 je možné vidět výsledek sekvenace úseku IS256 ohraničené oligonukleotidy FR2. Je zde patrné, že stejně jako u oligonukleotidů FR1 se tato sekvence nachází pouze u *P. larvae* a *Paenibacillus* fágů. Zároveň stejně jako u oligonukleotidů FR1 ani na základě této sekvenace nejsme od sebe schopni rozlišit jednotlivé ERIC genotypy.

Obrázek 10: Výsledky Sangerovy sekvenace úseků IS256 ohraničených oligonukletidy FR1.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_V chromosome, complete genome	318	2549	100%	5e-83	98.88%	CP019717.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae DSM 25430 plasmid unnamed1, complete sequence	318	1593	100%	5e-83	98.35%	CP019653.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae DSM 25430 chromosome, complete genome	318	72868	100%	5e-83	98.35%	CP019652.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_IV plasmid unnamed2, complete sequence	318	318	100%	5e-83	98.35%	CP019661.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_IV plasmid unnamed1, complete sequence	318	318	100%	5e-83	98.35%	CP019660.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_IV chromosome, complete genome	318	7649	100%	5e-83	98.88%	CP019659.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_III plasmid unnamed3, complete sequence	318	318	100%	5e-83	98.35%	CP019658.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_III plasmid unnamed2, complete sequence	318	318	100%	5e-83	98.35%	CP019657.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain Eric_III chromosome, complete genome	318	7331	100%	5e-83	98.88%	CP019655.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain ERIC_I chromosome, complete genome	318	7012	100%	5e-83	98.88%	CP019651.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus phage BN12, complete genome	318	318	98%	5e-83	98.88%	MG727695.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain SAG 10367, complete genome	318	2231	100%	5e-83	98.35%	CP020557.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain CCM 38 plasmid pPLP2.1, complete sequence	318	637	100%	5e-83	98.88%	CP020329.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain CCM 38 plasmid pPLP1, complete sequence	318	318	100%	5e-83	98.35%	CP020328.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain CCM 38, complete genome	318	7649	100%	5e-83	98.88%	CP020327.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain ATCC 13537 plasmid pPLP2, complete sequence	318	318	100%	5e-83	98.35%	CP019796.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain ATCC 13537 plasmid pPLP1, complete sequence	318	318	100%	5e-83	98.35%	CP019795.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens strain ATCC 13537, complete genome	318	8287	100%	5e-83	98.88%	CP019794.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain ATCC 9545 chromosome, complete genome	318	7012	100%	5e-83	98.88%	CP019687.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus phage Diane, complete genome	318	318	100%	5e-83	98.35%	KT361657.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus phage Vadim, complete genome	318	318	100%	5e-83	98.35%	KT361656.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus phage Vegas, complete genome	318	318	100%	5e-83	98.35%	KT361654.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenibacillus larvae subsp. larvae DSM 25430, complete genome	318	70324	100%	5e-83	98.35%	CP003355.1

5.2.3 Výsledky Real-time PCR z čistých kultur

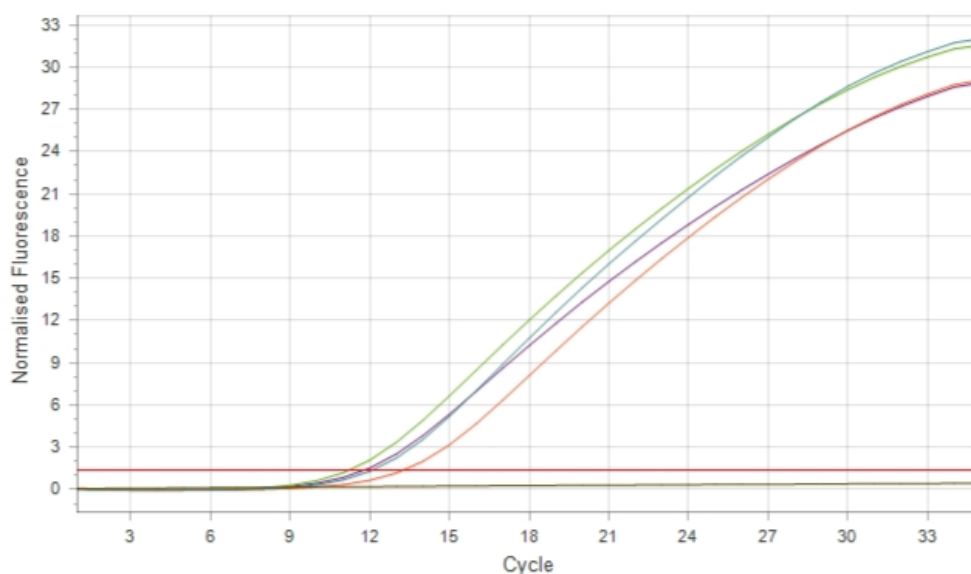
Screeningová metoda byla otestována na vzorcích z čisté kultury *P. larvae*. Byly vybrány sbírkové kmeny *P. larvae* všech ERIC genotypů. Dle výsledků níže lze soudit, že by tato metoda mohla být vhodná pro screening moru včelího plodu.

5.2.3.1 Oligonukleotidy FR1

Níže jsou přiloženy výsledky z Real-time PCR testování oligonukleotidů FR1 na přístroji MIC qPCR cycler (Bio Molecular Systems). Na obrázku a v tabulce je vidět, že vybraní zástupci všech ERIC genotypů *P. larvae* obsahují tento úsek sekvence IS256.

Obrázek 11: Výsledky Real-time PCR testování oligonukleotidů FR1.

Target	PELA FR1 → New Target
Normalisation	Dynamic
Exclusion	Extensive with fluorescence cutoff of 5%
Threshold	1,337 (Automatic) starting at cycle 1



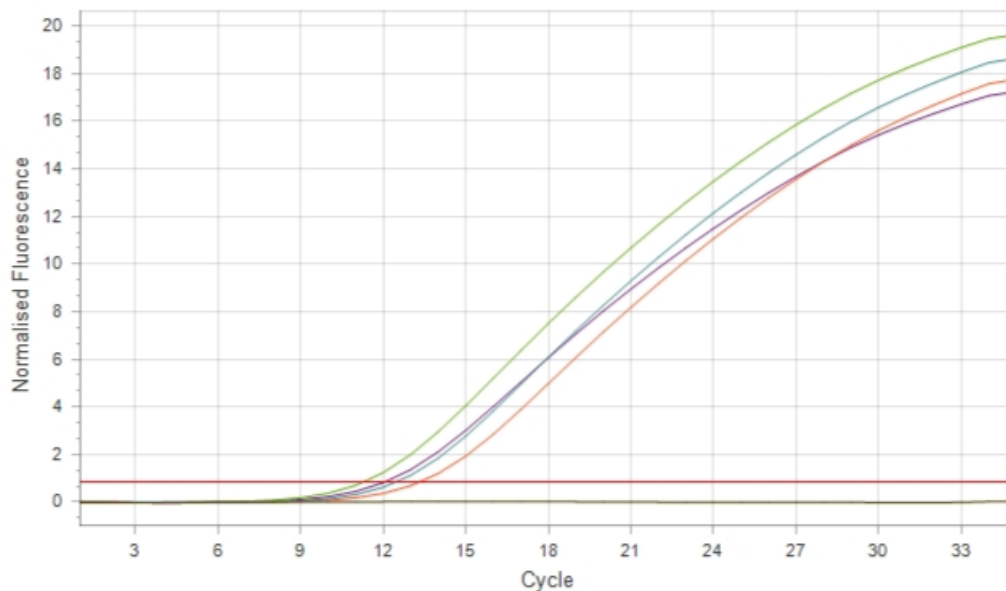
Well	Colour	Sample Name	Cq	Efficiency	Efficiency R ²	Result
1	■	DSM 7030 ERIC I	11,71	0,83	0,99822	
2	■	DSM 25430 ERIC II	11,16	0,88	0,99758	
3	■	LMG 16252 ERIC III	13,19	0,78	0,99890	
4	■	DSM 3615 ERIC IV	12,05	0,88	0,99749	
5	■	NK	-	-	-	Excluded

5.2.3.2 Oligonukleotidy FR2

Níže jsou přiloženy výsledky z Real-time PCR testování oligonukleotidů FR2 na přístroji MIC qPCR cycler (Bio Molecular Systems). Stejně jako u předchozí dvojice oligonukleotidů je na obrázku a v tabulce vidět, že vybraní zástupci všech ERIC genotypů *P. larvae* obsahují tento úsek sekvence IS256.

Obrázek 12: Výsledky Real-time PCR testování oligonukleotidů FR2.

Target	PELA → PELA IS256
Normalisation	Dynamic
Exclusion	Extensive with fluorescence cutoff of 5%
Threshold	0,839 (Automatic) starting at cycle 1



Well	Colour	Sample Name	Cq	Efficiency	Efficiency R ²	Result
1	■	DSM 7030 ERIC I	12,04	0,82	0,99712	
2	■	DSM 25430 ERIC II	11,25	0,87	0,99827	
3	■	LMG 16252 ERIC III	13,29	0,84	0,99827	
4	■	DSM 3615 ERIC IV	12,43	0,91	0,99764	
5	■	NK	-	-	-	Excluded

5.2.4 Výsledky Real-time PCR z ředící řady DNA

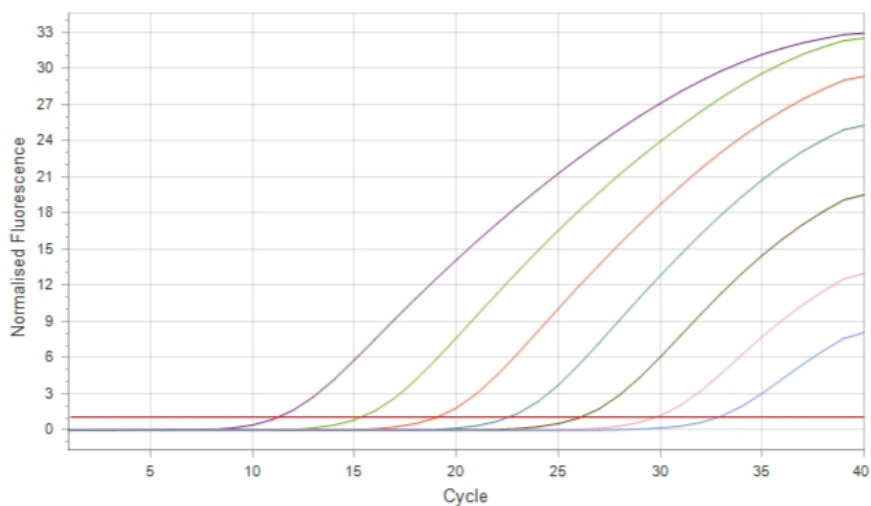
Po otestování metody na čistých bylo provedeno desítkové ředění DNA kmene DSM7030 (ERIC I). Vstupní koncentrace DNA byla 5,73 ng/μl, která byla následně zředěna až 1 000 000x. To znamená, že vzhledem k použitému množství DNA do PCR směsi 2 μl bylo u neředěného vzorku celkové množství DNA ve směsi 11,46 ng. U nejvíce zředěného vzorku byla vstupní koncentrace DNA 11,46 fg. Následně byla provedena Real-time PCR na přístroji MIC qPCR cyclor (Bio Molecular Systems).

5.2.4.1 Oligonukleotidy FR1

Níže jsou přiloženy výsledky z Real-time PCR testování oligonukleotidů FR1 na desítkové ředící řadě DNA kmene DSM7030 (ERIC I) na přístroji MIC qPCR cyclor (Bio Molecular Systems). Je zde patrné, že metoda je schopna zachytit přítomnost *P. larvae* již při velmi nízké koncentraci DNA.

Obrázek 13: Výsledky z Real-time PCR testování oligonukleotidů FR1 na desítkové ředící řadě DNA kmene DSM7030 (ERIC I).

Target	PELA FR1 → New Target
Normalisation	Dynamic
Exclusion	Extensive with fluorescence cutoff of 8%
Threshold	1,080 (Automatic) starting at cycle 1,1



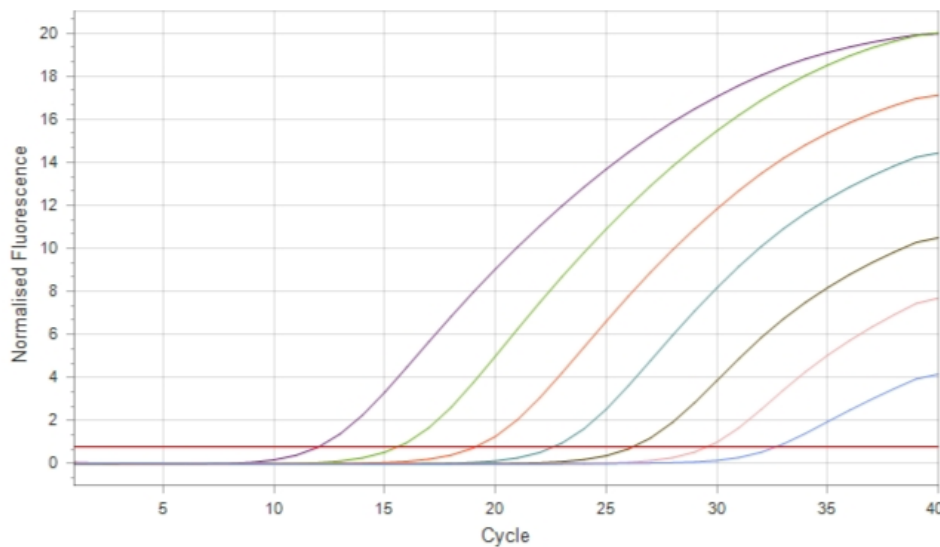
Well	Colour	Sample Name	Cq	Efficiency	Efficiency R ²	Result
1	■	ERIC I 1x	11,27	1,03	0,99704	
2	■	10x	15,33	1,00	0,99765	
3	■	100x	19,08	0,93	0,99795	
4	■	1000x	22,57	0,96	0,99832	
5	■	10000x	26,12	0,87	0,99859	
6	■	100000x	29,80	0,89	0,99856	
7	■	1000000x	32,88	0,84	0,99908	
8	■	NK	-	-	-	Excluded

5.2.4.2 Oligonukleotidy FR2

Níže jsou přiloženy výsledky z Real-time PCR testování oligonukleotidů FR2 na desítkové ředící řadě DNA kmene DSM7030 (ERIC I) na přístroji MIC qPCR cycler (Bio Molecular Systems). Je zde patrné, že i u těchto oligonukleotidů je možné zachytit přítomnost *P. larvae* již při velmi nízké koncentraci DNA.

Obrázek 14: Výsledky z Real-time PCR testování oligonukleotidů FR2 na desítkové ředící řadě DNA kmene DSM7030 (ERIC I).

Target	PELA → PELA IS256
Normalisation	Dynamic
Exclusion	Extensive with fluorescence cutoff of 5%
Threshold	0,765 (Automatic) starting at cycle 1



Well	Colour	Sample Name	Cq	Efficiency	Efficiency R ²	Result
1	■	ERIC I 1x	11,98	0,98	0,99685	
2	■	10x	15,51	0,89	0,99871	
3	■	100x	19,06	0,81	0,99917	
4	■	1000x	22,56	0,87	0,99910	
5	■	10000x	26,16	0,83	0,99903	
6	■	100000x	29,49	0,87	0,99932	
7	■	1000000x	32,60	0,76	0,99687	
8	■	nk	-	-	-	Excluded

6 Diskuze

V rámci této diplomové práce byla provedena epizootologická analýza příbuznosti 16 kmenů *P. larvae* pomocí celogenomové sekvenace. U dvou z těchto kmenů DSM7030 a DSM25430 byly analyzovány a vyhledávány geny, které se potenciálně mohou podílet na virulenci a jejich rozdílech mezi genotypy. Dále byla v genomu *P. larvae* nalezena inzerční sekvenace IS256 vyskytující se v genomu ve velkém množství kopií a která je, dle analýzy BLAST, pro *P. larvae* specifická. Proto byla tato sekvenace vyhodnocena jako vhodná pro screeningovou PCR diagnostiku moru včelího plodu. Byly navrženy oligonukleotidy, u kterých bylo provedeno testování na čistých kulturách sbírkových kmenů *P. larvae* všech ERIC genotypů.

První částí diplomové práce byla epizootologická analýza příbuznosti 16 kmenů *P. larvae*. Porovnány byly historické kmeny získané z Výzkumného ústavu včelařského, Dol se sbírkovými kmeny genotypů ERIC I (DSM7030, CEM4484), II (DSM25430) a III (LMG16252 bílý a červený fenotyp). ERIC III patří mezi již historické genotypy, které nejsou v současné době izolovány z klinických případů (Ebeling et al., 2016). Mezi 11 historickými kmeny z České republiky nevykazoval ani jeden z nich příbuznost ke kmeni LMG16252. Genotyp ERIC I patří k nejčastěji se vyskytujícím genotypům z klinických případů. Je izolován z klinických případů jak v Evropě, tak na americkém kontinentě (Ebeling et al., 2016). Dle výsledků ze sekvenace vykazuje příbuznost ke kmenům DSM7030 a CEM4484 8 historických izolátů (73 %). Genotyp ERIC II se vyskytuje především na evropském kontinentě, avšak v menším množství případů než genotyp ERIC I. Avšak jsou oblasti, kde je poměr mezi genotypy ERIC I a II totožný (Morrissey et al., 2015). Výsledky celogenomové sekvenace ukázaly, že příbuznost ke kmeni DSM25430 vykazují 3 historické izoláty (27 %). Tento vybraný vzorek historických kmenů ukazuje, že v České republice se vyskytují kmeny genotypu ERIC I i genotypu ERIC II, avšak výskyt kmenů genotypu ERIC I je na našem území častější.

Jednotlivé ERIC genotypy *P. larvae* se liší svou virulencí (Genersch et al., 2006). V této práci byly porovnávány geny, které se mohou podílet na virulenci, u genotypů ERIC I a II. Jako klíčový faktor virulence u obou genotypů je považována chitináza P/CBP49, která rozkládá chitinová vlákna v peritrofické matrix střeva včelí larvy (Garcia-Gonzalez et al., 2014c). V rámci našich výsledků se tato chitináza vyskytuje u obou kmenů ve stejném množství kopií v genomu. Dle proteomické studie T. Erbana

a kolektivu (2019) je ale tato chitináza nejvíce exprimována u genotypu ERIC II. V genomu obou kmenů DSM7030 a DSM25430 byl nalezen také GlcNAc-binding protein A, který patří také v proteinům vázajícím chitin. Tento protein může mít také potencionální vliv na virulenci, díky tomu, že je schopen štěpit chitin. Tento protein byl také potvrzen v proteomické studii, byl exprimován u všech ERIC genotypů kromě genotypu ERIC II (Erban et al., 2019).

Dalším významným faktorem virulence je toxin C3larvin, jedná se o AB toxin (Ebeling et al., 2019). Dle našich výsledků se podjednotka C3larvin A i C3larvin B vyskytuje v genomech obou kmenů ve stejném množství kopií. Avšak dle proteomické studie, není tento toxin v genotypěch ERIC I a II exprimován do vnějšího prostředí (Erban et al., 2019). Přesto, že je tento toxin považován za jeden ze základních faktorů virulence *P. larvae* a vyskytuje se v genomu všech ERIC genotypů, je exprimován pouze v genotypu ERIC IV. Z toho vyplývá, že tento faktor virulence pravděpodobně není esenciální, a i bez něj je *P. larvae* schopen proniknout skrz epitel střev včelí larvy.

Jako základní faktor virulence pro genotyp ERIC I jsou považovány Plx toxiny. Jedná se o 2 toxiny Plx1 a Plx2. Toxin Plx1 patří jednořetězcové AB toxiny. Toxin Plx2 patří také mezi AB toxiny. Podjednotka A vykazuje podobnost s ADP-ribosyltransferázou *Bacillus cereus*. Podjednotka B je podobná C2 binárnímu toxinu *Clostridium botulinum* (Fünfhaus et al., 2013). Právě tento toxin napomáhá zástupcům genotypu ERIC I proniknout skrz epitel střev (Poppinga, Genersch, 2015). V genomu DSM7030 se vyskytuje gen pro toxin Plx1 ve dvou kopiích, pro toxin Plx2A ve třech kopiích a pro toxin Plx2B ve dvou kopiích. I přesto, že je tento toxin typický pro genotyp ERIC I, vyskytuje se gen pro tyto toxiny i v genomu ERIC II. Toxin Plx1 se v genomu kmene DSM25430 vyskytuje v jedné kopii a toxin Plx2A ve dvou kopiích. Toxin Plx2B se v genomu DSM25430 nevyskytuje. Překvapivým zjištěním je, že toxiny Plx, které jsou považovány za jedny z nejdůležitějších faktorů virulence u genotypu ERIC I nejsou u tohoto genotypu exprimovány. Tyto toxiny nejsou exprimovány ani u genotypu ERIC II, avšak u toho by se tyto výsledky daly očekávat (Erban et al., 2019). Je patrné, že toxiny Plx se vyskytují v genomu obou genotypů ERIC I i II, avšak nejsou exprimovány do vnějšího prostředí. Zjištění, že Plx toxiny nejsou exprimovány u genotypu ERIC I však mění pohled na patogenezi tohoto genotypu.

Pro genotyp ERIC II je základním faktorem virulence protein S-vrstvy SplA, který napomáhá adhezi na epitel střev včelí larvy (Poppinga et al., 2012). Dle výsledků sekvenace se protein SplA vyskytuje v genomu kmene DSM25430 (ERIC II) i DSM7030 (ERIC I). Avšak u genotypu ERIC I byla již dříve identifikována bodová mutace způsobující předčasný vznik stop kodonu (Poppinga et al., 2012). Což se shoduje i s nejnovější proteomickou studií, kdy protein SplA byl exprimován pouze u genotypu ERIC II (Erban et al., 2019). V genomu obou osekvenovaných kmenů byly nalezeny i další proteiny S-vrstvy, které by také mohly mít vliv na adhezi k epitelu střeva včelí larvy a k agregaci a tím mohly mít také vliv na patogenezí a virulenci.

Cytolysin TlyA patří mezi toxiny způsobující degradaci buněčné membrány tvorbou pórů (Jevadi et al., 2016). Tento cytolysin může hrát důležitou roli v patogenezí *P. larvae*, díky tomu, že může hrát roli v rozkladu membrány buněk včelí larvy. Gen pro cytolysin TlyA se nachází v genomu obou kmenů DSM7030 i DSM25430.

Důležitou roli při patogenezí hrají proteázy. Nejčastěji se u *P. larvae* vyskytují metalloproteázy (Hrabák & Martínek, 2007). Jednou z metalloproteáz je imunitní inhibitor A (InhA), který se vyskytuje také u *Bacillus thuringiensis*. InhA inhibuje hydrolyzuje cecropiny v hemolymfě hmyzu a tím inhibuje imunitní odpověď (Lövgren et al., 1990). Je pravděpodobné, že InhA napomáhá přežití imunitní odpovědi včelí larvy (Djukic et al., 2014). Gen pro metalloproteázu InhA se vyskytuje v genomu obou kmenů DSM7030 a DSM25430 v jedné kopii. V proteomické studii bylo dokázáno, že InhA je exprimován u všech genotypů kromě genotypu ERIC I (Erban et al., 2019). V genu pro InhA u genotypu ERIC I je možné, že tento gen obsahuje nějakou mutaci, a proto metalloproteáza InhA nemůže být exprimována. Další metalloproteázou, pro níž byl nalezen gen v genomu DSM7030 i DSM25430 je mikrobiální kolagenáza ColA. Kolagenázy obecně degradují povrchové buněčné struktury a tím mohou hrát roli ve virulenci (Duarte et al., 2014). Kolagenáza ColA je dle proteomické studie exprimována ve všech ERIC genotypech kromě genotypu ERIC I (Erban et al., 2019). Stejně jako u InhA je možné, že u genotypu ERIC I, není exprimována z důvodu mutace genu pro ColA. Důležitou roli ve virulenci může mít i serinová proteáza HtrA, která je významným faktorem virulence u *Streptococcus pneumoniae* (De Stoppelaar et al., 2013). Gen pro tuto proteázu se vyskytuje u kmene DSM7030 ve dvou kopiích a u kmene DSM25430 v jedné kopii. Dle proteomické studie je HtrA exprimována ve všech genotypech, avšak v genotypu ERIC I v nejnižším

množství (Erban et al., 2019). Je zajímavé, že gen pro tuto proteázu je v genomu genotypu ERIC I DSM7030 v počtu dvou kopií, avšak je exprimována v nejnižším množství. I zde je pravděpodobné, že se v genu pro HtrA může vyskytovat mutace. Vliv na virulenci může mít i endopeptidáza LytE. Ta se vyskytuje v genomu DSM7030 i DSM25430 v jedné kopii. V proteomické studii bylo zjištěno, že LytE je exprimována u všech ERIC genotypů kromě genotypu ERIC II (Erban et al., 2019). Je možné, že u genu pro LytE v genotypu ERIC II je mutace znemožňující její expresi.

Enoláza byla dříve studována jako faktor virulence *P. larvae*, vzhledem ke svému toxickému a imunogennímu efektu na včelí larvu (Antúnez, Anido et al., 2011). Gen pro enolázu se nachází v genomu DSM7030 i DSM25430 v jedné kopii. Dle proteomické studie je enoláza exprimována u všech ERIC genotypů. U genotypu ERIC I to však bylo v největším množství (Erban et al., 2019). Enoláza může být pro genotyp ERIC I významným faktorem virulence, vzhledem k absenci některých jiných faktorů virulence vyskytujících se u ostatních ERIC genotypů.

Vliv na virulenci mají také sekundární metabolity. Jedná se především o siderofory a antifungální a antimikrobiální látky. Jedním z nich je bacillibactin. Jedná se o siderofor umožňující vychytávat železo. Železo je omezujícím faktorem pro patogenní bakterie, o který soutěží s hostitelem (Müller et al., 2015). Geny pro syntézu, import a export bacillibactinu se vyskytují u kmene DSM7030 i u kmene DSM25430. Dalším sideroforem je enterobactin. Jedná se o siderofor, který je strukturně i funkčně podobný bacillibactinu (Dertz et al., 2006). Geny pro syntézu, export a import jsou stejně jako u bacillibactinu přítomné u obou kmenů DSM7030 a DSM25430. Dalším z významných sekundárních metabolitů jsou paenilarviny, jedná se o iturin-like lipopeptidy (Müller et al., 2015). Ituriny mají silnou antifungální a hemolytickou aktivitu. (Sood et al., 2014) Paenilarviny mohou mít vliv v kompetičním boji ve střevě včelí larvy, kdy díky antifungální aktivitě paenilarvinů jsou eliminováni konkurenti. Paenilarviny mají také potenciální vliv na motilitu označovanou jako „swarming“, kde mohou hrát roli biosurfaktantů (Fünfhaus et al. 2018). Geny pro syntézu paenilarvinů se vyskytují v genomech kmene DSM7030 i DSM25430. Sevadicin je první geneticky, molekulárně a funkčně potvrzený nonribosomální peptid v genomu *P. larvae*. Tento peptid má slabou antibakteriální aktivitu a předpokládá se, že by mohl mít vliv na mezibuněčnou komunikaci (Garcia-Gonzales et al., 2014a). Obě podjednotky sevadycinu sevA i sevB se vyskytují v genomu obou z kmenů DSM7030 a DSM25430.

Dále byly v genomu *P. larvae* objeveny geny pro syntézu antibakteriálních látek. Jednou z nich je i dráha syntézy neomycinu. Jedná se o aminoglykosidové antibiotikum s účinkem na gramnegativní i grampozitivní bakterie (Sasseville, 2010). V genomu obou kmenů DSM7030 i DSM25430 se vyskytuje gen pro syntézu neomycinu. Dalším z antibiotických látek je gramicidin S, který patří mezi cyklopeptidová antibiotika s účinkem na grampozitivní i gramnegativní bakterie, zároveň má i slabou antifungální aktivitu (Conti et al., 1997). V genomu obou kmenů DSM7030 a DSM25430 se nachází gen podobný gramicidin S syntáze. Cluster podobný gramicidin S syntáze byl v genomu *P. larvae* nalezen již dříve. Gramicidin S narušuje buněčnou membránu mikroorganismů (Djukic et al., 2014). Dále se v genomu obou kmenů DSM7030 a DSM25430 nachází geny pro syntézu antibiotik vyskytujících se u kmene *Bacillus* jako jsou bacillithiol, bacilysin, bacillaene a bacillolysin. V genomu *P. larvae* obou kmenů DSM7030 a DSM25430 byly také nalezeny geny pro syntézu lantibiotik. Jedná se o peptidové antimikrobiální látky účinkující na grampozitivní bakterie (Djukic et al., 2014). Uberolysin je cyklický bakteriocin vyskytující se u *Streptococcus uberis* s antimikrobiálním účinkem (Wirawan et al., 2007). V genomu kmenů DSM7030 i DSM25430 byl nalezen gen pro uberolysin. Antimikrobiální látky poskytují bakteriím výhodu v prostředí v kompetičním boji proti ostatním bakteriím. U *P. larvae* ta výhoda spočívá ve zlikvidování konkurence ve střevech včelí larvy a snazším nasednutí na střevní epitel.

Proti působení antimikrobiálních látek se bakterie chrání mechanismy rezistence. Jinak tomu není ani u *P. larvae*. V genomu kmenů DSM7030 a DSM25430 byly nalezeny mechanismy rezistence vůči antibiotikům, využívaným k léčbě, ale také vůči antimikrobiálním peptidům produkovaným jinými druhy bakterií. Z klinického pohledu jsou nejvýznamnější rezistence k antibiotikům, která se stále využívají v některých zemích k léčbě moru včelího plodu (např. Ukrajina, Čína). Tetracykliny byly k léčbě moru včelího plodu používány několik desítek let. Poté si však *P. larvae* vytvořil mechanismy rezistence k těmto antibiotikům (Evans, 2003). I kmeny DSM7030 a DSM25430 ve svém genomu nesou geny pro rezistenci k tetracyklinům. Dalšími antibiotiky dříve používanými k léčbě jsou makrolidy. I pro tato antibiotika nesou v genomu kmeny DSM7030 a DSM25430 rezistenci. V genomu kmenů DSM7030 a DSM25430 se také nachází rezistence pro antibiotika běžně používaná v humánní a veterinární medicíně, jako jsou fluorochinolony, rifampin, chloramfenikol, avilamycin

a další. Zároveň se v genomech obou kmenů DSM7030 a DSM25430 nachází rezistence k daunorubicinu a doxorubicinu. Jedná se o látky, které se v humánní medicíně využívají jako chemoterapeutika k léčbě nádorových onemocnění (www.drugs.com). Jak bylo zmíněno výše, antibiotická léčba moru včelího plodu není doporučovaná a Evropskou unií i zakázaná. Antibiotika působí pouze na vegetativní stádia bakterie, nikoli však na spory, čímž je podporován vznik rezistencí. Zároveň mají antibiotika negativní vliv na mikrobiom včel a mohou se dostávat do včelích produktů (Titěra et al., 2009).

Jako další geny s potenciálním vlivem na virulenci se v genomech DSM7030 a DSM25430 vyskytují geny pro adhezi a tvorbu biofilmu a gen pro expresi faktorů virulence. Dále v genomu DSM7030 nachází gen pro CRISPR/Cas1 a CRISPR/Cas2 endonukleázy a gen pro acyl-homoserin lakton acyláza, podílející se na *quorum sensing* bakterií. Adheze hraje roli v patogenezi, díky dobré adhezi na epitel střeva včelí larvy může *P. larvae* snadněji skrz něj proniknout. Příkladem je i důležitý faktor virulence genotypu ERIC II protein SplA, o kterém jsem se již zmiňovala dříve. *Quorum sensing* je proces mezibuněčné komunikace mezi bakteriemi na základě produkci, detekci a reakci na extracelulární signalizační molekuly zvané autoinduktory. Ty se hromadí v prostředí a na základě jejich koncentrace bakterie vyhodnocují hustotu bakterií stejného druhu v okolí na jejímž základě mohou bakterie změnit genovou expresi. Jde o změnu genové exprese při sporulaci, bioluminiscenci, tvorbě antibiotik, tvorbě biofilmu, ale také tvorbě faktorů virulence (Rutherford, Bassler, 2012). U kmene DSM7030 byl nalezen gen pro acyl-homoserin lakton acylázu. Jedná se o látku podílející se na *quorum sensing*. Je možné, že se buňky *P. larvae* mezi sebou touto cestou komunikují, ale vše je potřeba ještě následně ověřit. Dále byly také v genomu kmene DSM7030 objeveny geny pro CRISPR-associated endonuclease Cas1 a CRISPR-associated endoribonuclease Cas2. Tyto systémy tvoří „imunitu“ prokaryotické buňky na bázi nukleových kyselin, zajišťující rezistenci bakterii vůči cizím genetickým elementům (fágy, plazmidy) (Wiedenheft et al., 2009).

Rychlá diagnostika onemocnění je základním faktorem pro boj s morem včelího plodu. Proto je důležitý i vývoj rychlých screeningových metod vhodných k detekci tohoto onemocnění. Dosavadní PCR diagnostika moru včelího plodu byla založena na základě genu pro 16S rRNA (de Graaf et al., 2006). V této práci byla navržena nová screeningová PCR metoda na základě genu pro inzerční sekvenci IS256. Na principu detekce inzerční sekvence probíhá i PCR diagnostika *Mycobacterium tuberculosis*. Jedná se o inzerční sekvenci IS1081. Tato metoda je vysoce senzitivní. Avšak je vždy je nutné výsledek porovnat s klinickým stavem pacienta (Niyaz Ahmed et al., 1998). IS256 sekvence se v genomu *P.larvae* vyskytuje ve velkém počtu kopií (u kmene DSM7030 84 kopií a u kmene DSM25430 229 kopií), díky tomu je tato metoda vysoce senzitivní. Zároveň sekvence navržených oligonukleotidů se vyskytuje pouze u *P. larvae*, díky čemuž je metoda specifická. V budoucnu však nelze vyloučit možný horizontální přenos tohoto mobilního elementu mezi jednotlivými druhy. Proto je třeba korelovat výsledek vyšetření s klinickými projevy ve včelstvu. To je však nutné i v případě kultivačního vyšetření, neboť jak bylo výše popsáno, existuje velká vnitrodruhová variabilita uvnitř *P. larvae*. Nelze tedy vyloučit výskyt nepatogenních kmenů. V průběhu letošního roku je v plánu provedení klinické validace na vzorcích měli (směsný odpad na dně úlu). Pokud bude tato validace úspěšná, bude navržena jako screeningové vyšetření. Oproti kultivačnímu vyšetření, které trvá minimálně 3 dny, by byly výsledky dostupné během několika hodin. Díky včasnému zjištění původce nákazy, by se dalo zamezit šíření onemocnění z ohniska.

7 Souhrn

- V rámci epizootologického srovnání historických izolátů *P. larvae* z České republiky se sbírkovými kmeny genotypů ERIC I-III bylo zjištěno, že 73 % historických izolátů vykazuje příbuznost s genotypem ERIC I a 27 % historických izolátů vykazuje příbuznost s genotypem ERIC II. Žádný z izolátů nevykazuje příbuznost s genotypem ERIC III.
- Bylo potvrzeno, že mezi genotypy ERIC I a II je významná genetická variabilita, co se týče faktorů virulence. V genomu genotypu ERIC I se vyskytovali geny pro toxin Plx2B, CRISP/cas systém či acyl-homoserin lakton acylázu, které se u genotypu ERIC II nevyskytovali. Zároveň ale u genotypu ERIC II jsou zastoupeny geny pro protein SplA a některé sekundární metabolity, které nejsou u genotypu ERIC I. Zároveň výskyt genů pro klíčové faktory virulence (P/CBP49, C3larvin toxin atd.) se vyskytovali u obou kmenů DSM7030 i DSM25430. Význam nalezených genů je třeba dále ověřit.
- Zároveň byly v genomu genotypů ERIC I a II nalezeny geny rezistence k tetracyklinovým a makrolidovým antibiotikům., které se v některých státech využívají k léčbě moru včelího plodu. Také byly objeveny rezistence k antimikrobiálním peptidům, což dává *P. larvae* výhodu v rámci kompetičního boje.
- V této práci byla také nalezena sekvence IS256, která se specifická pro *P. larvae*, a proto by mohla být vhodná ke screeningovému vyšetření moru včelího plodu z měli. Byly navrženy oligonukleotidy určené k této diagnostice a následně bylo provedeno jejich testování na sbírkových kmenech *P. larvae* všech ERIC genotypů, které dopadlo úspěšně. Následovat bude klinická validace na pozitivních i negativních vzorcích měli na mor včelího plodu.

8 Seznam použité literatury

Advance genomics with Single Molecule, Real-Time (SMRT) Sequencing. www.pacb.com. [online]. [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <https://www.pacb.com/smrt-science/smrt-sequencing/>

Alippi, A. M., Lopez, A. C., & Aguilar, O. M. (2002). *Differentiation of Paenibacillus larvae subsp. larvae, the Cause of American Foulbrood of Honeybees, by Using PCR and Restriction Fragment Analysis of Genes Encoding 16S rRNA*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3655–3660. doi:10.1128/aem.68.7.3655-3660.2002

Antúnez, K., Anido, M., Schlapp, G., Evans, J. D., & Zunino, P. (2009). *Characterization of secreted proteases of Paenibacillus larvae, potential virulence factors involved in honeybee larval infection*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 129–132. doi:10.1016/j.jip.2009.07.010

Antúnez, K., Anido, M., Arredondo, D., Evans, J. D., & Zunino, P. (2011). *Paenibacillus larvae enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection*. *Veterinary Microbiology*, 147(1-2), 83–89. doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.004

Antúnez, K., Arredondo, D., Anido, M., & Zunino, P. (2011). *Metalloprotease production by Paenibacillus larvae during the infection of honeybee larvae*. *Microbiology*, 157(5), 1474–1480. doi:10.1099/mic.0.044321-0

Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D. (1994). *Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3-4), 253–260. doi:10.1007/bf00873085

Beims, H., Bunk, B., Erler, S., Mohr, K. I., Spröer, C., Pradella, S., ... Steinert, M. (2020). *Discovery of Paenibacillus larvae ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood*. *International Journal of Medical Microbiology*, 151394. doi:10.1016/j.ijmm.2020.151394

Bogdanov, S. (2005). *Contaminants of bee products*. *Apidologie*, 37(1), 1–18. doi:10.1051/apido:2005043

Brady, T. S., Merrill, B. D., Hilton, J. A., Payne, A. M., Stephenson, M. B., & Hope, S. (2017). *Bacteriophages as an alternative to conventional antibiotic use for the prevention or treatment of Paenibacillus larvae in honeybee hives*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 150, 94–100. doi:10.1016/j.jip.2017.09.010

Conti, E.; Stachelhaus, T; Marahiel, MA; Brick, P (1997), "Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S", *The EMBO Journal*, 16 (14): 4174–4183, doi:10.1093/emboj/16.14.4174

Daunorubicin hydrochloride. *The American Society of Health-System Pharmacists*. www.drugs.com [online]. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/monograph/daunorubicin-hydrochloride.html>

Doxorubicin hydrochloride. *The American Society of Health-System Pharmacists*. www.drugs.com [online]. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/monograph/doxorubicin-hydrochloride.html>

De Graaf, D. C., Alippi, A. M., Brown, M., Evans, J. D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., ... Ritter, W. (2006). *Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols*. *Letters in Applied Microbiology*, 43(6), 583–590. doi:10.1111/j.1472-765x.2006.02057.x

De Graaf, D. C., Alippi, A. M., Antúnez, K., Aronstein, K. A., Budge, G., De Koker, D., ... Genersch, E. (2013). *Standard methods for American foulbrood research*. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–28. doi:10.3896/ibra.1.52.1.11

De Stoppelaar, S. F., Bootsma, H. J., Zomer, A., Roelofs, J. J. T. H., Hermans, P. W. M., van 't Veer, C., & van der Poll, T. (2013). *Streptococcus pneumoniae Serine Protease HtrA, but Not SFP or PrtA, Is a Major Virulence Factor in Pneumonia*. *PLoS ONE*, 8(11), e80062. doi:10.1371/journal.pone.0080062

Dertz, E. A., Xu, J., Stintzi, A., & Raymond, K. N. (2006). *Bacillibactin-Mediated Iron Transport in Bacillus subtilis, I*. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 22–23. doi:10.1021/ja055898c

Djukic, M., Brzuszkiewicz, E., Fünfhaus, A., Voss, J., Gollnow, K., Poppinga, L., ... Daniel, R. (2014). *How to Kill the Honey Bee Larva: Genomic Potential and Virulence Mechanisms of Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE*, 9(3), e90914. doi:10.1371/journal.pone.0090914

Duarte, A. S., Correia, A., & Esteves, A. C. (2014). *Bacterial collagenases – A review*. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(1), 106–126. doi:10.3109/1040841x.2014.904270

Ebeling, J., Knispel, H., Hertlein, G., Fünfhaus, A., & Genersch, E. (2016). *Biology of Paenibacillus larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17), 7387–7395. doi:10.1007/s00253-016-7716-0

Ebeling, J., Fünfhaus, A., Knispel, H., Krska, D., Ravulapalli, R., Heney, K. A., ... Genersch, E. (2017). *Characterization of the toxin Plx2A, a RhoA-targeting ADP-ribosyltransferase produced by the honey bee pathogen Paenibacillus larvae*. *Environmental Microbiology*, 19(12), 5100–5116. doi:10.1111/1462-2920.13989

Ebeling, J., Knispel, H., Fünfhaus, A., & Genersch, E. (2019). *The biological role of the enigmatic C3larvinAB toxin of the honey bee pathogenic bacterium Paenibacillus larvae*. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.14709

Erban, T., Zitek, J., Bodrinova, M., Talacko, P., Bartos, M., & Hrabak, J. (2019). *Comprehensive proteomic analysis of exoproteins expressed by ERIC I, II, III and IV Paenibacillus larvae genotypes reveals a wide range of virulence factors*. *Virulence*. doi:10.1080/21505594.2019.1603133

Evans, J. D. (2003). *Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(1), 46–50. doi:10.1016/s0022-2011(03)00039-9

- Fünfhaus, A., & Genersch, E. (2012). *Proteome analysis of Paenibacillus larvae reveals the existence of a putative S-layer protein. Environmental Microbiology Reports, 4(2), 194–202.* doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00320.x
- Fünfhaus, A., Poppinga, L., & Genersch, E. (2013). *Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood. Environmental Microbiology, n/a–n/a.* doi:10.1111/1462-2920.12229
- Fünfhaus, A., Ebeling, J., & Genersch, E. (2018a). *Bacterial pathogens of bees. Current Opinion in Insect Science, 26, 89–96.* doi:10.1016/j.cois.2018.02.008
- Fünfhaus, A., Göbel, J., Ebeling, J., Knispel, H., Garcia-Gonzalez, E., & Genersch, E. (2018b). *Swarming motility and biofilm formation of Paenibacillus larvae, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees (Apis mellifera). Scientific Reports, 8(1).* doi:10.1038/s41598-018-27193-8
- Fries, I., & Camazine, S. (2001). *Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. Apidologie, 32(3), 199–214.* doi:10.1051/apido:2001122
- Fries, I., Lindstrom, A., & Korpela, S. (2006). *Vertical transmission of American foulbrood (Paenibacillus larvae) in honey bees (Apis mellifera). Veterinary Microbiology, 114(3-4), 269–274.* doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.068
- Garcia-Gonzalez, E., & Genersch, E. (2013). *Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with Paenibacillus larvae, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. Environmental Microbiology, n/a–n/a.* doi:10.1111/1462-2920.12167
- Garcia-Gonzalez, E., Müller, S., Ensle, P., Süssmuth, R. D., & Genersch, E. (2014a). *Elucidation of sevadicin, a novel non-ribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium Paenibacillus larvae. Environmental Microbiology, 16(5), 1297–1309.* doi:10.1111/1462-2920.12417
- Garcia-Gonzalez, E., Müller, S., Hertlein, G., Heid, N., Süssmuth, R. D., & Genersch, E. (2014b). *Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium Paenibacillus larvae. Microbiology Open, 3(5), 642–656.* doi:10.1002/mbo3.195
- Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Hertlein, G., Hedtke, K., Jakubowska, A., & Genersch, E. (2014c). *Paenibacillus larvae Chitin-Degrading Protein PICBP49 Is a Key Virulence Factor in American Foulbrood of Honey Bees. PLoS Pathogens, 10(7), e1004284.* doi:10.1371/journal.ppat.1004284
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I. (2006). *Reclassification of Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens and Paenibacillus larvae subsp. larvae as Paenibacillus larvae without subspecies differentiation. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, 56(3), 501–511.* doi:10.1099/ij.s.0.63928-0

- Genersch, E. (2009). *American Foulbrood in honeybees and its causative agent, Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S10–S19. doi:10.1016/j.jip.2009.06.015
- Hansen, H., & Brødsgaard, C. J. (1999). *American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control*. *Bee World*, 80(1), 5–23. doi:10.1080/0005772x.1999.11099415
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). *New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function*. *Annual Review of Entomology*, 54(1), 285–302. doi:10.1146/annurev.ento.54.110807.090559
- Hertlein, G., Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Süßmuth, R. D., & Genersch, E. (2014). *Production of the Catechol Type Siderophore Bacillibactin by the Honey Bee Pathogen Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE*, 9(9), e108272. doi:10.1371/journal.pone.0108272
- Hertlein, G., Seiffert, M., Gensel, S., Garcia-Gonzalez, E., Ebeling, J., Skobalj, R., ... Genersch, E. (2016). *Biological Role of Paenilarvins, Iturin-Like Lipopeptide Secondary Metabolites Produced by the Honey Bee Pathogen Paenibacillus larvae*. *PLOS ONE*, 11(10), e0164656. doi:10.1371/journal.pone.0164656
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters S, K., De Vos, P., ... Berkeley, R. C. W. (1996). *Reclassification of Paenibacillus (formerly Bacillus) pulvifaciens (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a Later Subjective Synonym of Paenibacillus (formerly Bacillus) larvae (White 1906) Ash et al. 1994, as a Subspecies of P. larvae, with Emended Descriptions of P. larvae as P. larvae subsp. larvae and P. larvae subsp. pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 270–279. doi:10.1099/00207713-46-1-270
- Hoage TR, Rothenbuhler WC (1966) Larval honey bee response to various doses of Bacillus larvae spores. *J Econ Entomol* 59:42-45
- Hrabák, J., & Martínek, K. (2007). *Screening of secreted proteases of Paenibacillus larvae by using substrate-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*. *Journal of Apicultural Research*, 46(3), 160–164. doi:10.1080/00218839.2007.11101388
- Cherubin, P., Garcia, M. C., Curtis, D., Britt, C. B. T., Craft, J. W., Burress, H., ... Teter, K. (2016). *Inhibition of Cholera Toxin and Other AB Toxins by Polyphenolic Compounds*. *PLOS ONE*, 11(11), e0166477. doi:10.1371/journal.pone.0166477
- Illumina Miseq www.illumina.com. [online]. [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf
- Javadi, M. B., & Katzenmeier, G. (2016). *The Forgotten Virulence Factor: The “non-conventional” Hemolysin TlyA And Its Role in Helicobacter pylori Infection*. *Current Microbiology*, 73(6), 930–937. doi:10.1007/s00284-016-1141-6
- Katznelson H. (1950). *Bacillus pulvifaciens (N. SP.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae*. *Journal of bacteriology*, 59(2), 153–155.

- Krška, D., Ravulapalli, R., Fieldhouse, R. J., Lugo, M. R., & Merrill, A. R. (2014). *C3larvin Toxin, an ADP-ribosyltransferase from Paenibacillus larvae*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(3), 1639–1653. doi:10.1074/jbc.m114.589846
- Lindström, A. (2007). *Distribution of Paenibacillus larvae Spores Among Adult Honey Bees (Apis mellifera) and the Relationship with Clinical Symptoms of American Foulbrood*. *Microbial Ecology*, 56(2), 253–259. doi:10.1007/s00248-007-9342-y
- Lindström, A., Korpela, S., & Fries, I. (2008). *Horizontal transmission of Paenibacillus larvae spores between honey bee (Apis mellifera) colonies through robbing*. *Apidologie*, 39(5), 515–522. doi:10.1051/apido:2008032
- Lipsitch, M., Siller, S., & Nowak, M. A. (1996). *The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission*. *Evolution*, 50(5), 1729–1741. doi:10.1111/j.1558-5646.1996.tb03560.x
- Lövgren, A., Zhang, M., Engström, A., Dalhammar, G., & Landén, R. (1990). *Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 4(12), 2137–2146. doi:10.1111/j.1365-2958.1990.tb00575.x
- Lugo, M. R., Ravulapalli, R., Dutta, D., & Rod Merrill, A. (2016). *Structural variability of C3larvin toxin. Intrinsic dynamics of the α/β fold of the C3-like group of mono-ADP-ribosyltransferase toxins*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–24. doi:10.1080/07391102.2015.1123189
- Morrissey, B. J., Helgason, T., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Genersch, E., & Budge, G. E. (2015). *Biogeography of Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme*. *Environmental Microbiology*, 17(4), 1414–1424. doi:10.1111/1462-2920.12625
- Morse, R. A., Flottum, K. (1997). In: *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*. A. I. Root Co., Medina, Ohio, ISBN: 978-0936028101
- Morse R. A., Calderone N. W. (2000) *The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000*. *Bee Culture* 128: 1–15
- Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Mainz, A., Hertlein, G., Heid, N. C., Mösker, E., ... Süssmuth, R. D. (2014). *Paenilamicin: Structure and Biosynthesis of a Hybrid Nonribosomal Peptide/Polyketide Antibiotic from the Bee Pathogen Paenibacillus larvae*. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(40), 10821–10825. doi:10.1002/anie.201404572
- Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E., & Süssmuth, R. D. (2015). *Involvement of secondary metabolites in the pathogenesis of the American foulbrood of honey bees caused by Paenibacillus larvae*. *Natural Product Reports*, 32(6), 765–778. doi:10.1039/c4np00158c

- Narasaki, R., Kuribayashi, H., Shimizu, K., Imamura, D., Sato, T., & Hasumi, K. (2005). *Bacillolysin MA, a Novel Bacterial Metalloproteinase That Produces Angiostatin-like Fragments from Plasminogen and Activates Protease Zymogens in the Coagulation and Fibrinolysis Systems*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 14278–14287. doi:10.1074/jbc.m500241200
- Niyaz Ahmed, Ashok Kumar Mohanty, Utpal Mukhopadhyay, Virender Kumar Batish, Sunita Grover (1998) *PCR-Based Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis in Blood from Immunocompetent Patients with Pulmonary Tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (10) 3094-3095; DOI: 10.1128/JCM.36.10.3094-3095.1998
- OIE Terrestrial Manual (2018), 719-735
- Poppinga, L., Janesch, B., Fünfhaus, A., Sekot, G., Garcia-Gonzalez, E., Hertlein, G., ... Genersch, E. (2012). *Identification and Functional Analysis of the S-Layer Protein SplA of Paenibacillus larvae, the Causative Agent of American Foulbrood of Honey Bees*. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002716. doi:10.1371/journal.ppat.1002716
- Poppinga, L., & Genersch, E. (2015). *Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how Paenibacillus larvae kills honey bee larvae*. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 29–36. doi:10.1016/j.cois.2015.04.013
- Rossi F, Amadoro C, Ruberto A, Ricchiuti L. Evaluation of Quantitative PCR (qPCR) *Paenibacillus larvae* Targeted Assays and Definition of Optimal Conditions for Its Detection/Quantification in Honey and Hive Debris. *Insects*. 2018;9(4):165. Published 2018 Nov 16. doi:10.3390/insects9040165
- Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). *Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a012427–a012427. doi:10.1101/cshperspect.a012427
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Sanger DNA sequencing. www.thermofisher.com. [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing.html>
- Sasseville, D. (2010). *Neomycin. Dermatitis*, 21(1), 3–7. doi:10.2310/6620.2009.09073
- Sood, S., Steinmetz, H., Beims, H., Mohr, K. I., Stadler, M., Djukic, M., ... Müller, R. (2014). *Paenilarvins: Iturin Family Lipopeptides from the Honey Bee Pathogen Paenibacillus larvae*. *ChemBioChem*, 15(13), 1947–1955. doi:10.1002/cbic.201402139
- Spivak, M., & Reuter, G. S. (2001). *Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies Apis mellifera bred for hygienic behavior*. *Apidologie*, 32(6), 555–565. doi:10.1051/apido:2001103

Státní veterinární správa, Mor včelího plodu [online]. SVS ČR. [cit. 10.3.2020]. Dostupné z: <https://www.svs-cr.cz/zdravi-zvirat/mor-vceliho-plodu/>

Titěra, D., Kamler, M., Erban, T., Hubert, J. (2009) Mor včelího plodu – diagnostika, prevence a tlumení, ISBN 978-80-87196-39-7

Vyhláška č. 18/2018 Sb., o veterinárních požadavcích na chov včel a včelstev a o opatřeních pro předcházení a zdolávání některých nákaz včel a o změně některých souvisejících vyhlášek, § 3,8,9,10,11, Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-18>

White G.F. (1996) The bacteria of the apiary, with special reference to bee Diseases, Bureau of Entomology Technical Series no. 14, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.

Wiedenheft, B., Zhou, K., Jinek, M., Coyle, S. M., Ma, W., & Doudna, J. A. (2009). *Structural Basis for DNase Activity of a Conserved Protein Implicated in CRISPR-Mediated Genome Defense. Structure, 17(6), 904–912.* doi:10.1016/j.str.2009.03.019

Wiley, J. M., & van der Donk, W. A. (2007). *Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. Annual Review of Microbiology, 61(1), 477–501.* doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093501

Wilson, W. T. (1972). *Resistance to American foulbrood in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology, 20(2), 165–169.* doi:10.1016/0022-2011(72)90130-9

Wirawan, R. E., Swanson, K. M., Kleffmann, T., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2007). *Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by Streptococcus uberis. Microbiology, 153(5), 1619–1630.* doi:10.1099/mic.0.2006/005967-0