

JAN HUBERT, MARTIN KAMLER A KOLEKTIV

VYUŽITÍ KVANTITATIVNÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE VE VČASNÉ DIAGNOSTICE HNILOBY VČELÍHO PLODU

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.

2020

Využití kvantitativní polymerázové řetězové reakce ve včasné diagnostice hniloby včelího plodu

Certifikovaná metodika

Autoři:

Doc. Mgr. Jan Hubert, Ph.D.²⁾

MVDr. Martin Kamler¹⁾

Ing. Marta Nesvorná²⁾

Ing. Mgr. Miroslava Bodrinová²⁾

Mgr. Justyna Zítek²⁾

Mgr. Veronika Jeřábková¹⁾

Bc. Blanka Navrátilová²⁾

Ing. Dalibor Titěra, CSc.¹⁾

1) Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.

2) Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Oponenti:

MVDr. Milada Dubská

Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

Vydal: Výzkumný ústav včelařský, s. r. o., 2020

ISBN: 978-80-87196-47-2

Číslo osvědčení: SVS/2020/148281-G

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu TH02030317 *Vývoj nástrojů a pomůcek pro včasnou detekci hniloby včelího plodu* financovaného Technologickou agenturou ČR.

Anotace:

Předložená metodika je zaměřena na využití kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) pro diagnostiku bakterie *Melisococcus plutonius*, která je původcem hniloby včelího plodu. Použitý metodický přístup umožňuje detekci patogenu v dospělých dělnicích, které přenášejí infekci. Lze ji použít i pro další vývojová stadia včely medonosné. Metoda je tedy vhodná pro klinickou a preklinickou diagnostiku hniloby včelího plodu. V metodice je popsán postup odběru vzorků ze včelstev a jejich uchování před zasláním do laboratoře. Dále jsou popsány diagnostické postupy využívající tři sady detekčních qPCR primerů, které se liší svou specifitou. Postup byl ověřován na uměle kontaminovaných vzorcích včel. Text zahrnuje podrobně popsané postupy laboratorního zpracování vzorků včel, vyhodnocení a interpretaci dat. Metodika je využitelná pro laboratoře zabývající se diagnostikou onemocnění včel a veterinární inspektory Státní veterinární správy (SVS). Je vhodná také pro potřeby výzkumné či didaktické.

Název anglicky:

qPCR method for diagnosis of *Melisoccocus plutonius*, the causative agent of the European foulbrood.

Annotation:

The submitted methodology is focused on utilization of quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) sequencing in diagnostics of *Melisoccocus plutonius*, the causative agent of the European foulbrood (EFB). The methodical approach enables detection of pathogen in worker honeybees and different honeybee developmental stages. Thus, the method is useful for clinical and preclinical diagnostics of EFB. The methods described the utilization of the three sets of diagnostic primers for detection and quantification of pathogen, including the processing of the sampling from the hives. The technique was verified on the artificially contaminated samples of known numbers of *M. plutonius* bacteria. The matter includes in detail described working procedures that include sample processing, data evaluation and data interpretation. This methodology is useful as for laboratories focused in diagnostics of honeybee diseases as for veterinarians. It is also suitable for research or educational purposes.

Obsah

1	Cíl metodiky	5
2	Úvod	6
2.1	Původce hniloby včelího plodu	6
2.2	Průběh onemocnění	9
2.3	Doprovodné bakterie vyskytující se při hnilobě včelího plodu	11
2.4	Možné rezervoáry onemocnění	12
2.5	Detekce <i>M. plutonius</i>	14
2.5.1	Detekce <i>M. plutonius</i> pomocí polymerázové řetězové reakce	15
2.5.2	Úskalí detekce <i>M. plutonius</i> pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce	20
3	Vlastní popis metodiky	22
3.1	Odběr vzorků dělnic ze včelstev	22
3.1.1	Pomůcky pro odběr vzorků dělnic ze včelstva	22
3.1.2	Postup odběru vzorků dělnic ze včelstva	22
3.2	Příprava uměle kontaminovaných vzorků včely medonosné	23
3.3	Kvantitativní PCR – příprava standardu	24
3.3.1	Izolace DNA z bakteriálních kmenů	24
3.3.2	PCR reakce	25
3.3.3	Přečištění PCR produktu	26
3.3.4	Klonování	27
3.3.5	Izolace plazmidu	28
3.3.6	Linearizace plazmidu	28
3.3.7	Kvantitativní PCR	29
3.3.8	Kvantitativní PCR – analýza dat	33
4	Závěr	39
5	Prohlášení o poskytovateli dotace a o projektu, v rámci kterého metodika vznikla	39
6	Novost metodiky	39
7	Uplatnění a zhodnocení metodiky	40
7.1	Uplatnění metodiky	40
7.2	Ekonomické zhodnocení	40
8	Seznam použité literatury	41
9	Publikace, které předcházely metodice	46

1 Cíl metodiky

Hniloba včelího plodu, způsobená patogenní bakterií *Melisoccocus plutonius*, patří mezi nebezpečné nákazy včely medonosné a ohrožuje včelstva po celém světě. Spolehlivá identifikace *M. plutonius* je založena na metodách PCR, případně na modifikacích této metody, jako např. hemi-nested PCR a qPCR.

Cílem metodiky je optimalizovat a standardizovat využití qPCR detekčních metod pro kvantifikaci bakterie *M. plutonius* v dělnicích včely medonosné. Využití qPCR často omezují detekční limity. Srovnáním různých detekčních primerů budou vybrány postupy pro co nejcitlivější diagnostiku pomocí qPCR. Za tím účelem budou qPCR metody a detekční primery optimalizovány na vzorcích uměle kontaminovaných včel známým počtem bakterií. Cílem této metodiky je demonstrovat postupy pro qPCR na tomto modelovém příkladu laboratorního zpracování vzorků včel, vyhodnocení napadení a interpretaci získaných dat a předložit postup k odběru vzorků na včelnici.

2 Úvod

Hniloba včelího plodu (*Putrificatio larvae apium*, *Pestis europea larvae apium*) je celosvětově rozšířená choroba napadající larvy několika druhů včel rodu *Apis* (Bailey a Collins 1982a; Forsgren 2010), která způsobuje slábnutí až úhyn včelstev. Příčinou této nemoci je grampozitivní bakterie *Melissococcus plutonius* (Bailey 1963), díky jejímu působení se však ve včelstvech mohou namnožit i další, v menších koncentracích neškodné bakterie, jejichž společné působení někdy vede až k úhynu včelstva (Bailey 1961). Ne nutně ale přítomnost *M. plutonius* ve včelstvu znamená hrozbu akutní nákazy, bakterie naopak dokáže po mnoho let ve včelstvu přežívat nepovšimnuta, aniž by způsobovala zásadní ztráty (Bailey 1961). Klinické projevy se dostaví až při překročení určitého množství bakterií na včelu (Roetschi a kol. 2008), avšak není zcela jasné, co tento nárůst způsobuje. Dělnice jsou díky čistícímu pudu schopné napadené larvy rozpoznat a z plástů odstranit, čímž snižují infekční tlak (Bailey 1961; Forsgren a kol. 2013). Současně se však stávají vektorem tohoto onemocnění. Tím přispívají k šíření infekce v počátku v rámci vlastního včelstva, později jako létavky mohou onemocnění šířit i do dalších včelstev v okolí (Pinnock a Featherstone 1984).

V Česku se toto onemocnění v roce 2015 opět vyskytlo po několika desetiletích na území Krkonoš (Erban a kol. 2017b; Sopko a kol. 2019). Hnilobu včelího plodu je dle platné legislativy zakázáno léčit. Z toho důvodu je třeba zrevidovat poznatky, které jsou o této bakterii a jí způsobované chorobě dostupné. Pro zabránění šíření infekce i snížení nákladů na eradikaci ohnisek nákazy je proto stěžejní včasná diagnostika přítomnosti původce *M. plutonius* ve včelstvech. Včasná a správná aplikace preklinických diagnostických metod může zabránit rozsáhlým ztrátám včelstev.

2.1 Původce hniloby včelího plodu

Ač popsán již před více než sto lety, *Melissococcus plutonius* se dočkal správného zařazení relativně nedávno. Nejprve byl pojmenován *Bacillus pluton* (White 1912), následně byl překlasifikován kvůli řetízkovým útvarům, které tvoří při kultivaci, a pojmenován *Streptococcus pluton* (Bailey 1957a). Nicméně později došlo k vyloučení z rodu *Streptococcus* na základě morfologických a biochemických charakteristik. Byl

tedy vytvořen nový, samostatný taxon a navrženo nové jméno *Melissococcus pluton*, jež vychází z řeckého slova pro včelu – *melissa* (Bailey a Collins 1982a). Doposud definitivní změna názvu přišla o několik let později, kdy byla bakterie oficiálně přejmenována na *Melissococcus plutonius*, aby druhové jméno pouze odkazovalo na Pluta, řecko-římského boha podsvětí, poněvadž podle pravidel nomenklatury se vlastní jména v názvech organismů vyskytovat nemohou (Trüper a de' Clari 1998). S nástupem molekulárních technologií byl posléze potvrzen blízký příbuzenský vztah s rodem *Enterococcus* po srovnání sekvence genu 16S rRNA (Cai a Collins 1994). V současné době je zařazen do kmene Firmicutes a do čeledi Enterococcaceae, v rámci které tvoří samostatný rod, a je jeho jediným zástupcem (Forsgren 2009).

M. plutonius je grampozitivní, nesporulující, pleomorfní, anaerobní až mikroaerofilní bakterie. Je však možné ji v laboratorních podmínkách pasážemi přinutit k růstu v aerobních podmínkách, zároveň však ztrácí schopnost růst anaerobně (Bailey 1957b). V anaerobním prostředí roste pouze za přítomnosti CO₂ (Bailey a Collins 1982a), přičemž koncentrace plynu není pro růst zásadní (Bailey 1957b). V závislosti na dostupnosti vzduchu tvoří koky (v anaerobním prostředí) nebo silnější tyčinky (v prostředí aerobním). Forma může patrně přecházet jedna v druhou v závislosti na přítomnosti sekundárních bakterií, jež ovlivňují koncentraci CO₂, případně z počátku tvoří formu tyčinkovitou, která změní podmínky v místě růstu na anaerobní a umožní tak růst kokální formy (Bailey 1957b). Buňky se mohou vyskytovat samostatně, v párech nebo mohou tvořit řetízky různých délek (Forsgren 2009). Při kultivaci na pevných médiích tvoří kolonie velké 1 mm v průměru, jejichž vzhled se liší nejvíce v závislosti na druhu včel, ze kterých byla bakterie izolována. V zásadě se pohybuje od hustých bílých nebo zrnitých, neprůhledných, celistvých, hladkých, kopulovitých přes relativně transparentní s klenutým středem, až po prstencovité útvary se zrnitými okraji. Největší variabilitu tvoří kultury vykultivované z *Apis cerana* (Bailey a Collins 1982a).

Při studiu příbuznosti kmenů *M. plutonius* z různých částí světa se prokázala velká genetická podobnost i geograficky velmi vzdálených kmenů na základě morfologických a sérologických testů (Bailey a Gibbs 1962). Nejméně příbuzný se ukázal kmen z Brazílie, jenž se odlišoval jak nižšími nároky na kultivaci, tak i poměrem guaninu a cytosinu vůči adeninu a thyminu v DNA a sérologickými výsledky (Bailey 1984). Dále se ukázala podobnost izolátů z Číny a Indie, ačkoliv pocházely z jiných druhů včel (z *Apis*

mellifera a *A. cerana*), oba se však odlišovaly od britských a brazilských. Vytvořily se tak tři pomyslné skupiny kmenů odpovídající jejich geografickému rozmístění (Allen a Ball 1993). Později došlo k přezkoumání příbuznosti kmenů z jednotlivých států Austrálie v porovnání s několika kmeny ze Spojeného království pomocí restričních endonukleáz. Samotné australské státy mají velice odlišné klimatické podmínky – od subtropických přes temperátní a mediteránní až po suché stepní oblasti. Stejně tak se v jednotlivých státech liší vliv hniloby včelího plodu na včelstva, nejvíce znatelný je v jihovýchodní části kontinentu. Výsledky srovnávající DNA bakterie z takto rozmanitých podmínek však ukázaly naprostou genetickou homogenitu (Djordjevic a kol. 1999).

Atypický kmen se objevil v Japonsku. Na rozdíl od typických evropských není zdaleka tak náročný na kultivaci, liší se i v biochemické aktivitě a při pasážování si zachovává virulenci. Po srovnání oblasti genu 16S rRNA a DNA-DNA hybridizací (tj. proces porovnávající oblasti DNA dvou organismů) se jevil jako taxonomicky identický s evropským kmenem, v pulzní gelové elektroforéze je ale šlo velmi dobře odlišit (Arai a kol. 2012). K zásadnímu průlomu došlo při použití multilokusové sekvenační typizace (MLST). Ta je schopná rozeznat typy jinak geneticky homogenních organismů pomocí analýzy sekvencí tzv. „housekeeping“ genů. Ukázalo se, že atypický japonský izolát je totožný s nizozemským, britským a americkým, a že je tudíž poměrně hojně rozšířen (Haynes a kol. 2013). Velmi podobný byl také brazilský izolát (popsal Bailey (1984)), nicméně tvoří vlastní typ. V roce 2013 bylo objeveno 20 sekvenčních typů, 12 z nich ve Velké Británii a 11 v ostatních zemích světa. Především vzácné typy mohou sloužit ke studiu šíření a přenosu bakterie (Haynes a kol. 2013). O rok později bylo pomocí stejné metody zkoumáno více než 200 izolátů na území Spojeného království. Došlo k objevu čtyř nových typů a nalezení dvou, které se do té doby na britském území nevyskytovaly (Budge a kol. 2014).

M. plutonius velmi rychle ztrácí schopnost vyvolat onemocnění, pokud je kultivován v *in vitro* podmínkách (Bailey 1963). Některé atypické formy si však tuto schopnost zachovávají (Arai a kol. 2012). Multilokusová sekvenační typizace odhalila, že větší výskyt onemocnění je na územích, na nichž se vyskytuje více sekvenčních typů a vykazují tak větší diverzitu patogena. Sekvenční typy se podařilo rozdělit do vzájemně geneticky odlišných klonálních komplexů podle jejich podobnosti (Budge a kol. 2014).

2.2 Průběh onemocnění

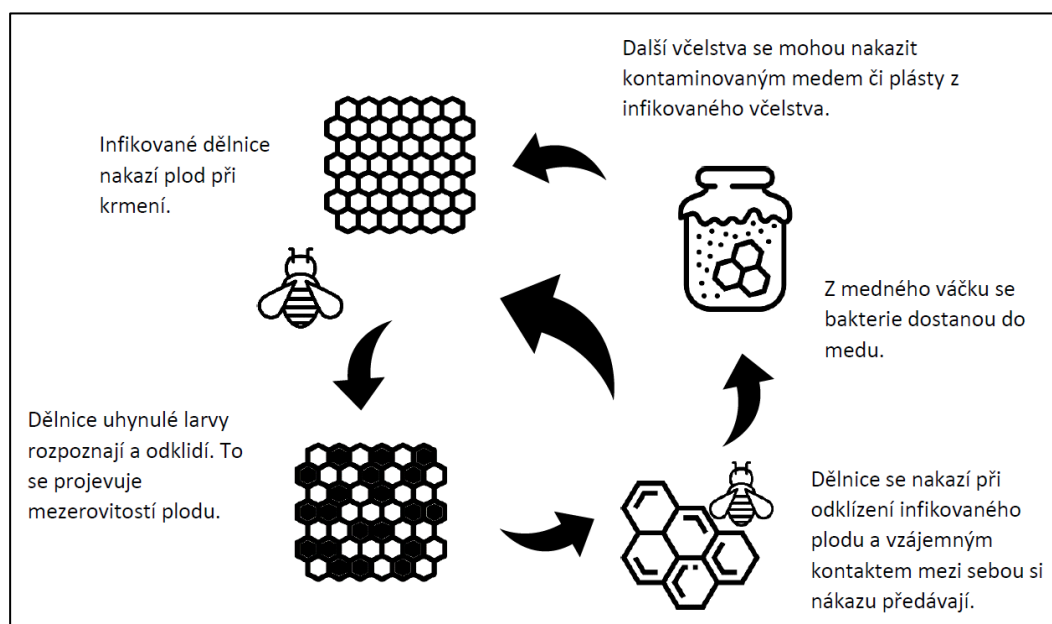
Hniloba včelího plodu je nemoc napadající striktně trávicí trubici larev (Takamatsu a kol. 2016). Bakterie se do těla larev dostává s kontaminovanou potravou. Usadí se v mesenteronu (středním střevě), kde se začne masivně množit (Forsgren 2009). Roste mezi peritrofickou matrix a potravou, jež se ve střevě nachází, a postupně začne vyplňovat skoro celou střevní dutinu. Růst se zastaví, pokud dojde k úmrtí larvy (Tarr 1938; Bailey 1961). Nakažené larvy rostou pomaleji patrně kvůli nedostatku živin vstřebaných přes střevo na úkor zvětšování bakteriální populace v mesenteronu (Bailey 1960). U těch nejvíce nakažených lze pozorovat degeneraci střevního epitelu a rozpad peritrofické matrix, nedochází ale k invazi buněk *M. plutonius* mimo střevní dutinu a napadání tělních tkání (Tarr 1938; Takamatsu a kol. 2016).

Zpravidla hynou čtyři až pět dní staré larvy dělnic i trubců. Uhynulé larvy typicky mění barvu z perleťové bílé na světle žlutou až hnědou. Dále ztrácejí vnitřní tonus a jeví se jako seschlé nebo zvadlé. (Forsgren a kol. 2013; OIE 2016). Při odklizení uhynulých larev z buněk dospělými včelami může být *M. plutonius* roznesen dále ve včelstvu (Bailey 1961). Včelstvo postupně slábne a ubývá počet včel. Ty tak nestíhají uhynulé larvy včas odklízet a z jejich těl se stávají příškvary, které lze z buněk snadno vyjmout. Příškvár obsahuje velké množství patogenu a může se tak stát zdrojem nákazy pro další včelstvo, pokud včelař takový plást s příškvary dále použije.

Larvy hynou jeden až dva dny před zavíčováním buňky, případně krátce poté, ale vždy před stádiem kukly (Bailey 1961; Forsgren a kol. 2013; OIE 2016). Závisí však na době, kdy k infekci došlo. Pokud se infikují velmi mladé larvy, dochází k úhynu záhy. Ty, které se nakazí později, nemusí být nemocí tolik zasaženy, poněvadž se v nich bakterie nestihne dostatečně namnožit. Oproti zdravým larvám stejného stáří jsou sice menší a vytvoří si tenčí kokon (kvůli ztrátě živin na úkor patogenu), ale mohou kompletně prodělat přeměnu v dospělce (Bailey 1961). Vylíhnuté včely pak společně s výkaly vylučují velké množství patogenu, čímž napomáhají šíření infekce ve včelstvu (Bailey 1960).

Při dostatečné síle včelstva a při dobrém čistícím pudu jsou dělnice schopné nakažené larvy rozpoznat a z plástu je odstranit (Bailey 1960). Vytvoří se tak nepravidelný vzor známý jako „pepper pot“, česky označován jako mezerovitost plodu: zavíčkované a nezavíčkované buňky jsou náhodně rozmístěné po odstranění infikovaných larev (obrázek 1) (Forsgren a kol. 2013).

Obrázek 1: Schéma přenosu bakterie z dospělce na larvy přímým kontaktem či pomocí medu, jímž se larvy živí.



V některých případech se nakažené larvy mohou vyvinout až do stádia dospělého, nebo alespoň do stádia předkukly, kdy už jsou zavíčkované, nicméně před zakuklením vylučují spolu s výkaly velké množství *M. plutonius* do buňky (Bailey 1959, 1960). Přestože jsou larvy krmeny dostatečně, neznamená to, že nakonec neuhynou (McKee a kol. 2004). Obecně se dá říci, že čím silnější včelstvo je, tím má větší počet dělnic na odstraňování napadených larev a čištění plástů (obrázek 2).

Infekčním agens způsobujícím onemocnění a s ním související úhyn larev je vždy *Melissococcus plutonius*, dodatečně se v uhynulých larvách pomnožují sekundární a oportunní bakterie (Tarr 1938). Navzdory tomuto zjištění ze 30. let 20. století se však po několik dalších desetiletí věřilo, že hnilobu včelího plodu způsobuje *M. plutonius* v kombinaci s *Achromobacter eurydice*, bakterií velmi blízce s nemocí asociovanou (Bailey 1957a).

Pravého původce hniloby včelího plodu bylo po mnoho let velmi obtížné identifikovat právě z důvodu, že v napadených larvách se zpravidla namnožují sekundární bakterie. Ty byly společně s *M. plutonius* po dlouhá léta považovány za spolupůvodce onemocnění (Bailey 1957a, b). Až po pokusech o vyvolání nákazy pomocí jednotlivých bakteriálních druhů se prokázalo, že za hnilobu včelího plodu je zodpovědný pouze *M. plutonius* (Bailey 1963). Role ostatních mikroorganismů v rozvoji onemocnění jsou zatím dodnes neobjasněny (Forsgren a kol. 2013). V posledních letech se navíc ukazuje, že jich je s onemocněním asociováno více (Gaggia a kol. 2015), níže jsou uvedeny nejvýznamnější z nich (Tarr 1938; Bailey 1957b, 1963).

2.3 Doprovodné bakterie vyskytující se při hnilobě včelího plodu

Achromobacter eurydice byl považován za spolupůvodce onemocnění po mnoho let, poněvadž se vždy vyskytoval v napadených larvách spolu s *M. plutonius* a nedařilo se vyvolat infekci čistou kulturou ani jednoho z nich (Bailey 1956). Má dokonce obdobné nároky na kultivaci, především se podobají ve faktorech, které růstu zamezují (Bailey 1957b). Pokud jsou bakterie kultivovány společně v uzavřených aerobních podmínkách, dokáže *A. eurydice* snížit svým metabolismem hladinu kyslíku natolik, že umožní růst *M. plutonius*. *M. plutonius* snižuje rezistenci střeva a vytváří vhodné podmínky pro vývoj *A. eurydice*. Společně dokáží narušit obranyschopnost střeva tak, aby se v něm mohly uchytit i další sekundární bakterie (Bailey 1963). *A. eurydice* se běžně vyskytuje i ve zdravých larvách, jeho počet se však významně zvýší v průběhu nákazy (Forsgren 2010). V Austrálii asociován se včelami běžně není, tudíž je to patrně trend typický pro severní polokouli (Djordjevic a kol. 1998). Vyskytuje se v trávicích traktech jak *A. mellifera*, tak *A. cerana* (Bailey 1974). Jelikož se této bakterii od 60. let 20. století nevěnovala velká pozornost, zůstává o ní spousta informací neznámá. Dokonce se spekuluje, jestli v některých dřívějších pozorováních nebyla zaměněna za *Lactobacillus kunkeei*. Její evidované kmeny byly podle genu 16S rRNA překlasifikovány na rod *Kurthia*, takže v současnosti patrně neexistuje žádný referenční kmen. Biologie tohoto mikroorganismu tak přetrvává neobjasněná včetně jejího vztahu k hnilobě včelího plodu (Erler a kol. 2018).

Enterococcus faecalis je typickým příkladem bakterie sekundárně napadající larvy nakažené hnilobou včelího plodu a významně znemožňuje kultivaci samotného

M. plutonius z infikovaného materiálu (Djordjevic a kol. 1998). Fylogeneticky je *M. plutonius* rodu *Enterococcus* blízce příbuzný (Cai a Collins 1994). Jedná se o komenzální bakterii vyskytující se běžně v zažívacím traktu zvířat i lidí. Ve vysokých dávkách může být *E. faecalis* pro larvy patogenní, ale zdaleka není tak nebezpečný jako *M. plutonius* – nakažené larvy dospělci rychle identifikují a odstraní, nebo larvy projdou celým procesem metamorfózy naprosto nezasažené a bakterie vymizí. Hojně se pomnožuje v jedincích napadených *M. plutonius* a může si udržovat stálou populaci v chronicky nakažených včelstvech (Bailey 1963).

Paenibacillus alvei roste v aerobním prostředí, tudíž nedokáže přežívat ve střevě larev. Roste jako saprofyt v tělech uhynulých larev (Bailey 1963). Tvoří velmi odolné spory (Bailey 1963), jež se charakteristicky formují do řad vedle sebe (Alippi 1991) a jejichž stěny lze barvit 0,2% roztokem karbolfuchsinu (Hornitzky a Wilson 1989). Ačkoliv se většinou v nakažených včelstvech vyskytuje častěji než třeba *E. faecalis* a dokonce nemoci propůjčuje její charakteristický hnilobný zápach, nedá se jeho přítomnost využít jako spolehlivý indikátor infekce, poněvadž jeho přítomnost není podmínkou (OIE 2008) a u některých případů s atypickými příznaky nebyl vůbec objeven (Gaggia a kol. 2015).

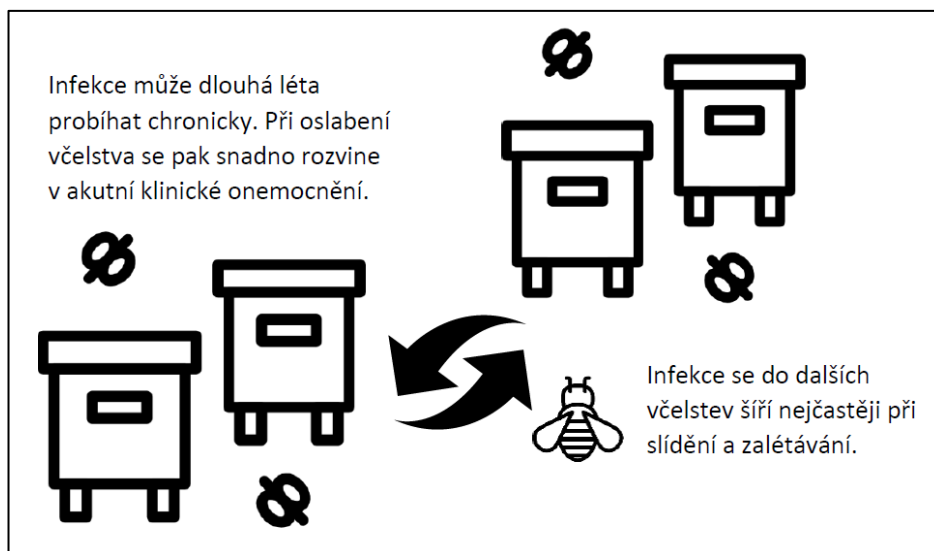
Metodika se zaměřuje výhradně na kvantifikaci *M. plutonius*. Předchozí výsledky využívající barkodové sekvenování části 16S DNA ve včelách s klinickým výskytem hniloby včelího plodu prokazují, že v mnoha vzorcích včel se tyto doprovodné bakterie nevyskytují (Sopko a kol. 2019).

2.4 Možné rezervoáry onemocnění

Hniloba včelího plodu je rozšířena celosvětově (Forsgren 2010). Onemocnění je dlouhodobým problémem v zemích jako např. Anglie, Wales, Austrálie a Švýcarsko (McKee 2003; Waite a kol. 2003b; Roetschi a kol. 2008), v některých částech světa (např. Nový Zéland) se naproti tomu neobjevuje vůbec (Djordjevic a kol. 1999), je tedy možné, že existují i velká území, na nichž se patogen nevyskytuje (Belloy a kol. 2007). *M. plutonius* se vyznačuje schopností přežívat dlouhá období mimo těla larev, zůstává životaschopný a potenciálně infekční v jejich výkalech (Bailey 1959). V postižených včelstvech se vyskytuje v dělnicích, především v těch, které se starají o larvy (Roetschi a kol. 2008), dále v zásobách medu a pylu. Ve včelstvech bez příznaků se bakterie

může vyskytovat především v medu a v trávicích traktech larev i dospělců. Díky přítomnosti v potravě, jíž jsou larvy krmeny, dochází k opětovné infekci nové populace (obrázek 1) (McKee a kol. 2003). Takto může onemocnění zůstat enzootické (OIE 2008; Erban a kol. 2017b).

Obrázek 2: Schéma přenosu onemocnění mezi včelstvy.



Do té doby zůstává benigní (Forsgren a kol. 2018) a pravděpodobně i nepovšimnuté, poněvadž nezpůsobuje žádné zásadní ztráty či slábnutí včelstev (Bailey 1961). Propuknutí klinického onemocnění se patrně odvíjí od narušení určité rovnováhy, jež ve včelstvu do té doby panuje. Přeživší larvy vylučují bakterie do buněk plástů, které se snaží dělnice vyčistit. Díky tomu se nakazí jen velmi malý počet larev, a ty jsou efektivně odstraňovány. Tato rovnováha může být podlomena stresovými podmínkami, jako jsou nedostatek vody či potravy, ale může také záviset i na lokálních klimatických faktorech (Bailey 1961). Bailey a Locher (1968) pozorovali, že když jsou infikovaná včelstva přesunuta do oblasti, kde se hniloba včelího plodu nikdy nevyskytla, spontánně se uzdraví a následující rok nejeví žádné známky nemoci. Jednotlivé sekvenční typy klonálních komplexů se také vyskytují pouze na určitých územích, přesné důvody však ještě nejsou známy (Budge a kol. 2014).

2.5 Detekce *M. plutonius*

Vzhledem k závažnosti onemocnění a faktu, že neexistuje možnost včelstva léčit, je včasná detekce infekce klíčovým faktorem pro záchranu včelstev i před nepozorovaným šířením nákazy na další stanoviště. Vezmeme-li v potaz, že *M. plutonius* dokáže přežívat velmi dlouhou dobu mimo hostitelské prostředí (Bailey 1959), ale třeba i v medu (McKee a kol. 2003), je žádoucí, aby detekční metoda byla dostatečně citlivá ať už kvůli spolehlivé diagnostice nebo aby prokázala čistotu produktu kvůli exportním účelům (Hornitzky a Smith 1998; McKee a kol. 2003). Testování nakažených larev však může být zkresleno přítomností dalších, sekundárně invadujících bakterií, jež poměrně často infekci doprovázejí a ztěžují tak určení diagnózy (Alippi 1991). V současnosti existuje několik metod jak laboratorních, tak terénních – od klinických prohlídek až po užití nanotechnologií.

Cílené zdravotní prohlídky včelstev by měly patřit k základním standardům péče o včelstva. Primárně se pozoruje nepravidelné rozmístění zavíčkovaných larev v plástu (mezerovitý plod). Podle české legislativy se prohlídky včelstev provádějí v souladu s § 12 vyhlášky č. 18/2018 Sb. (MZe ČR 2018). Na základě klinického posouzení se provede bakteriologické vyšetření z podezřelých larev.

První laboratorní metodou, která se pokoušela o prokázání přítomnosti *M. plutonius* v larvách, byla kultivace z mrtvých larev. Poměrně brzy se ale zjistilo, že je velmi náročná kvůli speciálním požadavkům bakterie na živné médium a kvůli obtížnému rozlišení od oportunních bakterií (Bailey 1957a). Nicméně se podařilo vyvinout médium, na kterém *M. plutonius* rostl (Bailey 1957a; Bailey a Collins 1982b). Dalším problémem se ukázala být různá životnost bakterií v závislosti na materiálu, ze kterého byly izolovány. Ta byla mnohem vyšší, šlo-li o roztěry obsahu mesenteronu (středního střeva) ve srovnání s buňkami, jež zůstaly v příškvarech z mrtvých larev. Životnost vykultivovaných izolátů *M. plutonius* z mesenteronu byla alespoň 15 měsíců, což vysoce převyšovalo životnost ostatních bakterií nalezených ve vzorku (Bailey 1959). Závažné problémy nastaly v momentě, kdy byla snaha vypěstovat bakterii přímo ze vzorků medu. Kultivace se ukázala pro tento účel extrémně nevhodná, poněvadž se při ní projevilo méně než 0,2 % mikroskopicky detekovatelných životaschopných organismů *M. plutonius* (Hornitzky a Smith 1998).

Diagnóza na základě mikroskopie vyžaduje rozpoznání alespoň jedné buňky *M. plutonius* v pozorovaném poli, což znamená, že počet buněk ve vzorku musí být velmi vysoký (Pinnock a Featherstone 1984). Vzhledem k tomu, že jednoznačný určovací postup byl stanoven až ke konci 80. let 20. století Hornitzkym a Wilsonem (1989), přistoupilo se k vývoji imunologické metody, která je jak detekční, tak kvantifikační, a oproti mikroskopii má nižší nároky na koncentraci bakterie ve vzorku (Pinnock a Featherstone 1984). Díky potvrzené sérologické příbuznosti kmenů z odlišných geografických podmínek (Bailey a Gibbs 1962) bylo možné vyvinout protilátky z dostupných napadených larev a ty použít pro testování. Výsledky ukázaly mimo jiné přítomnost *M. plutonius* v klinicky zdravých včelstvech, přičemž dělnice hledající potravu obsahovaly bakterií nejvíce. ELISA se tedy stala přesnou a rychlou metodou pro diagnostiku a otevřela dveře dalším možnostem diagnostiky. Zároveň se díky ní zrodila myšlenka, že létavky mohou sloužit jako vektory onemocnění (Pinnock a Featherstone 1984). Lateral flow test je test, který principiálně funguje stejně jako například běžný těhotenský test. Pro detekci hniloby včelího plodu byl vyvíjen od roku 2003 (Waite a kol. 2003a). Podařilo se vyvinout specifickou monoklonální protilátku, jež reaguje pouze na přítomnost *M. plutonius*, tedy neprokázalo se, že by vykazovala reaktivitu s jakýmkoliv jiným včelím patogenem. Test proto nevykazuje falešně pozitivní výsledky. Sensitivita detekční metody se pohybuje mezi 96–100 % a to jak v laboratoři, tak při užití v terénu, a výsledek je znám maximálně do dvaceti minut. Z těchto důvodů je hojně používán ve Spojeném království pro rutinní kontrolní i diagnostické prohlídky (Tomkies a kol. 2009). Vzhledem k tomu, že bakterie se může vyskytovat i ve včelstvech, které nevykazují žádné symptomy nákazy a mohou ji přenášet dospělci (Belloy a kol. 2007), může tento test sloužit k odhalování latentních infekcí (Tomkies a kol. 2009). Problémem je, že byl vyvinut podle evropského (typického) kmene, není však schopen spolehlivě detekovat kmeny atypické hlášené např. z Japonska (Takamatsu a kol. 2012).

2.5.1 Detekce *M. plutonius* pomocí polymerázové řetězové reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je běžně využívaným způsobem k detekci hledaného úseku DNA či RNA. Využívá se oblast genu pro 16S rRNA. U *M. plutonius* je zajímavé, že při změněné teplotě annealingu dochází i k detekci příbuzného druhu

E. faecalis. Fragmenty jsou poté rozštěpeny restriční endonukleázou. Výsledkem štěpení jsou různě dlouhé úseky, jež lze rozdělit pomocí elektroforézy, přičemž ty z genomu *M. plutonius* mají specifickou délku a jsou již nezaměnitelné s těmi pocházejícími od *E. faecalis*. Jsou potom použity pro další PCR reakci, pro níž je použita jiná kombinace primerů než v prvním kroku (hemi-nested). Takto je možné detekovat 1–10 buněk na mililitr vzorku přímo z larev *A. mellifera* (tabulka 1) (Djordjevic a kol. 1998). Odhalit přítomnost *M. plutonius* pomocí polymerázové řetězové reakce je možné nejen ze vzorků larev, ale i z medu, pylu, plástů a různých tkání dospělých včel. Oproti kultivaci je totiž mnohem citlivější. Hlavní rozdíl přitom tvoří výsledky až z druhé fáze reakce, poněvadž především v medu se bakterie vyskytuje pouze v malých koncentracích a kultivace je tedy ve valné většině případů negativní. Díky osekvenování genomů dalších příbuzných bakterií z rodu *Enterococcus* se také potvrdilo, že fragment vzniklý štěpením produktu z první generace polymerázové řetězové reakce je opravdu specifický čistě pro *M. plutonius*, tudíž nemůže dojít k záměně za jiného patogenu (McKee a kol. 2003). V současnosti je možné také provádět tzv. multiplex PCR, což vede k detekci ne jednoho, ale několika hledaných úseků DNA různých patogenů zároveň. Testování se dá provádět přímo ze vzorků larev a dospělých včel, aniž by mu předcházela mikrobiologická kultivace (Garrido-Bailón a kol. 2013). Jedinou nevýhodou tohoto typu řetězové reakce je, že nedokáže rozlišit mezi živými a neživými buňkami a pouze indikuje přítomnost bakterie (Hornitzky a Smith 1998).

Tabulka 1: Přehled primerů a podmínek konvenční PCR pro hemi-nested PCR. Zdroj: upraveno, autoři Weisburg a kol. (1991); Djordjevic a kol. (1998); Govan a kol. (1998).

autor	primer	sekvence			
Govan a kol. (1998) ^a , Weisburg a kol. (1991) ^b	EFB-F ^a	5'-GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC-3'			
	EFB-R ^a	5'-TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG-3'			
	27F ^b	5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3'			
	1492R ^b	5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'			
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů	
	počáteční denaturace	95 °C	1 min	30	
	amplifikace	93 °C	1 min		
		55 °C	30 s		
		72 °C	1 min		
	finální elongace	72 °C	5 min		
	složení master mixu pro jednu reakci	chemikálie	objem (μl)		
				H ₂ O	9,4375
				PCR pufr	1,25
				dNTPs	0,25
Forward primer				0,5	
Reverse primer				0,5	
Tag polymeráza				0,0625	
DNA				0,5	
autor	Primer	sekvence			
Djordjevic a kol. (1998)	MP1	5' CTT TGA ACG CCT TAG AGA 3'			
	MP2	5' ATC ATC TGT CCC ACC TTA 3'			
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů	
	počáteční denaturace	95 °C	2 min	40	
	denaturace	95 °C	30 s		
	annealing	61 °C	15 s		
	extenze	72 °C	60 s		
	finální elongace	72 °C	5 min		
	MP1	5' CTT TGA ACG CCT TAG AGA 3'			
	MP3	5' TTA ACC TCG CGG TCT TGC GTC TCT C 3'			
	počáteční denaturace	95 °C	2 min	40	
	denaturace	95 °C	30 s		
	annealing	56 °C	15 s		
	extenze	72 °C	60 s		
	finální elongace	72 °C	5 min		

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce stanovit počet buněk *M. plutonius* ve zkoumaném vzorku dokáže. Ukázalo se, že dělnice pohybující se především u česna nesou dvacetkrát méně kolonií tvořících jednotek [KTJ] *M. plutonius* než ty, které se pohybují a pracují v plodišti. Klinické příznaky nákazy hnilobou včelího plodu se začínají projevovat při překročení množství 50 000 KTJ na jedince. Kvantitativní analýza je tedy vhodným prostředkem k monitoringu, poněvadž dokáže odhalit přítomnost bakterie ještě před tím, než se nákaza začne projevovat. Nejvhodnější jsou pro tento účel právě dělnice ošetřující plod (Roetschi a kol. 2008).

NGP (nanočástice zlata) jsou využívány v chromatografické metodě, která byla vyvinuta za účelem snížení pracovní a časové náročnosti, kterou obnáší PCR. Tyto částice se nahromadí v místě, kde vyvinuté specifické DNA sondy najdou komplementární úsek v testovaném vzorku DNA. V případě pozitivního vzorku na *M. plutonius* agregace nanočástic způsobí jeho barevnou změnu viditelnou pouhým okem. Ačkoliv je oproti PCR desetkrát méně citlivý, za vhodných podmínek se dá tento způsob detekce považovat za stejně spolehlivý. Jednou z hlavních výhod je, že nevyžaduje amplifikaci/pomnožení DNA a dá se tedy provádět bezprostředně po její extrakci ze zkoumaného materiálu. Další výhodou je, že cílové sekvence není nutné fluorescenčně, ani jinak značit, k barevné změně dojde pouze na základě agregace nanočástic (Saleh a kol. 2012). Otazníkem zůstává, zdali jsou vyvinuté DNA sondy dostatečně specifické a jestli je metoda dostatečně průkazná i při použití rutinní extrakce DNA (Takamatsu 2012).

Tabulka 2: Přehled primerů a podmínek ke qPCR a k PCR využívanému jako detekční metodě v Česku. Zdroj: upraveno, autoři Roetschi a kol. (2008); Budge a kol. (2010); Dainat a kol. (2018); Titěra a kol. (2019).

autor	primer	sekvence		
Budge a kol. (2010)	EFBFor	TGT TGT TAG AGA AGA ATA GGG GAA		
	EFBRev2	CGT GGC TTT CTG GTT AGA		
	EFBProbe	FAM-AGA GTA ACT GTT TTC CTC GTG ACG GT-TAMRA		
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů
	denaturace	95 °C	10 min	
	annealing	60 °C	1 min	40
	extenze	95 °C	15 s	
autor	primer	sekvence		
Roetschi a kol. (2008)	MelissoF	5' CAG CTA GTC GGT TTG GTT CC 3'		
	MelissoR	5' TTG GCT GTA GAT AGA ATT GAC AAT 3'		
	Taqman® MBG probe	5' FAM-CTTGGTTGGTCGTTGACMBGNFQ 3'		
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů
	denaturace	50 °C	2 min	
	annealing	95 °C	10 min	
	elongace	95 °C	15 s	40
	final	60 °C	1 min	
autor	primer	sekvence		
Titěra a kol. (2019)	JHF1	5'-AGGAACAATTCAATGCAGCTGCAG-3'		
	JHR1	5'-CATTAGTGGTGAATCTTGGTTGGC-3'		
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů
	počáteční aktivace	95 °C	1 min	
	amplifikace	95 °C	15 s	40
	čtení fluorescenčního signálu	60 °C	30 s	
	analýza křivky tání*	95 °C	15 s	
		60 °C	30 s	
		95 °C	15 s	
*čtení fluorescenčního signálu každých + 0,5 °C				
autor	primer	sekvence		
Dainat a kol. (2018)	MP-F	5' GAC CTG TTT AGC TAT TAT CAC TA 3'		
	MP-R	5' CAC CTA CAA TGA ATG ATT CAT TC 3'		
	MP-Probe	FAM – TCC GCC TAA GCT ACC ACC TAA GAA C – BHQ1		
	podmínky	teplota	čas	počet cyklů
	počáteční aktivace	95 °C	5 min	45
	amplifikace	95 °C	10 s	
	annealing	60 °C	30 s	

2.5.2 Úskalí detekce *M. plutonius* pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce

V této metodice se věnujeme porovnání kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) využívající primery MelissoF a MelissoR (tabulka 2). Tyto primery byly použity v metodě využívající SYBR Green barvivo. Primery MelissoF a MelissoR jsou navrženy podle SodA genu, který tvoří 79 bp. Při analýze dělnic během výskytu hniloby včelího plodu v Krkonoších byly zjištěny falešně pozitivní výsledky detekce na kontrolním stanovišti mimo vytyčené pásmo (Sopko a kol. 2019). Pro ověření byl klonován a následně sekvenován získaný PCR produkt a sekvence byla porovnána se sekvencemi v GenBank pomocí nástroje Blast. Tyto výsledky ukazuje tabulka 3. Z tabulky je zřejmé, že všechny sekvence vykazují 99–100 % identitu s genovou sekvencí sodA proteinu Acces No. EF666055. Při hledání podobných sekvencí v GenBank nebyla žádná další podobná sekvence nalezena, nejvyšší podobnost (75 %) vykazuje sekvence *Lacococcus peaturi* (Access No. CP045924) a 71 % sekvence *Anoxybacillus kamchatkensis* (CP025535). Shodné výsledky byly ověřeny i amplifikací využívající Taqman® MBG sondu.

Možné řešení této situace bylo navržení nových detekčních primerů, které amplifikují delší oblast SodA genu. Proto byly navrženy primery JHF1 a JHR1 (tabulka 2) (Titěra a kol. 2019). Polohu těchto primerů na sekvenci Acces No. EF666055 a původních primerů MelissoF a MelissoR ukazuje obrázek 3. Alternativní možnost poskytují nově navržené primery (MP-F a MP-R) pronapA pseudogene, Na⁺/H⁺ antiporter (tabulka 2), které nemají interferenci s DNA ze včely (Dainat a kol. 2018). Při porovnání přepočtu počtu kopií genu pro MelissoF a MelissoR na včelu a relativizovaných dat vztažených na počet kopií 16S DNA genu (Dorn-In a kol. 2015) a β -actin (Chen a kol. 2005) poskytuje nejpresnější výsledky přepočet počtu kopií na včelu (Sopko a kol. 2019).

Tabulka 3: Výsledky porovnání sekvencí sodA genu využívajícího v qPCR identifikaci *M. plutonius*, přepracováno dle Sopka a kol. (2019).

Klon no.	Včelstvo_vzorek	EFB	velikost (bp)	Acess. No.	Ident. (%)
1	Mladé Buky_1	poz	79	EF666055	100
2	Mladé Buky_2	poz	79	EF666055	99
3	Mladé Buky_3	poz	79	EF666055	100
4	Mladé Buky_4	poz	79	EF666055	100
5	Mladé Buky_5	poz	79	EF666055	100
6	Mladé Buky_6	poz	79	EF666055	100
7	Horní Maršov_1	poz	79	EF666055	100
8	Horní Maršov_2	poz	79	EF666055	100
9	Horní Maršov_3	poz	79	EF666055	100
10	Horní Maršov_4	poz	79	EF666055	100
11	Horní Maršov_5	poz	79	EF666055	100
12	Horní Maršov_6	poz	79	EF666055	100
13	Tišice_1	kon	79	EF666055	100
14	Tišice_2	kon	79	EF666055	100
15	Tišice_3	kon	79	EF666055	100
16	Tišice_4	kon	79	EF666055	100
17	Tišice_5	kon	79	EF666055	100
18	Tišice_6	kon	79	EF666055	100
19	Černý Důl_1	kon	79	EF666055	100
20	Černý Důl_2	kon	79	EF666055	100
21	Černý Důl_3	kon	79	EF666055	100
22	Černý Důl_4	kon	79	EF666055	100
23	Černý Důl_5	kon	79	EF666055	100
24	Černý Důl_6	kon	79	EF666055	100

Legenda: EFB: poz – pozorovány příznaky onemocnění při klinické prohlídce, včelstva v ochranném pásmu okolo původního ohniska; kon – kontrolní včelstva mimo ochranné pásmo, při klinické prohlídce bez příznaků onemocnění.

Obrázek 3: Sekvence SodA fragmentu (Acces No. EF666055) *Melissococcus plutonius* a nasedání detekčních primerů.

```

5'-TTATATTGATACTGAAACAATGCATTTCACCATGATAAACATCATAATA
CTTATGTAACATAAATTGAATGAAGCAATTGAAAAACATCCTGAACCTTGGAA
ATCAATCTGTTGAGGAATTAATTACAAATATGAATGCGATTCCCGAAGATA
TTCGTTTAGCTGTTGCGAATAATGGTGGGGGGCATGTGAATCATTCAATTTT
CTGGAAAGTTATGGGGCCAAATGCTGGTGGTGAACCAACTGGTGTCTGTAA
AAGAAGCTATTAATCAAACCTTTTGGTAGTTTCGAAAAAATGAAGGAACAAT
TCAATGCAGCTGCAGCTAGTCGGTTTGGTTCCGGTTGGGCTTGGTTGGTC
GTTGACAAAAACAAAAATTGTCAATTCTATCTACAGCCAAACCAAGATTC
ACCACTAATGGAAGGAAAAACACCAATTTTAGGATTA-3

```

Legenda: nasedání primerů JHF1 5'-TTATATTGATACTGAAACAATGCATTTC-3', JHR1 5'-CATTAGTGGTGAATCTTGGTTGGC-3', MelissoF 5'-CAGCTAGTCGGTTTGGTTCC-3' a MelissoR 5'-TTGGCTGTAGATAGAATTGACAAT-3' na SodA fragment.

3 Vlastní popis metodiky

Technické řešení se v této metodice týká porovnání sad oligonukleotidových sekvencí pro detekci bakterií druhu *M. plutonius* pomocí kvantitativní PCR.

3.1 Odběr vzorků dělnic ze včelstev

Pro vyšetření odebíráme ze včelstva vzorky dělnic obsedajících plod. Pro detekci *M. plutonius* pomocí qPCR je nezbytné odebrat 10 dělnic, ideální vzorek zaslaný do laboratoře by měl čítat alespoň 30 včel pro případná opakování.

3.1.1 Pomůcky pro odběr vzorků dělnic ze včelstva

1. Vzorkovnice – PP sáček či uzavíratelná nádobka, případně papírová krabička na včely.
2. Podložka pro sklepnutí včel – strůpková fólie ze včelstva, karton či čisté noviny.
3. Čisté jednorázové rukavice, nové pro každé odebírané včelstvo.
4. Popisovač a štítky na popis vzorků.
5. Včelařské pomůcky – rozpěrák, dýmák.

3.1.2 Postup odběru vzorků dělnic ze včelstva

1. Ze včelstva vyjmeme plodový plást.
2. Zkontrolujeme, zda na plástu není matka, případně ji odchytíme a vrátíme do úlu.
3. Plást uchopíme jednou rukou za horní loučku nad připravenou podložkou. Druhou rukou prudce udeříme do horní loučky a sklepeme včely na podložku. Případně uchopíme plást oběma rukama za horní loučku a včely sklepeme prudkým trhnutím (obrázek 4).
4. Vzorek alespoň třiceti dělnic přemístíme do připravené vzorkovnice.
5. Plást i zbylé včely vrátíme do úlu a úl zavřeme.
6. Vzorek řádně popíšeme, štítek musí obsahovat: jméno a příjmení chovatele, registrační číslo chovatele, název a registrační číslo stanoviště, číslo úlu.
7. Postupně odebereme vzorky dělnic ze všech úlů na stanovišti, odebrané vzorky uchováváme v chladu a ve stínu.

8. Po odebrání všech vzorků neprodleně usmrtíme včely zamražením a uchováváme v mrazničce při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
9. Zamražené vzorky odešleme do laboratoře.

Obrázek 4: Oklep dělnic z plodového plástu na podložku pro snadný odběr vzorku ze včelstva.



3.2 Příprava uměle kontaminovaných vzorků včely medonosné

Byl použit sbírkový kmen *Melissococcus plutonius* ATCC 35311, který byl kultivován v tekutém neselektivním médiu BHI (angl. brain heart infusion) s přidavkem cysteinu (1 g/l) a KH_2PO_4 (13,6 g/l). Kultivace probíhala za anaerobních podmínek při $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 dní. Médium bylo odděleno od bakterií centrifugací (5 000 rpm, 5 min) a odstraněno. Peleta bakterií byla promyta a následně resuspendována ve sterilním fosfátovém pufru. *M. plutonius* tvoří při růstu shluky, proto bylo nezbytné oddělit bakterie ultrazvukovou sonikací (amp. 20 %, process time: 12 s, pulse on: 0,5 s, pulse off: 1 s). K bakteriální suspenzi bylo přidáno interkalační fluorescenční barvivo

propidium jodid (PI) pro detekci mrtvých buněk a dále fluorescenční barvivo SYTO BCTM pro detekci živých bakterií. Sortování bakterií bylo provedeno na průtokovém cytometru BD Biosciences (SYTO BCTM – 488 nm laser, detektor 530/40; PI – 561 nm, detektor 610/20). Bakteriální suspenze o známém titru od 10^2 do 10^6 byla přepipetována do mikrozkušavek. Naředěné kultury byly ve fosfátovém pufru přidány k dělnicím včel medonosné získaných ve Výzkumném ústavu včelařském (VÚVČ), kde nebyly žádné příznaky onemocnění, ani zde nebyl v předchozích analýzách nalezen *M. plutonius* pomocí 16S rRNA profilování. Pro homogenizaci vzorků včel byl použit standardně používaný postup chloroform-fenolové extrakce (Erban a kol. 2017a). Extrahovaná DNA byla uchována v $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ do zpracování. Byly připraveny vzorky s následujícím počtem *M. plutonius* na vzorek: 0, 100, 1 000, 10 000, 1 000 000 bakterií, kde každý vzorek obsahoval ještě homogenát z 10 dělnic včely medonosné.

3.3 Kvantitativní PCR – příprava standardu

3.3.1 Izolace DNA z bakteriálních kmenů

Z lyofilizovaných buněk *M. plutonius* byla izolována DNA pomocí komerční sady Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), která byla mírně modifikována. Suspenze buněk společně s 250 μl Nuclei Lysis Solution a 50 μl 0,5M EDTA (pH 8,0) byla přidána do sterilních 2 ml zkumavek se šroubovacím uzávěrem s 200 mg granátových ostrých částic 0,3 mm (BioSpec 11079103gar) a 200 mg granátových ostrých částic 1 mm (BioSpec 11079110gar). Obsah zkumavek byl homogenizován 5 minut v mini-BeadBeater 16. Poté byly vzorky stočeny 2 minuty při 10 000 $\times g$. Supernatant byl odebrán do čistých 1,5 ml zkumavek a byla přidána 20 μl Proteinase K, 20mg/ml a 5 μl RNase A Solution, 4 mg/ml. Následovala inkubace 1 hodinu při teplotě $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termobloku. Po inkubaci bylo přidáno 300 μl Wizard SV Lysis Buffer a vzorky byly intenzivně míchány několik vteřin na vortexu. Poté byl lyzáát přenesen na kolonku Wizard SV Minicolumn Assembly a stočen 13 000 $\times g$ po dobu 3 minut. Dále byla kolonka 4x promyta 650 μl Column Wash Solution, stočena 13 000 $\times g$, 1 minutu. Promývání bylo ukončeno centrifugací po dobu 2 minut 13 000 $\times g$ čímž došlo k odstranění zbytkového etanolu. Kolonka byla přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky, na kolonku bylo přidáno 100 μl Nuclease-Free Water, načež byla směs inkubována 2 minuty při pokojové teplotě. Vzorky byly stočeny 2 minuty při 13 000 $\times g$. Čistá DNA

byla uložena do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kvalita byla kontrolována na elektroforéze a výtěžnost byla měřena spektrofotometricky v Nanodrop.

3.3.2 PCR reakce

S čistou DNA izolovanou z buněk *M. plutonius* byla provedena PCR reakce. K porovnání byly použity tři sady primerů (viz níže). Pro všechny kombinace primerů probíhala amplifikační reakce v objemu 50 μl a obsahovala 5 μl 10X Ex Taq buffer (TaKaRa), 2,5 μl dNTP mix (10 mM, každý), 2 μl forward primer (10 μM), 2 μl reverse primer (10 μM), 0,25 μl Takara Ex Taq (5 units/ μl), 2 μl templátové DNA a 36,25 H_2O . Pro všechny reakce byl použit stejný protokol na termocycleru za reakčních podmínek uvedených v tabulce 4.

Tabulka 4: PCR podmínky pro přípravu standardu z detekčních primerů.

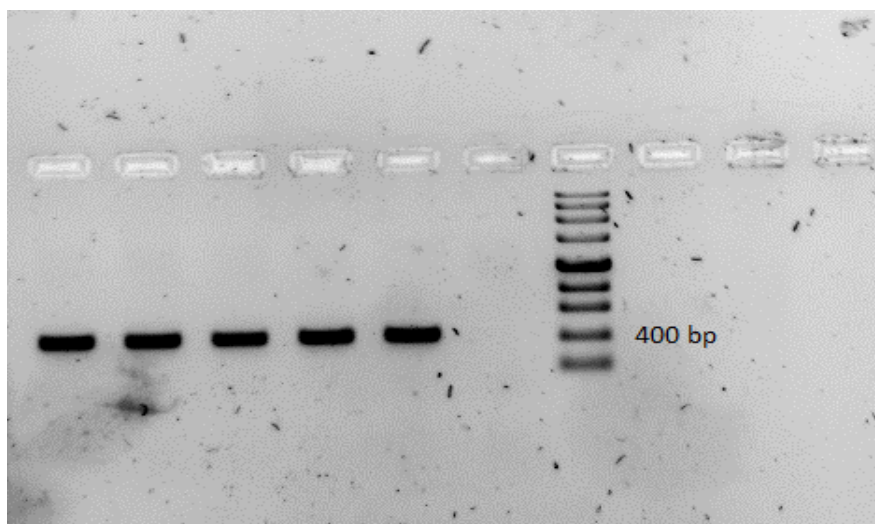
Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	3 min	1
denaturace	95	30 s	30
nasedání primerů	60	30 s	
prodlužování	72	1 min	
závěrečné prodlužování	72	5 min	1

V první variantě byly testovány primery MelissoF 5'-CAGCTAGTCGGTTTGGTTCC-3' a MelissoR 5'-TTGGCTGTAGATAGAATTGACAAT-3'. Společně amplifikovaly úsek genu dlouhý 79 párů bází. V druhé variantě byly testovány primery MP-F 5'-GACCTGTTTAGCTATTATCACTA-3' a MP-R 5'-CACCTACAATGAATGATTCATTC-3', společně amplifikovaly úsek genu dlouhý 92 párů bází. Ve třetí variantě byly testovány primery JHF1 5'-AGGAACAATTCAATGCAGCTGCAG-3' a JHR1 5'-CATAGTGGTGAATCTTGGTTGGC-3'. PCR reakce pro tyto primery byla provedena společně s primery: JH_F 5'-TTATATTGATACTGAAACAATGCATTTG-3' a JH_R 5'-TAATCCTAAAATTGGTGTTCCTTC-3'. Dohromady amplifikovaly úsek genu dlouhý 480 párů bází, zahrnující i oblast vymezenou primery JHF1 a JHR1.

Pro ověření výsledků PCR reakcí byla použita elektroforéza v 2% agarózovém gelu. Do 80 ml TAE pufru bylo přidáno 1,6 g agarózy, následně byl roztok přiveden k varu v mikrovlnné troubě. Do lehce vychladlého roztoku bylo pak přidáno barvivo SYBR[®].

Safe DNA Gel Stain (v DMSO v poměru 1:9) a roztok byl nalit do elektroforézové vany. Zde byl ponechán cca 30 minut v laboratorní teplotě. Do jamky v gelu bylo nanášeno 5 μ l směsi: 4 μ l PCR produktu s 1 μ l pufru Yellow load (Top-Bio); a do jedné jamky 2 μ l markeru GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo) pro určení velikosti. Elektroforéza probíhala při konstantním proudu 100 V, napětí 95 mA po dobu 30 minut. Poté byl gel detekován na UV (obrázek 5).

Obrázek 5: Elektroforézový gel PCR produktu amplifikovaného primery JH_F a JH_R.



3.3.3 Přečištění PCR produktu

PCR produkty správné velikosti byly přečištěny pomocí Expin Combo GP (GeneAll) dle návodu výrobce. K produktu PCR reakce byl přidán pětkrát takový objem PB pufru. Vzorky byly důkladně promíchány, přeneseny na kolonku a centrifugovány 1 minutu při 14 000 $\times$ g. Obsah sběrných zkumavek byl vylit, na kolonky bylo nanášeno 700 μ l NW pufru, a následně byly stočeny 1 minutu při 14 000 $\times$ g. Pro odstranění veškerého zbylého pufru byly stočeny po dobu 3 minut při 14 000 $\times$ g. Kolonky pak byly přeneseny do čistých, sterilních 1,5 ml mikrozkušavek, na filtr kolonky bylo nanášeno 50 μ l Nuclease-Free Water a vše bylo inkubováno 1 minutu při pokojové teplotě. Poté byly zkumavky centrifugovány 1 minutu při 14 000 $\times$ g.

3.3.4 Klonování

Přečištěné PCR produkty byly klonovány pomocí komerční sestavy pGEM®-T Vector System (Promega). Ligační reakce probíhala v objemu 10 µl a obsahovala 5 µl 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µl pGEM-T Vector, 3 µl PCR produktu a 1 µl T4 DNA Ligase. Směs byla inkubována 1 hodinu v laboratorní teplotě. Poté byly 2 µl každé ligační reakce přeneseny do sterilních 1,5 ml zkumavek na led, načež bylo přidáno 50 µl kompetentních buněk JM109. Inkubace na ledu trvala 20 minut, následovala inkubace ve vodní lázni po 1 minutu při teplotě 42 °C, a nakonec opět na ledu 2 minuty. Po tepelném šoku bylo ke každému vzorku přidáno 950 µl SOC média a vzorky byly inkubovány 1,5 hodiny při teplotě 37 °C a třepány 200 rpm. Poté bylo 100 µl naočkováno na agaróзовé LB/ampicilin/IPTG/X-Gal misky, které byly inkubovány při 37 °C přes noc.

Z vyrostlých kolonií byly vybrány pouze bílé kolonie a pomocí sterilního párátko byly přeneseny do 25 µl PCR reakce. Polymerázová řetězová reakce obsahovala 2,5 µl 10X Ex Taq buffer (TaKaRa), 1,25 µl dNTP mix (10 mM, každý), 1 µl forward primer (10 µM), 1 µl reverse primer (10 µM), 0,125 µl Takara Ex Taq (5 units/µl), 19,125 µl H₂O. Jako forward primer byl použit pUC-M13F-GTTTTCCAGTCACGAC a jako reverse primer pUC-M13R-CACAGGAAACAGCTATGAC. PCR reakce byla provedena v cycleru za amplifikačních podmínek dle tabulky 5.

Tabulka 5: PCR podmínky pro přípravu standardu pro qPCR.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	5 min	1
denaturace	95	1 min	35
nasedání primerů	54	50 s	
prodlužování	72	90 s	
závěrečné prodlužování	72	5 min	1

Po ukončení reakce byly vzorky nanесeny na 1% agarózový gel, kde byla zkontrolována velikost fragmentů. Produkty správné velikosti byly přeneseny do 96jamkové destičky a odeslány do Macroген Europe (Amsterdam, Nizozemsko), kde byly osekvenovány a ověřeny.

3.3.5 Izolace plazmidu

Ověřené klony byly přeočkovány do sterilního tekutého LB média s přidavkem ampicilinu o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a inkubovány přes noc při 37°C za stálého třepání 200 rpm. Poté byly vzorky stočeny v centrifuze $6\,000 \times g$, 15 min a bylo odlito médium. Z buněk byl následně izolován plazmid pomocí komerční sady Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification Systém (Promega).

K peletě buněk bylo přidáno 250 μl Cell Resuspension Solution a směs byla důkladně promíchána. Poté bylo přidáno 10 μl Alkaline Protease Solution a vzorek byl opět promíchán. Následovala inkubace 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 350 μl Neutralization Solution. Poté byly směsi stočeny v centrifuze 10 minut při $14\,000 \times g$. Čistý lyzát byl převeden na kolonky Spin Column a stočen $14\,000 \times g$ po 1 minutu. Poté byly kolonky promyty 750 μl Wash Solution a 250 μl Wash Solution a centrifugovány 1 minutu při $14\,000 \times g$. Pro odstranění zbytkového ethanolu proběhla centrifugace po dobu 2 minut při $14\,000 \times g$. Nakonec byly kolonky přeneseny do čistých 1,5 ml zkumavek a na filtr bylo nanесeno 100 μl sterilní destilované vody. Vzorky byly stočeny 1 minutu při $14\,000 \times g$. Kvalita a výtěžnost byla kontrolována na elektroforéze a ve spektrofotometru (Nanodrop).

3.3.6 Linearizace plazmidu

Restrikční štěpení cirkulární formy plazmidu probíhalo enzymem Sac I (New England Biolabs) podle pokynů výrobce. K 1 μg izolovaného plazmidu bylo přidáno 5 μl 10X NEBuffer, 1 μl restrikčního enzymu SacI a reakční objem byl doplněn do 50 μl sterilní destilovanou vodou. Vzorky byly důkladně promíchány a inkubovány 90 minut při 37°C v termobloku. Před ukončením štěpení byl na elektroforézový gel nanесen 1 μl vzorku. Pokud byl vzorek na gelu jasně ohraničen, mohlo být štěpení ukončeno zahřátím vzorků na 65°C po dobu 20 minut. Poté byly vzorky přečištěny komerční sadou Expin Combo GP (GeneAll). Kvalita a výtěžnost byly kontrolovány na elektroforéze a měřeny na Nanodropu. Výsledkem výše uvedeného postupu byly 3 rekombinantní plazmidy, jež byly dále použity jako standard pro kvantifikaci *M. plutonius* metodou kvantitativní PCR a k porovnání tří sad primerů: (a) standard_Melisso pro primery MelissoF a MelissoR; (b) standard_MP pro primery MP-a MP-R; (c) Standard_JH pro primery JHF1 a JHR1.

3.3.7 Kvantitativní PCR

K porovnání byly použity tři sady primerů. Pro všechny kombinace primerů probíhala amplifikační reakce v objemu 20 µl a obsahovala 10 µl Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs), 1 µl forward primer (10µM), 1 µl reverse primer (10µM), 2 µl templátové DNA a 6 µl H₂O.

Do každé jamky v 96jamkové destičce určené pro kvantitativní PCR bylo přidáno 18 µl master mixu a samostatně byla pipetována DNA (2 µl), kterou v jedné části tvořily vyšetřované vzorky, v druhé části standard o definované koncentraci cílové sekvence a jako negativní kontrola byla pipetována pouze voda. Standardní řada byla připravena 10násobným ředěním rekombinantních plazmidů (standard_Melisso, standard_MP, standard_JH) s koncentrací v rozmezí 1E+08 až 1E+02 kopií genu na vzorek.

Následně proběhla PCR reakce a průběžně byla měřena amplifikace a kvantifikace množství cílové sekvence pomocí barviva SYBR Green. Reakce proběhla v termocykleru Applied Biosystems StepOnePlus za podmínek dle tabulky 6.

Tabulka 6: Podmínky pro průběh kvantitativní qPCR pro detekci M. plutonius.

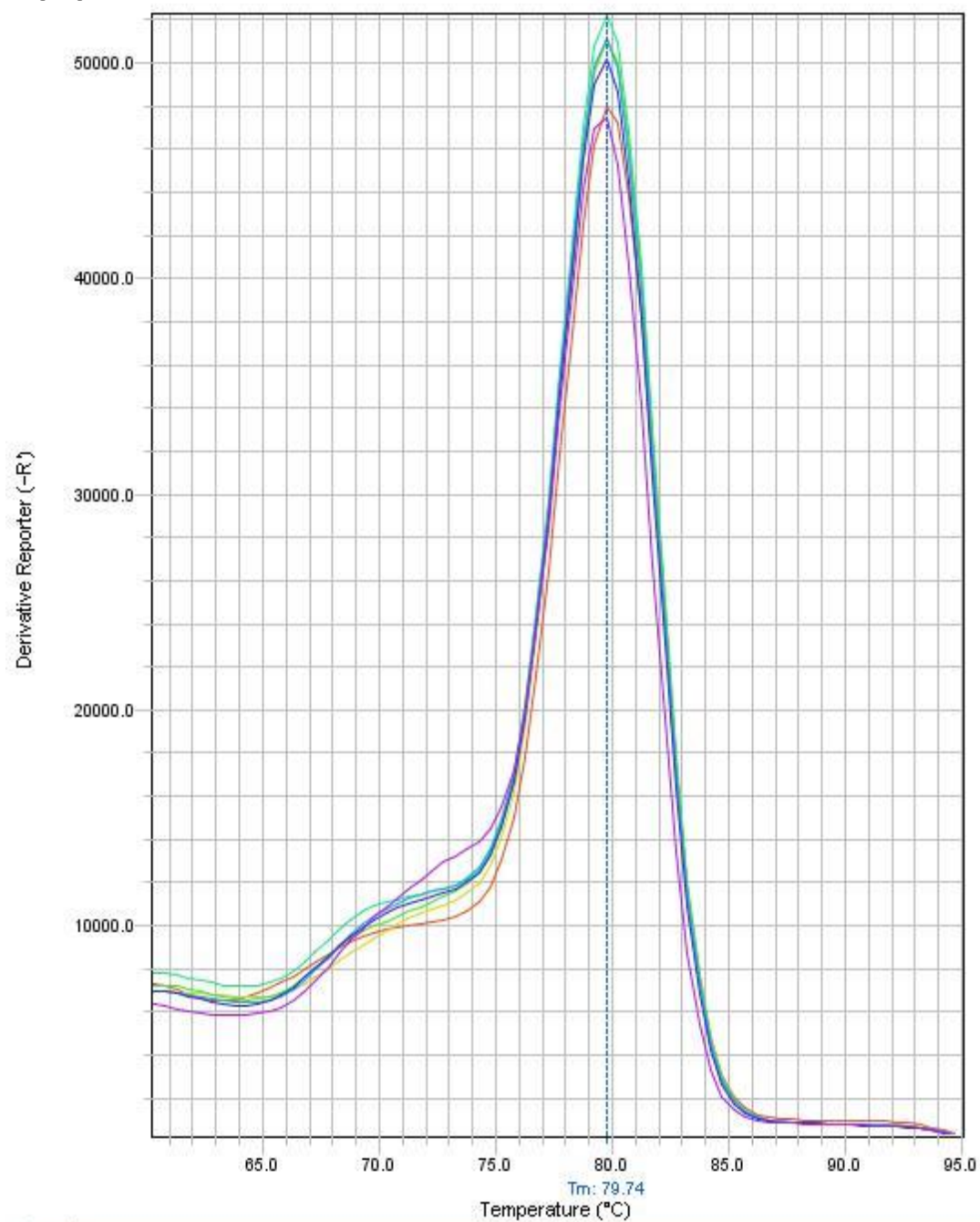
Krok	Teplota °C	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	1 min	1
denaturace	95	15 s	40
nasedání primerů a prodlužování	60	30 s (čtení fluorescenčního signálu)	
křivka tání	60–95		1

Na konci běhu proběhla analýza křivky tání s následujícím teplotním profilem: 15 sekund 95 °C, 30 sekund 60 °C a 15 sekund 95 °C, čtení fluorescenčního signálu probíhá každých +0,5 °C. Tento postup umožnil odlišit bakterie druhu *M. plutonius* od bakterií jiných druhů (graf 1).

Graf 1: Křivky tání pro tři sady primerů: (a) standard_Melisso pro primery MelissoF a MelissoR; (b) standard_MP pro primery MP-a MP-R; (c) Standard_JH pro primery JHF1 a JHR1.

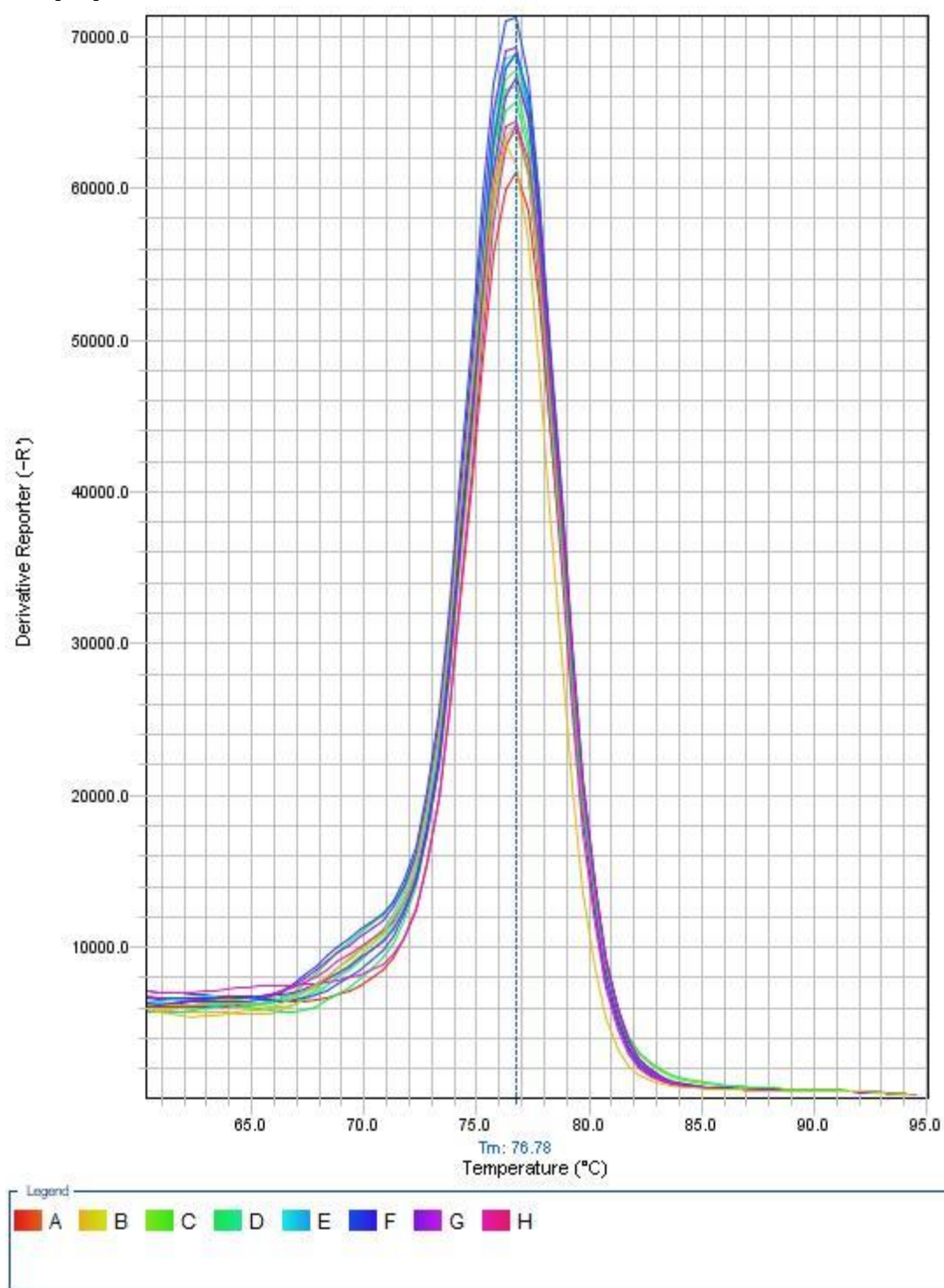
(a)

Melt Curve



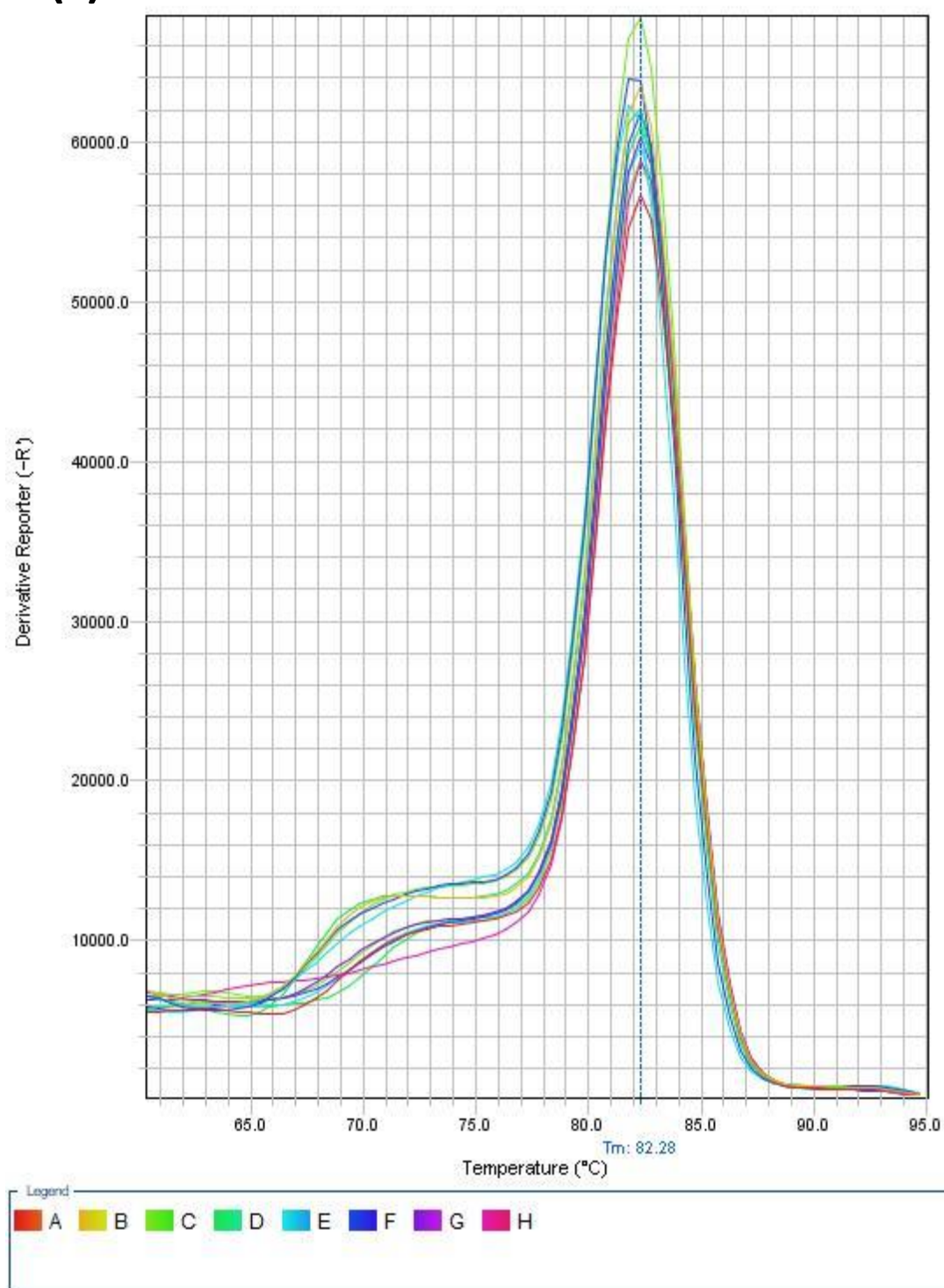
(b)

Melt Curve



(c)

Melt Curve

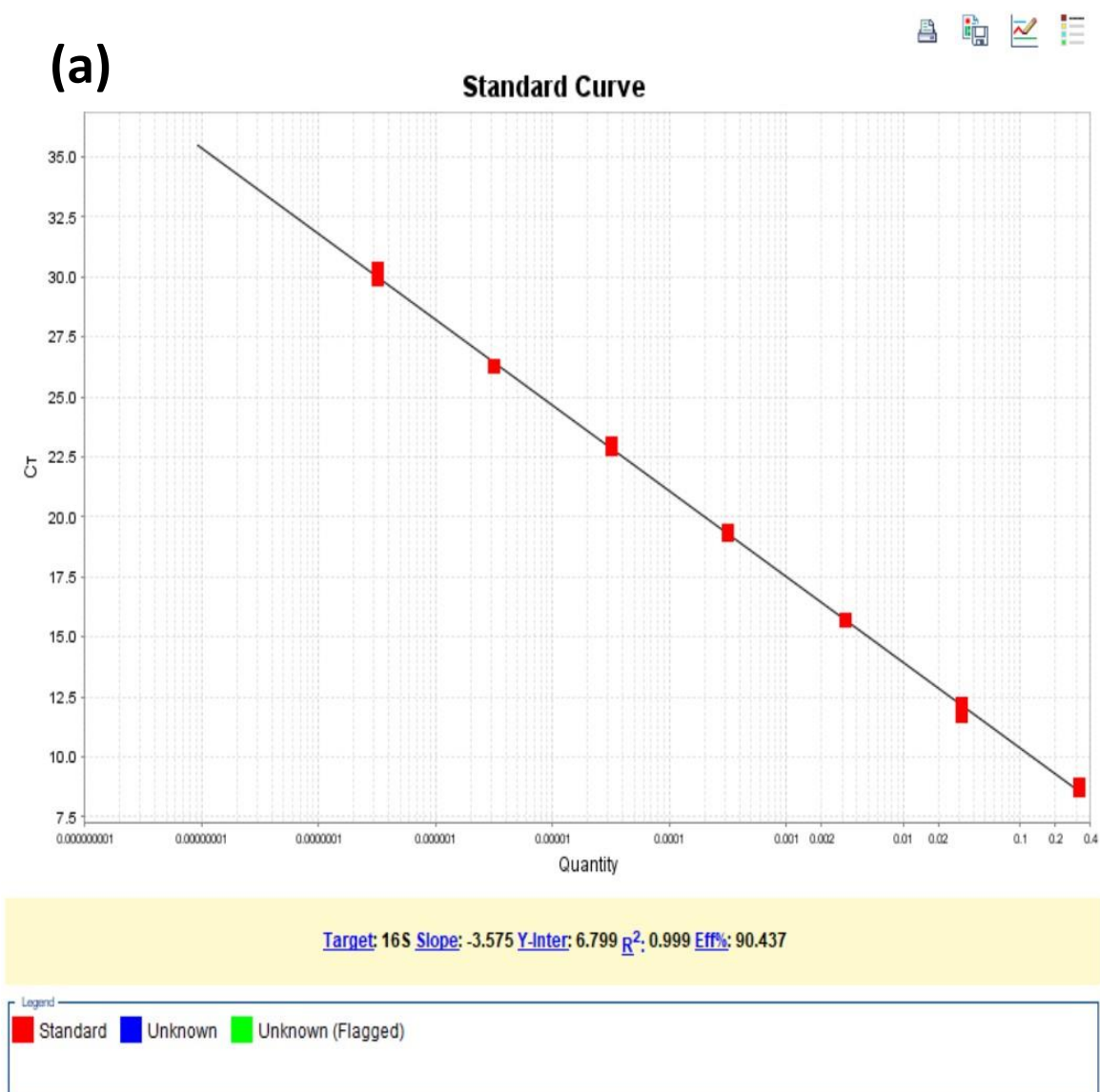


3.3.8 Kvantitativní PCR – analýza dat

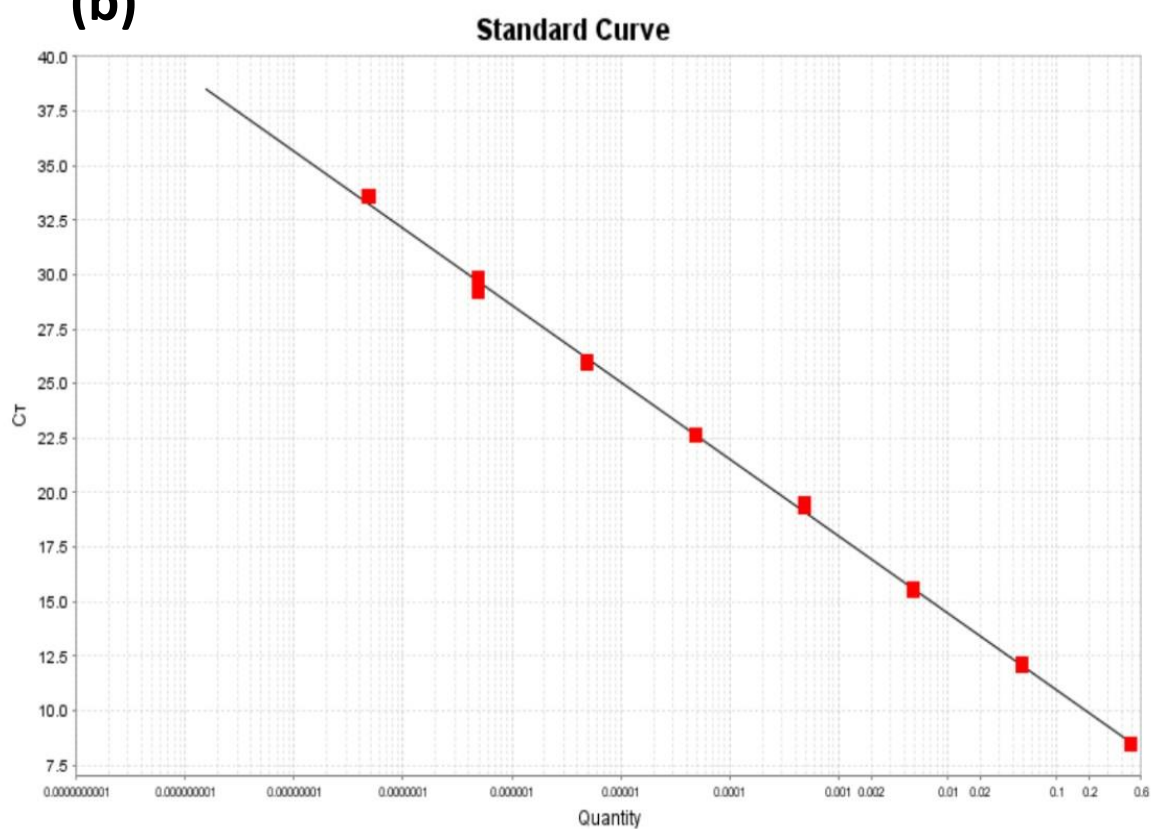
Data byla upravena v programu StepOne Software v. 2.2.2, kde byla zkontrolována standardní křivka, křivka tání a amplifikační graf. Ze sklonu standardní křivky lze kalkulovat účinnost reakce, která byla větší než 90 %. Linearita (R^2) standardní křivky měla hodnoty větší než 0,995 (graf 2). Analýzou křivky tání byla kontrolována cílová specifita (teplota tání by měla být pro standardy a vzorky zhruba stejná). Při analýze amplifikačního grafu byl stanoven prahový cyklus (C_t), tedy cyklus, v němž úroveň fluorescence překročí práh pozadí. Při pozitivním výsledku (hodnota C_t větší než 8 a menší než 35) byla pomocí lineární regrese závislosti hodnoty C_t na koncentraci standardu vypočítána výchozí koncentrace počtu kopií genu bakterie *M. plutonius* ve vyšetřovaném vzorku. Každý vzorek byl změřen ve dvou technických opakováních, ze kterých byl vypočten aritmetický průměr. Výsledná hodnota uvádí počet kopií genu bakterie *M. plutonius* ve vzorku (tabulka 7).

Z tabulky 7 jsou patrné detekční limity: 10^3 *M. plutonius*/vzorek pro primery MPF a MPR, 10^4 *M. plutonius*/vzorek pro primery JHF1 a JHR1, a 10^5 *M. plutonius*/vzorek pro primery MelissoF a MelissoR. Pro všechny primery platí, že s rostoucím počtem dodaných bakterií lineárně roste jejich záchyt pomocí qPCR. Jestliže porovnáme účinnost detekce, vyšší determinační koeficient poskytuje detekce s primery JH, kde $R^2 = 0,99$, pro MP primery $R^2 = 0,96$, viz graf 3. Detekce pomocí primerů JH je pro vyšší počty bakterií spolehlivější než pomocí primerů MP.

Graf 2: Standardní křivka pro tři sady primerů: **(a)** standard_Melisso pro primery MelissoF a MelissoR; **(b)** standard_MP pro primery MP-a MP-R; **(c)** Standard_JH pro primery JHF1 a JHR1.



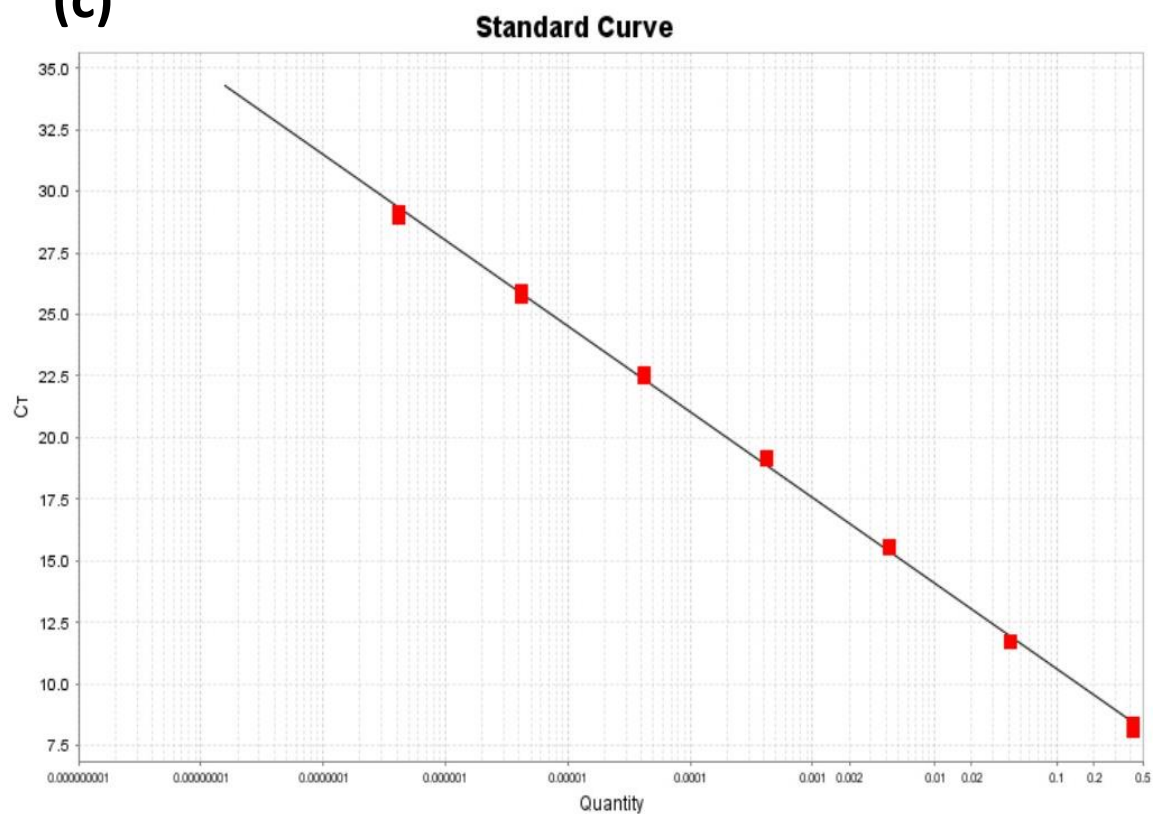
(b)



Target: 16S Slope: -3.526 Y-Inter: 7.452 R^2 : 0.999 Eff%: 92.139



(c)



Target: 16 S Slope: -3.484 Y-Inter: 7.106 R²: 0.999 Eff%: 93.658

Legend

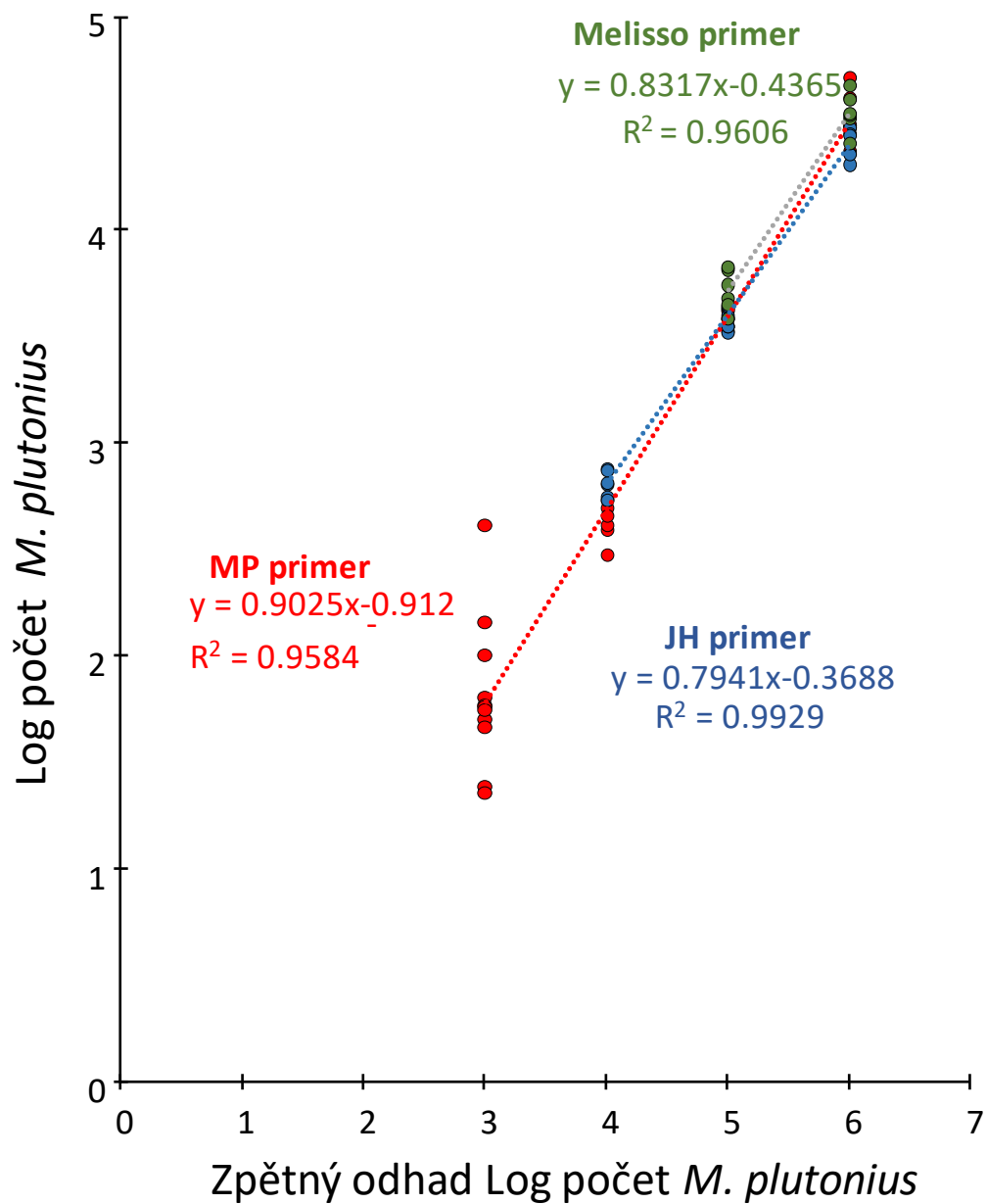
Standard Unknown Unknown (Flagged)

Tabulka 7: Zpětný odhad počtu bakterií ve vzorcích dělnic včely medonosné, které obsahovaly známý počet bakterií. Zpětný odhad byl vytvořen pomocí qPCR využívající kombinace primerů MPF a MPR, JHF1 a JHR1, MelissoF a MelissoR.

Vzorek	CFU	PCR_EFB	qPCR_MP	qPCR_JH1	qPCR_Melisso
1	0	-	0	0	324
2	0	-	0	0	319
3	0	-	0	0	260
4	0	-	0	0	364
5	0	-	0	0	348
6	0	-	0	0	1376
7	100	-	0	0	360
8	100	-	0	0	483
9	100	-	0	0	302
10	100	-	35	0	468
11	100	-	0	0	593
12	100	-	30	0	435
13	1000	-	65	0	569
14	1000	-	51	0	81
15	1000	-	0	0	159
16	1000	-	414	0	96
17	1000	-	101	0	267
18	1000	-	146	0	128
19	1000	-	47	0	290
20	1000	-	24	0	813
21	1000	-	60	0	974
22	1000	-	23	0	1123
23	1000	-	58	0	2098
24	1000	-	56	0	17721
25	10 000	-	504	642	1141
26	10 000	-	548	663	1851
27	10 000	-	397	769	1185
28	10 000	-	302	566	991
29	10 000	-	419	549	1181
30	10 000	-	461	750	19055
31	100 000	+	4316	4037	5600
32	100 000	+	3418	3356	3931
33	100 000	+	3913	4385	6547
34	100 000	+	3608	3615	6777
35	100 000	+	3886	4477	4884
36	100 000	+	4219	3600	4516
37	1 000 000	+	23419	23143	25666
38	1 000 000	+	31545	30180	41412
39	1 000 000	+	30584	28248	33743
40	1 000 000	+	52122	27921	47945
41	1 000 000	+	41906	20676	34451
42	1 000 000	+	31209	22685	35579

Legenda: CFU – počet bakterií ve vzorku, - absence, + prezence *M. plutonius* ve vzorku (stanoveno pomocí konvenčního PCR a primerů EFB (Govan a kol. 1998).

Graf 3: Porovnání qPCR detekce *Melisococcus plutonius* v dělnicích včely medonosné s různými sadami detekčních primerů. Obrázek ukazuje lineární regrese mezi počtem dodaných a detekovaných bakterií.



4 Závěr

- Pomocí qPCR lze s uvedenými detekčními primery spolehlivě kvantifikovat původce včelí hniloby *M. plutonius* ve vzorcích dělnic včely medonosné.
- Nejnižší detekční limit byl stanoven na 10^3 bakterií *M. plutonius* na vzorek pro primery MPF a MPR, 10^4 *M. plutonius*/vzorek pro primery JHF1 a JHR1 a 10^5 *M. plutonius*/vzorek pro primery MelissoF a MelissoR.
- Pomocí primerů MP lze odhadnout počet *M. plutonius* dle rovnice $y = 0,9025x - 0,912$, pomocí primerů JH je rovnice $y = 0,7941x - 0,3688$.
- Vyšší determinační koeficient poskytuje detekce s primery JH, kde $R^2 = 0,99$, pro MP primery $R^2 = 0,96$, detekce pomocí primerů JH je spolehlivější než MP pro vyšší počty bakterií.

5 Prohlášení o poskytovateli dotace a o projektu, v rámci kterého metodika vznikla

Certifikovaná metodika *Využití kvantitativní polymerázové řetězové reakce ve včasné diagnostice hniloby včelího plodu* vznikla za podpory projektu Technologické agentury ČR TH02030317: **Vývoj nástrojů a pomůcek pro včasnou detekci hniloby včelího plodu.**

6 Novost metodiky

Postup je určen pro detekci a kvantifikaci bakterie *Melisococcus plutonius* v dělnicích včely medonosné, které jsou vektorem *M. plutonius* způsobujícího hnilobu včelího plodu. Tato metodika přináší přesný postup pro přípravu a provedení qPCR detekující *M. plutonius*, a to včetně příprav standardů. Metodika porovnává účinnost 3 detekčních primerů v detekci původce hniloby včelího plodu, včetně nově navržených primerů JHF1 5'-AGGAACAATTCAATGCAGCTGCAG-3' a JHR1 5'-ATTAGTGGTGAATCTTGGTTGGC-3'. Námi navržené postupy přináší nižší detekční limity než konvenční PCR a vyznačují se také vysokou senzitivitou a specifitou detekce *M. plutonius*.

7 Uplatnění a zhodnocení metodiky

7.1 Uplatnění metodiky

Metodika je určena laboratořím věnujícím se problematice a diagnostice nemocí včely medonosné. Zároveň je určena pracovníkům Státní veterinární správy (SVS), zejména inspektorům Krajské veterinární správy (KVS) zabývajícím se nákazami včel. Metodika kromě samotného zpracování vzorků v laboratoři a kvantitativní PCR diagnostiky popisuje také postup vzorkování dělnic ze včelstev. Je určena též pro kvalifikované prohlázele včelstev podle Veterinárního zákona a v neposlední řadě najde uplatnění pro vzdělávání jak včelařské veřejnosti, tak i pro trénink a praxi v laboratorních podmínkách.

7.2 Ekonomické zhodnocení

Ekonomické zhodnocení bylo stanoveno pomocí kalkulace jednotlivých složek nákladů (přímé, nepřímé náklady). Metoda kalkulace ceny jednoho vzorku pak byla stanovena prostým dělením celkových nákladů množstvím zpracovaných vzorků. Výsledná cena analýzy jednoho vzorku tak byla stanovena na 1 900,- Kč, což stojí stejně jako například stanovení COVID-19 pomocí qPCR.

8 Seznam použité literatury

- Alippi A. M. 1991. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research* 30 (2): 75–80. <https://doi.org/10.1080/00218839.1991.11101237>
- Allen M. F., Ball B. V. 1993. The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research* 32 (2): 80–88. <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101291>
- Arai R., Tominaga K., Wu M., Okura M., Ito K., Okamura N., Onishi H., Osaki M., Sugimura Y., Yoshiyama M., Takamatsu D. 2012. Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS One* 7 (3): e33708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033708>
- Bailey L. 1956. Aetiology of European foulbrood; a disease of the larval honey-bee. *Nature* 178 (4542): 1130–1130. <https://doi.org/10.1038/1781130a0>
- Bailey L. 1957a. European foul brood: a disease of the larval honeybee (*Apis mellifera* L.) caused by a combination of *Streptococcus pluton* (*Bacillus pluton* White) and *Bacterium eurydice* White. *Nature* 180 (4596): 1214–1215. <https://doi.org/10.1038/1801214a0>
- Bailey L. 1957b. The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*. *Journal of General Microbiology* 17 (1): 39–48. <https://doi.org/10.1099/00221287-17-1-39>
- Bailey L. 1959. An improved method for the isolation of *Streptococcus pluton*, and observations on its distribution and ecology. *Journal of Insect Pathology* 1 (1): 80–85.
- Bailey L. 1960. The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Journal of Insect Pathology* 2 (2): 67–83.
- Bailey L. 1961. European foulbrood. *American Bee Journal* 101 (3): 89–92.
- Bailey L. 1963. The pathogenicity for honey-bee larvae of microorganisms associated with European foulbrood. *Journal of Insect Pathology* 5 (2): 198–205.
- Bailey L. 1974. An unusual type of *Streptococcus pluton* from the eastern hive bee. *Journal of Invertebrate Pathology* 23 (2): 246–247. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(74\)90192-x](https://doi.org/10.1016/0022-2011(74)90192-x)
- Bailey L. 1984. A strain of *Melissococcus pluton* cultivable on chemically defined media. *FEMS Microbiology Letters* 25 (2–3): 139–141. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01443.x>
- Bailey L., Collins M. D. 1982a. Reclassification of ‘*Streptococcus pluton*’ (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *Journal of Applied Bacteriology* 53 (2): 215–217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1982.tb04679.x>
- Bailey L., Collins M. D. 1982b. Taxonomic studies on ‘*Streptococcus pluton*’. *Journal of Applied Bacteriology* 53 (2): 209–213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1982.tb04678.x>
- Bailey L., Gibbs A. J. 1962. Cultural characters of *Streptococcus pluton* and its differentiation from associated enterococci. *Journal of General Microbiology* 28 (3): 385–391. <https://doi.org/10.1099/00221287-28-3-385>

- Bailey L., Locher N. 1968. Experiments on the etiology of European foul brood of the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 7 (2): 103–107.
<https://doi.org/10.1080/00218839.1968.11100197>
- Belloy L., Imdorf A., Fries I., Forsgren E., Berthoud H., Kuhn R., Charrière J.-D. 2007. Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie* 38 (2): 136–140. <https://doi.org/10.1051/apido:2006069>
- Budge G. E., Barrett B., Jones B., Pietravalle S., Marris G., Chantawannakul P., Thwaites R., Hall J., Cuthbertson A. G. S., Brown M. A. 2010. The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *Journal of Invertebrate Pathology* 105 (2): 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.06.004>
- Budge G. E., Shirley M. D. F., Jones B., Quill E., Tomkies V., Feil E. J., Brown M. A., Haynes E. G. 2014. Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. *ISME Journal* 8 (8): 1588–1597. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.20>
- Cai J., Collins M. D. 1994. Evidence for a close phylogenetic relationship between *Melissococcus pluton*, the causative agent of European foulbrood disease, and the genus *Enterococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (2): 365–367. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-365>
- Dainat B., Grossar D., Ecoffey B., Haldemann C. 2018. Triplex real-time PCR method for the qualitative detection of European and American foulbrood in honeybee. *Journal of Microbiological Methods* 146: 61–63.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.01.018>
- Djordjevic S. P., Noone K., Smith L., Hornitzky M. A. Z. 1998. Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research* 37 (3): 165–174.
<https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100968>
- Djordjevic S. P., Smith L. A., Forbes W. A., Hornitzky M. A. 1999. Geographically diverse Australian isolates of *Melissococcus pluton* exhibit minimal genotypic diversity by restriction endonuclease analysis. *FEMS Microbiology Letters* 173 (2): 311–318. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13519.x>
- Dorn-In S., Bassitta R., Schwaiger K., Bauer J., Hölzel C. S. 2015. Specific amplification of bacterial DNA by optimized so-called universal bacterial primers in samples rich of plant DNA. *Journal of Microbiological Methods* 113:50–56.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.04.001>
- Erban T., Hubert J., Hortová B., Nesvorná M., Kamler M., Tyl J., Titěra D. 2017a. *Využití kombinace laboratorních metod pro včasnou diagnostiku hniloby včelího plodu (původce Melissococcus plutonius): certifikovaná metodika*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha a Výzkumný ústav včelařský, Dol.
<https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN%20978-80-7427-212-7.pdf>
- Erban T., Ledvinka O., Kamler M., Hortova B., Nesvorna M., Tyl J., Titera D., Markovic M., Hubert J. 2017b. Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. *PeerJ* 5: e3816.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3816>
- Erler S., Lewkowski O., Poehlein A., Forsgren E. 2018. The curious case of *Achromobacter eurydice*, a Gram-variable pleomorphic bacterium associated with European foulbrood disease in honeybees. *Microbial Ecology* 75 (1): 1–6.
<https://doi.org/10.1007/s00248-017-1007-x>
- Forsgren E. 2009. *Molecular Diagnosis and Characterization of Honey Bee*

- Pathogens: Doctoral Thesis*. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Ecology, Uppsala. https://pub.epsilon.slu.se/2155/2/forsgren_e_091109.pdf
- Forsgren E. 2010. European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (Supplement 1): S5–S9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>
- Forsgren E., Budge G. E., Charrière J.-D., Hornitzky M. A. Z. 2013. Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* 52 (1): 52.1.12. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.12>
- Forsgren E., Locke B., Sircoulomb F., Schäfer M. O. 2018. Bacterial diseases in honeybees. *Current Clinical Microbiology Reports* 5 (1): 18–25. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0083-0>
- Gaggia F., Baffoni L., Stenico V., Alberoni D., Buglione E., Lilli A., Di Gioia D., Porrini C. 2015. Microbial investigation on honey bee larvae showing atypical symptoms of European foulbrood. *Bulletin of Insectology* 68 (2): 321–327.
- Garrido-Bailón E., Higes M., Martínez-Salvador A., Antúnez K., Botías C., Meana A., Prieto L., Martín-Hernández R. 2013. The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microbial Biotechnology* 6 (6): 731–739. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12070>
- Govan V. A., Brözel V., Allsopp M. H., Davison S. 1998. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (5): 1983–1985. <https://doi.org/10.1128/aem.64.5.1983-1985.1998>
- Grangier V., Belloy L., Charrière J.-D., Doherr M. G., Fritsche A., Waldvogel A. S. 2016. Real-time PCR as a decision aid in the control of European foulbrood. *Journal of Apicultural Research* 54 (4): 366–372. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1169650>
- Haynes E., Helgason T., Young J. P. W., Thwaites R., Budge G. E. 2013. A typing scheme for the honeybee pathogen *Melissococcus plutonius* allows detection of disease transmission events and a study of the distribution of variants. *Environmental Microbiology Reports* 5 (4): 525–529. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12057>
- Hornitzky M. A. Z., Smith L. A. 1998. Procedures for the culture of *Melissococcus pluton* from diseased brood and bulk honey samples. *Journal of Apicultural Research* 37 (4): 293–294. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100987>
- Hornitzky M. A. Z., Wilson S. C. 1989. A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees. *Journal of Apicultural Research* 28 (4): 191–195. <https://doi.org/10.1080/00218839.1989.11101183>
- Chen Y. P., Higgins J. A., Feldlaufer M. F. 2005. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1): 436–441. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.436-441.2005>
- McKee B. 2003. Prevention of residues in honey: a future perspective. *Apiacta* 38 (2): 173–177.
- McKee B. A., Djordjevic S. P., Goodman R. D., Hornitzky M. A. 2003. The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie* 34 (1): 19–27. <https://doi.org/10.1051/apido:2002047>
- McKee B. A., Goodman R. D., Hornitzky M. A. 2004. The transmission of European

- foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 43 (3): 93–100.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101117>
- MZe ČR. 2018. § 12 Vyhlášky 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. In: *Sbírka zákonů České republiky, částka 12*, 31. ledna 2018. Ministerstvo zemědělství ČR (MZe ČR), Praha, str. 253–260. <http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/ViewFile.aspx?type=z&id=62812>
- OIE. 2008. European foulbrood of honey bees. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds, and Bees*. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, pp. 405–409.
http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.02.03_EUROPEAN_FOULB.pdf
- OIE. 2016. European foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Melissococcus plutonius*). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016*. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.03_EUROPEAN_FOULBROOD.pdf
- Pinnock D. E., Featherstone N. E. 1984. Detection and quantification of *Melissococcus pluton* infection in honeybee colonies by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Apicultural Research* 23 (3): 168–170.
<https://doi.org/10.1080/00218839.1984.11100627>
- Roetschi A., Berthoud H., Kuhn R., Imdorf A. 2008. Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie* 39:362–371. <https://doi.org/10.1051/apido:200819>
- Saleh M., Soliman H., Sørum H., Fauske A. K., El-Matbouli M. 2012. A novel gold nanoparticles-based assay for rapid detection of *Melissococcus plutonius*, the causative agent of European foulbrood. *Veterinary Record* 171 (16): 400–400.
<https://doi.org/10.1136/vr.101040>
- Sopko B., Zitek J., Nesvorna M., Markovic M., Kamler M., Titera D., Erban T., Hubert J. 2020. Detection and quantification of *Melissococcus plutonius* in honey bee workers exposed to European foulbrood in Czechia through conventional PCR, qPCR, and barcode sequencing. *Journal of Apicultural Research* 59 (4): 503–514. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1685148>
- Takamatsu D. 2012. Going for gold in the detection of honeybee pathogens. *Veterinary Record* 171 (16): 397–398. <https://doi.org/10.1136/vr.e6762>
- Takamatsu D., Okura M., Yoshiyama M., Wu M., Arai R., Morinaga Y. 2012. Detection of atypical *Melissococcus plutonius* in honeybees. *Veterinary Record* 171 (24): 630–630. <https://doi.org/10.1136/vr.e8457>
- Takamatsu D., Sato M., Yoshiyama M. 2016. Infection of *Melissococcus plutonius* clonal complex 12 strain in European honeybee larvae is essentially confined to the digestive tract. *Journal of Veterinary Medical Science* 78 (1): 29–34.
<https://doi.org/10.1292/jvms.15-0405>
- Tarr H. L. A. 1938. Studies on European foul brood of bees: IV. On the attempted cultivation of *Bacillus pluton*, the susceptibility of individual larvae to inoculation with this organism and its localization within its host. *Annals of Applied Biology* 25 (4): 815–821. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1938.tb02356.x>

- Titěra D., Jeřábková V., Nesvorná M., Hubert J. 2019. *Sada oligonukleotidových sekvencí a rekombinantní plazmid pro detekci bakterií druhu Melisococcus plutonius: užitečný vzor číslo 33447*. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- Tomkies V., Flint J., Johnson G., Waite R., Wilkins S., Danks C., Watkins M., Cuthbertson A. G. S., Carpana E., Marris G., Budge G., Brown M. A. 2009. Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. *Apidologie* 40 (1): 63–72. <https://doi.org/10.1051/apido:2008060>
- Trüper H. G., de' Clari L. 1998. Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition'. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 (2): 615–615. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-615>
- Waite R., Thompson H., Brown M., Watkins M., Bew M. 2003a. Preliminary studies into novel detection methods for honeybee pathogens. In: *Apiacta: XXXVIII Congress APIMONDIA*. Apimondia, Ljubljana.
- Waite R. J., Brown M. A., Thompson H., Bew M. H. 2003b. Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK. *Apidologie* 34 (6): 569–575. <https://doi.org/10.1051/apido:2003052>
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173 (2): 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- White G. F. 1912. *The Cause of European Foul Brood: Circular No. 157*. U. S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology & Government Printing Office, Washington, DC, USA. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.63494>

9 Publikace, které předcházely metodice

- Erban T., Bodrinová M., Zítek J., Sopko B., Bazgerová E., Látal T., Jeřábková V., Titěra D. 2019. *Kultivační médium pro bakterii Melissococcus plutonius: užitný vzor číslo 32749*. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- 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 Melissococcus plutonius): certifikovaná metodika*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha a Výzkumný ústav včelařský, Dol. <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN%20978-80-7427-212-7.pdf>
- Erban T., Ledvinka O., Kamler M., Hortova B., Nesvorna M., Tyl J., Titera D., Markovic M., Hubert J. 2017. Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. *PeerJ* 5: e3816. <https://doi.org/10.7717/peerj.3816>
- Kamler M., Tyl J., Hubert J., Nesvorná M., Vaníčková A., Merta J., Titěra D. 2015. Case report of European foulbrood in the Czech Republic: a new outbreak after 40 years. In: *11th Coloss Conference: 'Current Threats & Future Beekeeping'*, 21–23th October 2015, Lukovica, Slovenia, pp. 29–29.
- 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.
- Kamler M., Tyl J., Titěra D., Hubert J., Nesvorná M., Vaníčková A., Merta J. 2015. Hniloba včelího plodu po mnoha letech opět aktuální. *Včelařství* 68 (10): 352–353.
- Sopko B., Zitek J., Nesvorna M., Markovic M., Kamler M., Titera D., Erban T., Hubert J. 2020. Detection and quantification of *Melissococcus plutonius* in honey bee workers exposed to European foulbrood in Czechia through conventional PCR, qPCR, and barcode sequencing. *Journal of Apicultural Research* 59 (4): 503–514. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1685148>
- Titěra D., Jeřábková V., Nesvorná M., Hubert J. 2019. Sada oligonukleotidových sekvencí a rekombinantní plazmid pro detekci bakterií druhu *Melissococcus plutonius*: užitný vzor číslo 33447. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.
- Tyl J., Titěra D., Karešová B., Merta J. 2016. Hniloba včelího plodu po 40 letech. *Včelařství* 69 (5): 158–159.