



FUNKČNÍ VZOREK

Uživatelské identifikační spektrum pro identifikaci kmenů druhu *Melisococcus plutonius* metodou MALDI-TOF

Autoři:

Veronika Jeřábková¹

Tomáš Láta²

Miroslava Bodrinová³

Dalibor Titěra¹

Eva Bazgerová²

Tomáš Erban³

¹ Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.

² TRIOS, spol. s r.o.

³ Výzkumný ústav rostlinné výroby, vvi.

Funkční vzorek „Uživatelské identifikační spektrum pro identifikaci kmenů druhu
Melisococcus plutonius metodou MALDI-TOF“ byl vyvinut za podpory Technické agentury
ČR jako součást projektu TAČR TH02030317.

Listopad 2019



Vlastníci výsledku: Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.

Dol 94, 252 66 Máslovice
IČ 629 68 335, DIČ CZ62968335

TRIOS, spol. s r.o.

Zakouřilova 2275/142, Chodov, 149 00 Praha 4
IČ: 442 69 471, DIČ: CZ44269471

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

Drnovská 507/73, Ruzyně, 161 00 Praha 6
IČ: 00027006, DIČ: CZ00027006

Stát: CZ – Česká republika

Využití výsledků jiným subjektem:

N: využití výsledku jiným subjektem je možné bez nabytí licence

Licenční poplatky:

N: poskytovatel licence na výsledek nepožaduje licenční poplatek

Číslo výsledku: TH02030317-V7

Garant výsledku: Ing. Dalibor Titěra, CSc.

Jazyk výsledku: CZE - čeština

Hlavní obor: GJ - Choroby a škůdci zvířat, veterinární medicína

Rok uplatnění výsledku: 2019



ABSTRAKT VÝSLEDKU

Dvě významné bakteriální choroby včely medonosné jsou mor a hniloba včelího plodu. Pro zamezení šíření infekčních nákaz mezi včelstvy je stěžejní zejména včasná diagnostika onemocnění. Ta se zakládá na rozpoznání klinického obrazu nemocí a identifikaci infekčního agens. Při identifikaci kolonií *Paenibacillus larvae*, původce moru, se již rutinně využívá technologie hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Pro spolehlivou identifikaci bakterie *Melisococcus plutonius*, původce hniloby, však chybí validovaný spektrální mix. Předkládaný funkční vzorek obsahuje naměřená hmotnostní spektra různých izolátů *Melisococcus plutonius*, referenčních i izolovaných z infikovaných včelstev.

Klíčová slova výsledku:

MALDI-TOF, *Melisococcus plutonius*, hniloba včelího plodu, hmotnostní spektrometrie, diagnostika, identifikace

Název výsledku:

Uživatelské identifikační spektrum pro identifikaci kmenů druhu *Melisococcus plutonius* metodou MALDI-TOF



PODSTATA TECHNICKÉHO ŘEŠENÍ

Podstatou technického řešení předkládaného funkčního vzorku je naměřený spektrální mix pro spolehlivou rodovou i druhovou identifikaci bakterie *Melisococcus plutonius*, původce hniloby včelího plodu, pomocí technologie hmotnostní spektrometrie metodou MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry).

POPIS FUNKČNÍHO VZORKU

Příkladem realizace technického řešení jsou hmotnostní spektra bakterie *Melisococcus plutonius* naměřená pomocí hmotnostního spektrometru metodou MALDI-TOF. K získání různých hmotnostních spekter infekčního agens byly měřeny vzorky sbírkových kmenů i izolátů získaných ze zahraničí. Dále byla měřena kultura *Melisococcus plutonius* izolovaná ze vzorků nemocných larev pocházejících z případů klinické hniloby v Libereckém kraji v roce 2019.

POPIS NOVOSTI FUNKČNÍHO VZORKU

Identifikace infekčních agens metodou MALDI-TOF má svůj neoddiskutovatelný diagnostický význam v humánní i veterinární medicíně (Lay 2001; Wieser et al. 2012). Rutinně se technologie MALDI-TOF využívá při identifikaci jiného včelího patogena, bakterie *Paenibacillus larvae* (Schäfer et al. 2014). Tato sporulující bakterie je na území České republiky i z hlediska celosvětového měřítka hojně rozšířená zejména z důvodu její odolnosti vůči vnějším vlivům a schopnosti latentně přežívat v prostředí po dobu desítek let. Zároveň jsou kultivační nároky *Paenibacillus larvae* nižší, než je tomu v případě *Melisococcus plutonius*. Především z těchto důvodů je tomuto včelímu



patogenu věnována velká pozornost výzkumných týmů po celém světě a záchyt nových izolátů je na denním pořádku.

Oproti shora uvedenému se hniloba včelího plodu v našich podmínkách vyskytuje jen ojediněle. Na území České republiky nebyla tato choroba zaznamenána cca 30 let až do jejího znovuobjevení v roce 2015 v oblasti Krkonoš (Kamler et al. 2016) a následně v roce 2019 v Libereckém kraji. V Evropě byl výskyt hniloby v posledních letech zaznamenán ve Švýcarsku, Norsku a Velké Británii. Nutnost ani příležitost získat hmotnostní spektra různých izolátů této bakterie tak až do dnešních dní nebyla příliš velká. Naměřené výchozí hodnoty jsou nutnou podmínkou pro tvorbu nového spektrálního mixu, s cílem dosahovat co nejpřesnějších výsledků s maximálními pravděpodobnostními charakteristikami. Je zřejmé, že vytvoření vlastních spekter má smysl pro řádnou a spolehlivou identifikaci kmenů *Melisococcus plutonius*.

TECHNICKÁ DOKUMENTACE

Vlastní spektrální mixy pro spolehlivou rodovou i druhovou identifikaci bakterie *Melisococcus plutonius* byly vytvářeny na základě měření hmotnostních spekter různých izolátů infekčního agens. Pro všechny izolované čisté bakteriální kultury byla provedena molekulární identifikaci PCR (Erban et al. 2017). K měření a přípravě spektrálního mixu byly pro všechny získané záchyty využity různé subpopulace v jednotlivých testovacích sériích pocházejících z různých lokalizací při kultivačních nárůstech na Petriho miskách.

Kultivace bakteriálních kultur

Kultivace referenčních kmenů *Melisococcus plutonius* v lyofilizované podobě probíhala dle doporučených postupů České sbírky mikroorganismů PřF MU Brno (CCM) a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).



Po oživení referenčních kultur a izolování čistých kultur infekčního agens ze vzorků klinicky nemocných včelstev následovala běžná 24-hodinová anaerobní kultivace při definovaných růstových podmínkách.

Měření hmotnostních spekter izolátů metodou MALDI-TOF

Výsledkem kultivací byla vždy 24-hodinová čistá bakteriální kultura pro následná měření hmotnostním spektrometrem (MALDI Biotyper Flex, výrobce Bruker Daltonik GmbH., Německo).

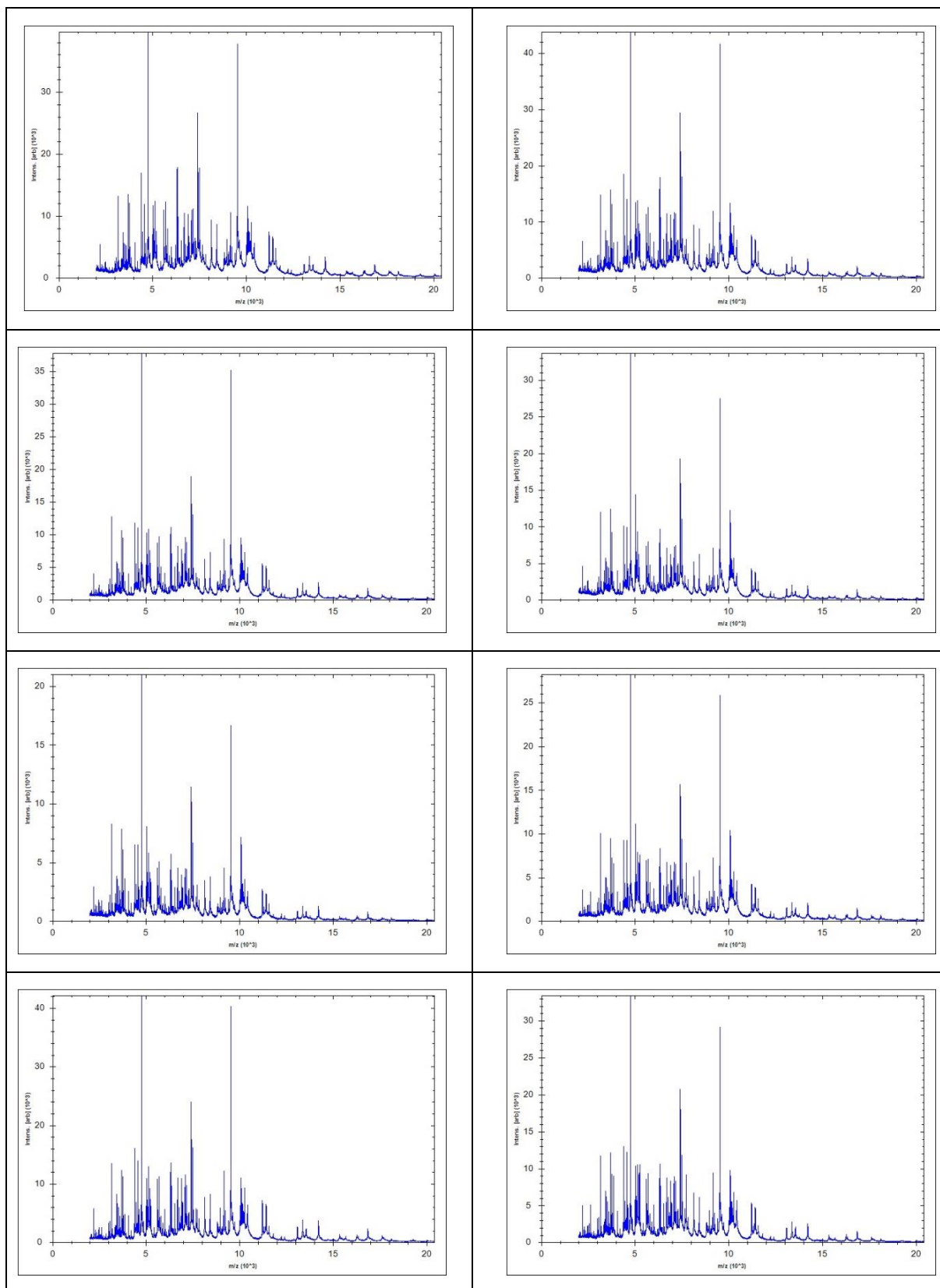
Standardní *in vitro* databáze systému neobsahuje předdefinovaná spektra pro identifikaci *Melisococcus plutonius*. Základní spektrum pro validaci bylo proto naměřeno na sériích izolátů referenčního kmene *Melisococcus plutonius* CCM 3707. Pro iniciální test shody byla využita dříve naměřená uživatelská (nevalidovaná) spektra kmenů *Melisococcus plutonius* zachycených v minulosti ve vnějším prostředí. Následně byly měřeny také izoláty pocházející z klinicky nemocných včelstev ze zahraničí i České republiky. Jednotlivé série izolátů i subkultur byly testovány vždy ve 3, respektive 4 opakováních. Zpracováním hmotnostních spekter byla nalezena nejlepší shoda s předdefinovaným kmenem *Melisococcus plutonius* ATCC 35311 (resp. CCM 3707).

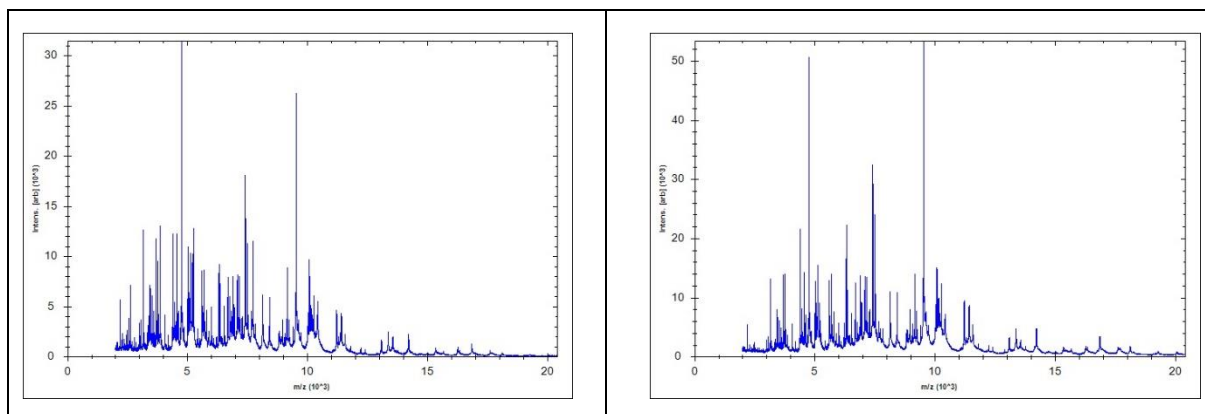
Vytvoření vlastního spektrálního mixu

K vytvoření vlastního spektrálního mixu bylo využito kombinace měřených spekter uvedených v Tabulce č. 1.



Tabulka č. 1: Změřená spektra pro vložení do spektrálního mixu





Záznam o spektrálním mixu byl vyčištěn a optimalizován prostřednictvím příslušných softwarových prostředků. Po normalizaci byl spektrální mix uložen jako datový soubor. Raw data byla pro event. další využití zachována.

Zpětně bylo využito mixu ke kontrolním měřením jednotlivých dříve izolovaných kmenů a jejich subkultur pro kontrolu záchytu jednotlivých dostupných vzorků. Dále, jako negativní kontroly, byly zvoleny a testovány kmeny s blízkými spektry sbírkových kmenů *Paenibacillus alvei* CCM 2051 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224.

ZÁVĚR

Spektrální mix je na vyžádání k dispozici u autorů (VÚVč DoI, TRIOS, s.r.o.) ve formátu k načtení do analytického programového vybavení, a to jako záznam pro knihovnu spekter.



REFERENCE

Lay, J. O. (2001): Maldi-Tof mass spektrometry of bakteria. Mass spektrometry reviews, 20: 172-194.

Wieser A., Schneider L., Jung J., Schubert S. (2012): MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and blond (mini review). Applied Microbiology and Biotechnology, 93: 965-974.

Schäfer M.O., Genersch E., et al. (2014): Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spektrometry. Veterinary Microbiology, 170: 291-297.

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

Erban T., Hubert J., Hortová B., Nesvorná M., Kamler M., Tyl J., Titěra D. (2017): Využití kombinace laboratorních metod pro včasnou diagnostiku hniloby včelího plodu (původce *Melisococcus plutonius*). Certifikovaná metodika.