

Jaroslav Hrabák a kol.

**METODIKA PRO DETEKCI  
*PAENIBACILLUS LARVAE* A  
*MELISSOCOCCUS PLUTONIUS*  
POMOCÍ PCR V REÁLNÉM ČASE**

**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**



Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni

2022

# METODIKA PRO DETEKCI *PAENIBACILLUS* *LARVAE* A *MELISSOCOCCUS PLUTONIUS* POMOCÍ PCR V REÁLNÉM ČASE

## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Jaroslav Hrabák<sup>1@</sup>, Kateřina Vlková<sup>1</sup>, Tomáš Erban<sup>2</sup>, Dalibor Titěra<sup>3</sup>, Martin Kamler<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni, alej Svobody 76, 323 00 Plzeň

<sup>2</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6–Ruzyně

<sup>3</sup>Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol 94, 252 66 Măslovice

@Prof. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D., Jaroslav.Hrabak@lfp.cuni.cz



LÉKAŘSKÁ FAKULTA  
V PLZNI  
Univerzita Karlova



VÚRV  
Výzkumný ústav  
rostlinné výroby  
Poznatky pro udržitelné zemědělství



VÝZKUMNÝ ÚSTAV  
VČELAŘSKÝ

### Oponenti

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. – Veterinární univerzita Brno

MVDr. Leoš Čeleda, CSc. – Státní veterinární správa

### Vydal

Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni, Plzeň, 2022

ISBN:

### Financování

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QK1710228. Výsledek byl spolufinancován z projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – financovaného Evropskou unií – Next Generation EU.

### Určení pro využití v praxi

Metodika je určena laboratořím, které se zabývají diagnostikou nálezů včel. Detekce původců moru včelího plodu (*Paenibacillus larvae*) a hniloby včelího plodu (*Melissococcus plutonius*) je nezbytná pro prevenci šíření těchto nebezpečných onemocnění včely medonosné (*Apis mellifera*). Jedná se především o vyšetření včelstev v ochranných pásmech onemocnění, do nichž mohlo dojít k zavlečení původců z ohniska nákazy zalétáváním včel nebo loupeží. Druhou možností využití je potvrzení nákazy na základě detekovaných klinických příznaků ve včelstvu. Hlavním cílovým uživatelem v České republice jsou laboratoře vyšetřující nákazy zvířat pro Státní veterinární správu (SVS) (akreditované laboratoře) v případě podezření na onemocnění a vyšetřování v ochranných pásmech. Dalšími cílovými uživateli jsou laboratoře vyšetřující včelstva z důvodů preventivní surveillance na základě požadavku včelařů. Metoda PCR umožňuje rychlou a spolehlivou detekci *P. larvae* a *M. plutonius* z různých vzorků odebraných ze včelstva. Oproti klasickým mikrobiologickým technikám umožňuje poskytnout výsledek během několika hodin od přijetí vzorku do laboratoře. Tím lze zajistit, především v období intenzivní letové aktivity včel, včasnou intervenci u

včelstev s podezřením na výskyt zmíněných nákaz a zamezit rozšíření onemocnění na blízká stanoviště včelstev.

### **Certifikace**

Metodice bylo uděleno osvědčení Státní veterinární správy ČR č. SVS/2023/071973-G.

O uplatnění metodiky je uzavřena smlouva č. QK1710228/2 podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku.

Oponentní posudky vypracovali Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. (Veterinární univerzita Brno) a MVDr. Leoš Čeleda, CSc. (Státní veterinární správa).

### **Prohlášení**

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví. Tato metodika je zveřejněna jako Open Access s licencí Creative Commons Uveďte původ-Neužívejte komerčně-Nezpracovávejte 4.0 Mezinárodní (CC BY-NC-ND 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.cs>.

### **Poděkování**

Autoři děkují Daně Králové a Andree Pospěchové za technickou pomoc. Autorský tým děkuje také recenzentům metodiky za podnětné a cenné připomínky.

## Anotace

Mezi nejvýznamnější bakteriální infekce včely medonosné (*Apis mellifera*) patří mor včelího plodu (MVP) a hniloba včelího plodu (HVP). Obě infekce postihují plod včel a během několika měsíců až let, s ohledem na velikost infekční dávky nebo odolnosti včelstva, vedou ke kolapsu včelstva. Původcem moru včelího plodu je grampozitivní fakultativně anaerobní sporulující bakterie *Paenibacillus larvae*. Spory tohoto mikroba jsou vysoce infekční pro nejmladší včelí larvy. Díky své struktuře odolávají fyzikálně-chemickým vlivům, jakými mohou být vysušení, var, působení běžných dezinfekčních prostředků. *Melissococcus plutonius*, původce hniloby včelího plodu, je grampozitivní nesporulující kokus, vyžadující pro kultivaci mikroaerofilní až anaerobní podmínky. Surveillance pro efektivní kontrolu těchto onemocnění vyžaduje nastavení vhodných diagnostických postupů poskytujících rychlé a přesné výsledky. Oproti kultivačním technikám, které jsou běžně používány pro detekci *P. larvae* a *M. plutonius*, představují molekulárně-genetické testy založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) alternativu poskytující vysokou sensitivitu a specifitu. Cílem této metodiky je poskytnout postup pro současnou detekci obou patogenů pomocí PCR v reálném čase. Na základě znalostí sekvencí celého genomu *P. larvae* a *M. plutonius* byly navrženy cílové sekvence. Pro efektivní detekci *P. larvae* byla navržena inserční sekvence IS256, která se v genomu vyskytuje ve velkém množství kopií. Pro detekci *M. plutonius* byla navržena sekvence specifická pro plazmid pMP1 a následné ověření virulence sekvence genu toxinu ETX/Mtx2, který je u hostitelské buňky zodpovědný za tvorbu pórů membrány. Jako interní kontrola byla zvolena sekvence genu kódujícího proteinu mateří kašičky (Major Royall Jelly Protein 1) specifický pro hostitele *A. mellifera*. Navržená metodika poskytuje vysokou sensitivitu i specifitu pro oba patogeny. Zároveň umožňuje detekovat sekvenci DNA specifickou pro včelu medonosnou. Tato interní kontrola poskytuje možnost ověřit, zda daný vzorek skutečně pochází z úlového prostředí (např. u vzorků měli), zda došlo k efektivní izolaci DNA a zda efektivně proběhla vlastní PCR. Předkládaná metodika je tak vhodná pro rychlou a specifickou detekci významných patogenů včelího plodu, *P. larvae* a *M. plutonius*, původců moru včelího plodu, resp. hniloby včelího plodu.

**Klíčová slova:** mor včelího plodu, hniloba včelího plodu, real-time PCR, *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*

## Annotation

### **A method for detection of *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* by real-time PCR.**

American foulbrood (AFB) and European foulbrood (EFB) of a honey bee (*Apis mellifera*) represent the most important bacterial infections. Both infections affect the bee brood leading to the collapse of the colony within a few months to years, depending on the size of the infectious dose or colony resistance. The causative agent of American foulbrood is the Gram-positive facultatively anaerobic sporulating rod *Paenibacillus larvae*. The spores of this microbe are highly infectious to the youngest larvae but not to adult bees that can, however, serve as a vector. Due to their structure, they resist to several environmental conditions, such as drying, boiling, and to common disinfectants. *Melissococcus plutonius*, the causative agent of European foulbrood, is a Gram-positive non-sporulating coccus that requires microaerophilic to anaerobic conditions for cultivation. Surveillance for effective control of those diseases requires setting up appropriate diagnostic procedures providing fast and accurate results. Compared to the cultivation that are commonly used for the detection of *P. larvae* and *M. plutonius*, molecular genetic tests based on the polymerase chain reaction (PCR) represent a method with high sensitivity and specificity. The aim of this methodology is to provide a technique for the simultaneous detection of both pathogens using real-time PCR. Target sequences were designed based on the knowledge of whole genome sequences of *P. larvae* and *M. plutonius*. For sensitive detection of *P. larvae*, a multicopy insertion sequence IS256 was selected. For the detection of *M. plutonius*, a sequence specific for the plasmid pMP1 was proposed. For subsequent verification of the virulence, the ETX/Mtx2 toxin gene sequence responsible for the formation of membrane pores in the host cell was selected. The sequence of the gene encoding the Major Royall Jelly Protein 1 (MRJP1) specific to the host *A. mellifera* was chosen as an internal control. The proposed methodology provides highly sensitive and specific method for the detection of both pathogens. Simultaneously, detection of a DNA sequence specific to the honeybee provides efficient internal control for possible verification of the specimen origin (whether the given sample really comes from the beehive environment), DNA isolation and amplification. This methodology is therefore suitable for quick and specific detection of important bee brood pathogens, *P. larvae* and *M. plutonius*, the causative agents of American and European foulbrood respectively.

**Key words:** American foulbrood, European foulbrood, real-time PCR, *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*

## Obsah

1.	Cíl.....	1
2.	Úvod do problematiky bakteriálních onemocnění včelího plodu.....	1
3.	Mor včelího plodu .....	1
4.	Hniloba včelího plodu.....	2
5.	Vlastní popis metodiky .....	3
6.	Srovnání novosti metodiky .....	7
7.	Uplatnění metodiky .....	7
8.	Ekonomické zhodnocení metodiky .....	7
9.	Publikace, které předcházely metodice .....	8
10.	Seznam literatury .....	8
11.	Dedikace.....	10

## 1. Cíl

Cílem metodiky je poskytnout metodu pro simultánní průkaz *Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius* založené na principu amplifikace specifických úseků DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato metoda je použitelná pro rychlý a spolehlivý průkaz obou významných patogenů včely medonosné (*Apis mellifera*), pro potvrzení onemocnění moru respektive hniloby včelího plodu, případně pro potřeby surveillance. Amplifikace úseků DNA, které se vyskytují v genomu *P. larvae* a *M. plutonius* ve vysokém počtu kopií, umožňuje zvýšit sensitivitu metody bez ztráty její specificity. Cílem proto bylo navrhnout takové uspořádání, které umožní identifikovat včelstva s potenciálním výskytem obou patogenů. Pokud je metoda použita pro potvrzení onemocnění ve včelstvech s typickými klinickými příznaky, lze, ve srovnání s kultivačními technikami, významně zkrátit dobu pro zahájení intervence a tím i minimalizovat riziko šíření obou patogenů v období vysoké letové aktivity včel. Je-li metoda aplikována pro účely surveillance, na příklad v ochranných pásmech moru nebo hniloby včelího plodu, je možné identifikovat včelstva, u nichž je nutné provést klinické prohlídky s cílem identifikace zmíněných onemocnění. Rovněž je možné metodiku aplikovat v oblastech bez prokázaného výskytu onemocnění s cílem časného odhalení ohnisek. Je však nutné poznamenat, že laboratorní průkaz původce nelze bez potvrzení klinických příznaků považovat sám o sobě za průkaz onemocnění.

## 2. Úvod do problematiky bakteriálních onemocnění včelího plodu

Bakteriální nákazy včelího plodu představují významné riziko pro udržitelný chov včel. Podle manuálu Světové organizace pro zdraví zvířat (WOAH – World Organization for Animal Health, dříve OIE) jsou nejzávažnější z těchto infekcí mor včelího plodu způsobený bakterií *Paenibacillus larvae* a hniloba včelího plodu způsobená bakterií *Melissococcus plutonius*. V časovém horizontu několika měsíců až let v obou případech obvykle dochází k úhynu celého včelstva a tím i významným ekonomickým ztrátám, především v případech, kdy jsou postiženy komerční včelařské provozy. Oba patogeny se mohou zároveň šířit do prostředí zalétáváním včel a loupežemi nemocí oslabených nebo uhynulých včelstev.

Zákon číslo 166/1999 Sb. v aktuálním znění (Zákon o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů) zařazuje mor a hnilobu včelího plodu do kategorie nebezpečných nákaz. V obou případech zakazuje jejich léčbu. Konkrétními postupy v případě výskytu těchto nebezpečných onemocnění se věnuje vyhláška č. 18/2018 Sb. (Vyhláška o veterinárních požadavcích na chov včel a včelstev a o opatřeních pro předcházení a zdolávání některých nákaz včel a o změně některých souvisejících vyhlášek), která mimo jiné definuje i nutnost současného laboratorního vyšetření vzorků odebraných ze včelstva s příznaky onemocnění pro potvrzení výskytu nákazy.

## 3. Mor včelího plodu

Mor včelího plodu je vysoce infekční onemocnění včelího plodu. Přenos probíhá sporamai bakterie *P. larvae*, které jsou jediné schopné nakazit včelí larvu. Larvy jsou nakaženy včelami, které je krmí – kojičkami. Spory mohou přetrvávat v hltanových žlázách kojiček, v nichž se tvoří mateří kašička, která pak představuje významné infekční vehikulum (Lindström, 2008). Po pozření spor larvou dochází k jejich germinaci ve střevě a průniku přes peritrofitickou matrix a epitel střevní sliznice do hemocelu. Tkáně včelí larvy se následně rozkládají na kašovitou hmotu, která později zasychává v tzv. příškvár, ve kterém se nachází velké množství infekčních spor (až 2 miliony) (Poppinga & Genersch, 2015). Jak se včely snaží příškvár odstranit, pozřou spory *P. larvae*, které jsou jimi dále roznášeny v úlovém prostředí (Titěra et al., 2018). Následně mohou být spory *P. larvae* přeneseny do okolních včelstev zalétáváním nebo loupežemi (Lindström et al., 2008). Spory *P. larvae* mohou být šířeny i včelaři, zkrmováním neznámých krmiv s obsahem kontaminovaného medu či použitím včelařského vybavení kontaminovaného sporamai *P. larvae* (Fries & Camazine, 2001). Vzhledem k vysoké odolnosti spor a jejich množství v nakaženém včelstvu je jedinou relevantní cestou utracení nakaženého včelstva a spálení úlu případně dalších včelařských potřeb a nástrojů (Titěra et al., 2018).

Původce onemocnění, *P. larvae*, je možné na základě repPCR s použitím specifických primerů ERIC (Enterobacterial Repetitive Integrase Consensus) rozdělit do 5 genotypů ERIC I-V. Tyto genotypy se liší morfologií kolonií, metabolismem a virulencí (Genersch et al., 2006; Beims et al., 2020).

Poprvé byly jednotlivé genotypy popsány E. Genersch v roce 2006. I přes zjevné nedostatky a robustnost ERIC-repPCR, je tato genotypizace používána dodnes. Genotyp ERIC I se vyskytuje na evropském i americkém kontinentu. Oproti ostatním genotypům usmrcuje včelí larvu pomaleji, čas nutný pro usmrcení všech infikovaných 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. Oproti původním předpokladům tak mohou být usmrceny larvy ještě před zavičkováním. Tyto genotypy jsou izolovány raritně a vyskytují se především ve sbírkách mikroorganismů (Genersch et al., 2006). Nedávno popsán genotyp ERIC V (2020) vykazuje podobné znaky jako genotypy ERIC III a IV (Beims et al., 2020). Zmíněné genotypy byly dříve pravděpodobně popisovány jako samostatný druh *P. pulvificiens* způsobující rozpad včelího plodu. Na základě skutečnosti, že příškvary těchto genotypů neulpívají v zavičkových buňkách, lze usuzovat i na nižší epizootologický potenciál těchto genotypů.

Kromě zmíněného času  $LT_{100}$  se jednotlivé ERIC genotypy liší i faktory virulence. Každý z genotypů má pravděpodobně jinou strategii průniku přes střevní epitel včelí larvy. Oba genotypy ERIC I a II produkují chitinázu PICBP49, která rozkládá peritrofickou matrix střeva, esenciální pro invazi bakterie do organismu larvy. 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. 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. V celém procesu patogeneze se uplatňují i další faktory virulence, jako jsou na příklad proteázy nebo sekundární metabolity (Poppinga & Genersch, 2015). Při masivním množení vegetativních stádií *P. larvae* nejsou na larvách patrné 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). Při invazi *P. larvae* do dalších tkání včely dochází k jejich degradaci a usmrcení larvy.

#### 4. Hniloba včelího plodu

Oproti moru včelího plodu dochází v případě hniloby včelího plodu k usmrcení larev ve stáří 4 až 5 dní. Během infekce dochází k pohybu larvy, která následně hyne v nepřírozené pozici. Její barva se mění na hnědou až hnědočernou. V některých případech může dojít k úhynu larvy až po zavičkování s obdobnými symptomy jako v případě moru včelího plodu (Forsgren, 2010).

Ve srovnání s *P. larvae* nebyly faktory virulence *M. plutonius* intenzivně studovány. Vzhledem k tomu, že z infikovaných larev byly izolovány i jiné mikroby (např. *Achromobacter euridice*, *Enterococcus* spp., *Paenibacillus alvei*), předpokládalo se, že polymikrobiální infekce je zodpovědná za různou virulenci. S rozvojem molekulárně-genetických metod však došlo k průkazu některých specifických faktorů virulence *M. plutonius*. Významnou roli ve virulenci pravděpodobně hraje toxin – melissotoxin A, který byl nalezen u některých genotypů *M. plutonius*. Gen pro tento toxin je kódován na plazmidu označovaném jako pMP19. Kromě zmíněného toxinu jsou na plazmidu kódovány i geny pro extracelulární vazebnou matrix. V případě některých klonálních komplexů (genotypů) je tento plazmid pravděpodobně nestabilní. Tyto varianty se však vyznačují sníženou virulencí, tj. sníženou schopností vyvolat onemocnění – při umělém odstranění tohoto plazmidu z bakteriální buňky došlo ke ztrátě schopnosti usmrtit larvu (pouze 5 % exponovaných larev uhynulo). Zmíněný melissotoxin A patří do skupiny toxinů nalézáných u některých klostridií. Je zodpovědný za tvorbu pórů v cytoplazmatické membráně (Pérez-Ordóñez et al., 2021).

Přestože *M. plutonius* není sporulujícím mikrobem a jeho přežití v prostředí je oproti *P. larvae* nižší, i v tomto případě dochází ke kolapsu infikovaného včelstva a rozšíření na další včelstva v okolí obdobně, jako je tomu v případě moru včelího plodu.



## 5. Vlastní popis metodiky

### 5.1. Princip metodiky a výběr sekvencí

Specifické primery a sondy pro PCR v reálném čase a příslušné sondy byly navrženy pomocí Primer-BLAST (dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Na základě znalosti celého genomu *P. larvae*, genotypů ERIC I a ERIC II byla za cílovou sekvenci vybrána inserční sekvence IS256 (GenBank: WP\_024095274.1). Ta, díky své mnohonásobné přítomnosti v genomu *P. larvae* (např. DSM7030 obsahuje 84 kopií, DSM25430 obsahuje 229 kopií), umožňuje zvýšit sensitivitu metody. Specifita byla ověřena pomocí databáze GenBank, nástrojem NucleotideBlast (rovněž dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Po amplifikaci byly získané produkty ověřeny Sangerovým sekvenováním s následnou analýzou nástrojem NucleotideBlast Analysis. Sensitivita reakce byla stanovena ředěním kultury *P. larvae* genotypu ERIC I DSM 7030.

Pro detekci *M. plutonius* byly navrženy primery a sonda pro amplifikaci specifické sekvence plazmidu pMP1 (č. NC\_015517). Pro ověření virulence v případě positivity byly navrženy primery a sonda cílící na melissotoxin A z rodiny ETX/MTX2 (GenBank: NZ\_CM003360.1) zodpovědný za tvorbu pórů, který je považován za hlavní faktor virulence.

Interní kontrola PCR reakce byla zvolena tak, aby ověřila i původ vzorku ze včelstva, tj. detekovala některý z genů typických pro včelu medonosnou. Byl proto zvolen gen pro protein mateří kašičky, tzv. Major Royal Jelly Protein 1 (*mrjpl1*). Interní kontrola zároveň slouží pro kontrolu procesu izolace DNA a následné amplifikace.

Pro přípravu pozitivních kontrol byly všechny produkty PCR cílových sekvencí klonovány do vektoru pTrcHis TOPO™ TA Expression Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) dle doporučení výrobce.

### 5.2. Provedení

DNA je extrahována z klinického materiálu (mrtvé včely, měl, pyl, glycidové zásoby) a bakteriálních kultur pomocí kitu Nucleospin Tissue (výrobce Macherey Nagel, Düren, Německo) podle instrukcí výrobce.

Multiplexní PCR amplifikace je prováděna za použití diagnostické soupravy TaqMan® Multiplex Master Mix (výrobce ThermoFisher Scientific) rovněž dle doporučení výrobce (viz tabulky 1 a 2). Pro simplex PCR reakci sloužící k ověření virulence *M. plutonius* je reakce upravena tak, že místo sady primerů jsou přidány primery MP\_ETX. Reakce je následně doplněna 2 µl vody PCR kvality. Detekce virulence *M. plutonius* je prováděna v případě, že byl vzorek pozitivní při multiplex PCR. V tomto případě není nutné přidávat do vzorku interní kontrolu.

K amplifikaci může být použit kterýkoliv termocykler pro PCR reakci v reálném čase umožňující zpracování vzorku ve zkumavkách/destičkách s objemem 100–200 µl detekující fluorescenční signál v kanálech FAM, JOE, a ROX. Verifikace termocykleru musí být provedena za použití pozitivních kontrol.

**Tabulka 1.** Příprava PCR mixu pro současnou detekci *P. larvae*, *M. plutonius* a interní kontrolu. Výsledné koncentrace primerů a sond jsou uvedeny v tabulce 2.

Složka	Výrobce	Množství
TaqMan™ Multiplex Master Mix	Applied Biosystems/ Thermo Fischer Scientific, kat. č. 4461882	10 µl
Směs <i>P. larvae</i> primerů:		
P_larvae_IS256_F		1 µl
P_larvae_IS256_R		
P_larvae_IS256_P		
Směs <i>M. plutonius</i> primerů:		
M_plutonius_pMP1_F		1 µl
M_plutonius_pMP1_R		
M_plutonius_pMP1_P		
MRJP1_F		1 µl
MRJP1_R		
MRJP1_P		
Izolovaná DNA		12 µl

*Podmínky pro PCR reakci*

Iničiální denaturace: 95 °C, 20 s. Opakování 40 cyklů následujícího programu: 95 °C, 3 s, 60 °C, 30 s, následná akvizice fluorescence v zeleném, žlutém a oranžovém kanálu (barviva FAM, JOE, ROX).

**Tabulka 2.** Sekvence primerů a sond a jejich výsledná koncentrace v PCR reakci.

Cílový organismus / sekvence	Název primeru	Sekvence 5' → 3'	Velikost amplikonu	Cílový gen	Koncentrace v PCR reakci [µM]
<b>Multiplex PCR</b>					
<i>Paenibacillus larvae</i>	P_larvae_IS256_F	TCCACGTCCTTTTAGAGAGCTG	417 bp	IS256	0,250
	P_larvae_IS256_R	GACGGGAAGTTCACGACAG			0,250
	P_larvae_IS256_P	[FAM]-CGGAAAGAGGCTGTCTGCCAGG-[BHQ]			0,125
<i>Melissococcus plutonius</i>	M_plutonius_pMP1_F	TCCGACTATGAAGGGACGAAGAGA	413 bp	pMP1	0,250
	M_plutonius_pMP1_R	CGACATAAGCCATATCAAGCTGGG			0,250
	M_plutonius_pMP1_P	[JOE]-GGTCATTGCCAAGCTTTTATCTGC-[BHQ1]			0,125
Major royal jelly protein 1	MRJP1_F	CTCTTCTTCGGTTTGGTGGGCG	241 bp	mrjp1	0,150
	MRJP1_R	CAAAGACAAGCGTTGCATCGTATC			0,150
	MRJP1_P	[ROX]-GCTCTTGGCTGCTGGAACGA-[BHQ2]			0,125
<b>Simplex PCR</b>					
	MP_ETX_F	AGCAGATACCTATCAAGGGT	477 bp	ETX/MTX2	0,250
	MP_ETX_R	AAATTTTACCGTTGCAGT			0,250
	MP_ETX_P	[FAM]-ACCAGGGGAATTAATTTGGTGG-[BHQ1]			0,125

Při každé PCR reakci je nezbytné zařadit pozitivní kontroly. Tyto kontroly je vhodné smíchat v poměru 1 µl DNA specifického genu pro *P. larvae* + 1 µl DNA specifického genu pro *M. plutonius* + 1 µl DNA specifického genu pro interní kontrolu + 9 µl vody PCR kvality. V případě simplex PCR pro ověření virulence *M. plutonius* lze přidat 1 µl DNA *M. plutonius* + 9 µl vody PCR kvality. Při každé reakci je vhodné zařadit negativní kontrolu, tj. zkumavku PCR mixu s přidáním 12 µl vody PCR kvality, která prošla s výhodou celým procesem izolace DNA (vyloučení kontaminace DNA již během izolace).

### 5.3. Interpretace výsledků

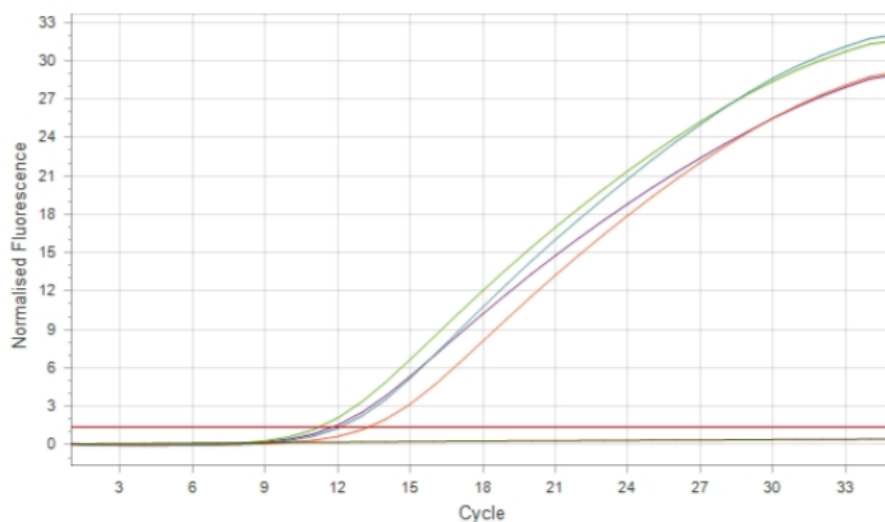
Výsledky jsou interpretovány na základě typického charakteru amplifikační křivky (obrázek č. 1) a parametrů překročení hraniční hodnoty (trashhold –  $C_t$ ).

Tabulka 3. Interpretační kritéria.

Kanál	Negativní vzorek	Pozitivní nález <i>Paenibacillus larvae</i>	Pozitivní nález <i>Melissococcus plutonius</i>	Nevalidní výsledek
FAM	$C_t > 35$	$C_t \leq 35$	$C_t > 35$	$C_t > 35$
JOE	$C_t > 35$	$C_t > 35$	$C_t \leq 35$	$C_t > 35$
ROX	$C_t \leq 35$	$C_t \leq 35$ nebo $C_t > 35$	$C_t \leq 35$ nebo $C_t > 35$	$C_t > 35$

V případě nevalidního výsledku lze opakovat izolaci DNA a následnou PCR. V případě, že je výsledek stále nevalidní, obsahuje vzorek inhibitory DNA, případně nepochází ze včelstva.

Obrázek 1. Typický průběh amplifikační křivky u čtyř genotypů *P. larvae* (ERIC I–IV).



Well	Colour	Sample Name	Cq	Efficiency	Efficiency R <sup>2</sup>	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

### 5.4. Ověření sensitivity metody a její validace

DNA *P. larvae* DSM7030 byla použita pro ověření sensitivity. DNA byla naředěna do finální koncentrace 60 ng/µl s následným desítkovým ředěním do finální koncentrace 60 fg/µl. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Metoda vykazuje vynikající sensitivity pro oba patogeny.

**Tabulka 4.** Ověření sensitivity metody na vzorku ředěné DNA kmene *P. larvae* DSM7030 se známou koncentrací.

Koncentrace DNA	Ct
60 ng/μl	11,27
6 ng/μl	15,33
600 pg/μl	19,08
60 pg/μl	22,57
6 pg/μl	26,12
600 fg/μl	29,80
60 fg/μl	32,88
Negativní kontrola	Signál nedetekován

Metoda byla validována na vzorcích *P. larvae* z úlového prostředí (viz tabulku 5). Výsledky ukazují na velmi dobrou shodu s kultivačním vyšetřením. V případě falešné negativity výsledků se jednalo o vzorek napadený plísní (vzorek D9).

**Tabulka 5.** Srovnání kultivační techniky a PCR reakce.

Označení vzorku	Kultivace (CFU)	qPCR (Ct) <i>P. larvae</i>	qPCR (Ct) mrijpi (interní kontrola)
<b>Měl</b>			
D1	negativní	negativní	34,56
D2	1×10 <sup>2</sup>	29,25	26,76
D3	1×10 <sup>4</sup>	18,16	34,35
D4	negativní	negativní	27,81
D5	1×10 <sup>3</sup>	24,96	28,17
D6	1×10 <sup>2</sup>	31,47	27,66
D7	negativní	negativní	24,38
D8	1×10 <sup>5</sup>	13,19	38,01
D9	1×10 <sup>4</sup>	negativní	28,25
D10	1×10 <sup>4</sup>	25,64	29,12
D11	1×10 <sup>3</sup>	28,55	26,65
D12	negativní	negativní	28,72
D13	negativní	negativní	24,66
D14	1×10 <sup>5</sup>	12,57	32,87
D15	1×10 <sup>3</sup>	29,02	29,05
D16	1×10 <sup>2</sup>	25,11	25,41
D17	1×10 <sup>5</sup>	29,49	30,15
D18	1×10 <sup>4</sup>	17,89	31,25
D19	1×10 <sup>3</sup>	26,98	29,83
D20	negativní	negativní	26,52
D21	negativní	negativní	25,90
D22	1×10 <sup>2</sup>	28,65	26,65
D23	negativní	negativní	24,35
D24	1×10 <sup>3</sup>	29,26	27,06
D25	negativní	negativní	32,25

<b>Dělnice včely</b>			
B1	pozitivní	16,56	18,56
B2	pozitivní	24,31	12,38
B3	negativní	negativní	12,66
B4	negativní	negativní	14,34
B5	negativní	negativní	14,78
<b>Příškvary</b>			
S1	pozitivní	13,15	23,42
S2	pozitivní	12,28	36,08
S3	pozitivní	14,25	31,39

## 6. Srovnání novosti metodiky

Metodika vychází z obecného rozšíření PCR diagnostiky v humánní a veterinární medicíně. S rozvojem a dostupností přístrojového vybavení došlo k vývoji metod PCR diagnostiky. Tyto metody byly nejprve aplikovány pro taxonomickou identifikaci z bakteriální kultury (Govan et al., 1999; Dobbelaere et al., 2001; Alippi et al., 2002, 2004; Ryba et al., 2009; De Graaf et al., 2006; Lauro et al., 2003; Han et al., 2008; Martínez et al., 2010; Beims et al., 2020). Následně byla PCR validována i pro úlové vzorky, tj. včelí larvy, příškvary, dělnice a měl (Rossi et al., 2018; Biová et al., 2021). Tyto metody jsou však založeny většinou na detekci variabilních úseků genu pro 16S rRNA.

Tato certifikovaná metodika však pro detekci *P. larvae* využívá inserční sekvenci IS256, která se v genomu vyskytuje v mnoha kopiích. Pro detekci *M. plutonius* je využita sekvence specifická pro plazmid pMP1. Konfirmace virulence je provedena následnou PCR detekující gen pro melissotoxin A (toxin skupiny ETX/MTX<sub>2</sub>). Z hlediska cílových míst pro PCR se tak jedná o unikátní přístup.

## 7. Uplatnění metodiky

Metodika může být využita laboratořemi zaměřenými na diagnostiku nemocí včel. Metodu PCR pro detekci *P. larvae* a *M. plutonius* lze využít pro konfirmaci onemocnění v případě klinických příznaků přímo z nemocných larev. Dále je možné a vhodné tento postup použít pro vyhledávání potenciálních zdrojů onemocnění v rámci preventivního vyšetření územních celků, případně vyšetření včelstev v ochranných pásmech moru, resp. hniloby včelího plodu. V případě positivity je však nezbytné provést klinické vyšetření včelstev pro potvrzení onemocnění.

## 8. Ekonomické zhodnocení metodiky

Zlatým standardem pro průkaz *P. larvae* a *M. plutonius* je kultivační vyšetření. Tato vyšetření jsou obvykle prováděna cíleně, dle klinických příznaků onemocnění. V případě plošné surveillace je obvykle vyšetřován pouze *P. larvae*. Původce hniloby včelího plodu *M. plutonius* není rutinně vyhledáván v rámci programů preventivní surveillace.

### **Kalkulace nákladů kultivace *P. larvae* a *M. plutonius*:**

- Zpracování vzorku včetně dekontaminace a ředění
- Kultivační média
- Kultivace
- Odečtení výsledků

Přibližná cena vyšetření na základě průzkumu trhu k 30. 11. 2022 činí 500,- Kč. Vyšetření *P. larvae* a *M. plutonius* je nezbytné provádět na různých kultivačních médiích a při různých kultivačních podmínkách (aerobní/anaerobní/mikroaerofilní podmínky). Rovněž zpracování vzorku vyžaduje odlišnou přípravu (pro

kultivaci *M. plutonius* nelze použít dekontaminaci využívanou pro *P. larvae*). Cena vyšetření vzroste na cca 1 000,- Kč.

### **Kalkulace nákladů pro PCR:**

- Zpracování vzorku zahrnující izolaci DNA některou z komerčních souprav
- Přípravu PCR reakce
- Vlastní PCR reakce včetně vyhodnocení výsledku

Přibližná cena vyšetření na základě kalkulace se pohybuje do 600,- Kč. Analogicky lze srovnat na příklad s cenou vyšetření pomocí PCR v lékařské diagnostice, kdy na základě vyhlášky vydané Ministerstvem zdravotnictví ČR se hodnota vyšetření pohybuje ve výši 1096 bodů (bod není ekvivalentní s korunovou sazbou, je obvykle nižší dle aktuální smlouvy mezi zdravotní pojišťovnou a zdravotnickým zařízením).

Lze proto konstatovat, že popsaná metoda PCR umožňuje získat výsledky s vyšší sensitivitou pro oba patogeny v ceně analogické nebo dokonce nižší, než je vyšetření kultivační. Nespornou výhodou je i skutečnost, že výsledek může být získán během několika hodin od přijetí vzorku do laboratoře. Tím lze zrychlit následný proces mimořádných veterinárních opatření, eliminovat šíření onemocnění na další včelstva a zabránit dalším ekonomickým škodám.

### **9. Publikace, které předcházely metodice**

1. Erban T, Zitek J, Bodrinova M, Talacko P, Bartos M, Hrabak J. Comprehensive proteomic analysis of exoproteins expressed by ERIC I, II, III and IV *Paenibacillus larvae* genotypes reveals a wide range of virulence factors. *Virulence*. 2019;10(1):363-75. doi: 10.1080/21505594.2019.1603133.
2. Erban T, Ledvinka O, Kamler M, Nesvorna M, Hortova B, Tyl J, Titera D, Markovic M, Hubert J. Honeybee (*Apis mellifera*) – associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):5084. doi: 10.1038/s41598-017-05076-8.
3. Titěra, D., Kamler, M., Erban, T., Hubert, J. Mor včelího plodu: diagnostika, prevence a tlumení. Výzkumný ústav včelařský, Dol, 2018. ISBN: 978-80-87196-39-7.

### **10. Seznam literatury**

1. Alippi AM, López AC, Aguilar OM. 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. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(7):3655-60. doi: 10.1128/AEM.68.7.3655-3660.2002.
2. Alippi AM, López AC, Aguilar OM. A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honey bees, at the subspecies level. *Lett Appl Microbiol*. 2004;39(1):25-33. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01535.x.
3. Beims H, Janke M, von der Ohe W, Steinert M. Rapid identification and genotyping of the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae* by combining culturing and multiplex quantitative PCR. *Open Vet J*. 2020;10(1):53-8. doi: 10.4314/ovj.v10i1.9.
4. Biová J, Bzdil J, Dostálková S, Petřivalský M, Brus J, Carra E, Danihlík J. American foulbrood in the Czech Republic: ERIC II genotype of *Paenibacillus larvae* is prevalent. *Front Vet Sci*. 2021;8:698976. doi: 10.3389/fvets.2021.698976.
5. Dobbelaere W, de Graaf DC, Reybroeck W, Desmedt E, Peeters JE, Jacobs FJ. Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores. *J Appl Microbiol*. 2001;91(2):212-6. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01376.x.
6. Fries I, Camazine S. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, 2001;32(3): 199-214. doi:10.1051/apido:2001122.
7. Forsgren E. European foulbrood of honey bees. *J Invertebr Pathol* 2010;103(S1):S5-9. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.016.

8. Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(3):501-11. doi: 10.1099/ijs.o.63928-0.
9. Govan VA, Allsopp MH, Davison S. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(5):2243-5. doi: 10.1128/AEM.65.5.2243-2245.1999.
10. de Graaf DC, Alippi AM, Brown M, Evans JD, Feldlaufer M, Gregorc A, Hornitzky M, Pernal SF, Schuch DM, Titera D, Tomkies V, Ritter W. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(6):583-90. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02057.x.
11. Han SH, Lee DB, Lee DW, Kim EH, Yoon BS. Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood (AFB). *J Invertebr Pathol.* 2008;99(1):8-13. doi: 10.1016/j.jip.2008.04.010.
12. Lauro FM, Favaretto M, Covolo L, Rassu M, Bertoloni G. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int J Food Microbiol.* 2003;81(3):195-201. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00257-x.
13. Lindström A. Distribution of *Paenibacillus larvae* spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of American foulbrood. *Microb Ecol.* 2008;56(2):253-9. doi: 10.1007/s00248-007-9342-y.
14. Lindström A, Korpela S, Fries I. The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J Invertebr Pathol.* 2008;99(1):82-6. doi: 10.1016/j.jip.2008.06.010.
15. Martínez J, Simon V, Gonzalez B, Conget P. A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50(6):603-10. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02840.x.
16. Pérez-Ordóñez G, Romo-Chacón A, Rios-Velasco C, Sepúlveda DR, de Jesús Ornelas-Paz J, Acosta-Muñiz CH. Virulence variations between clonal complexes of *Melissococcus plutonius* and the possible causes. *J Invertebr Pathol.* 2021;186:107686. doi: 10.1016/j.jip.2021.107686.
17. Poppinga L, Genersch E. Molecular pathogenesis of American foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae. *Curr Opin Insect Sci.* 2015;10:29-36. doi: 10.1016/j.cois.2015.04.013.
18. 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. doi: 10.3390/insects9040165.
19. Ryba S, Titera D, Haklova M, Stopka P. A PCR method of detecting American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. *Vet Microbiol.* 2009;139(1-2):193-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.05.009.
20. Titěra, D., Kamler, M., Erban, T., Hubert, J. Mor včelího plodu: diagnostika, prevence a tlumení. Výzkumný ústav včelařský, Dol, 2018. ISBN: 978-80-87196-39-7.

## 11. Dedikace

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QK1710228. Výsledek byl spolufinancován z projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – financovaného Evropskou unií – Next Generation EU.

Oligonukleotidy pro detekci *P. larvae* a *M. plutonius* jsou předmětem ochrany duševního vlastnictví – užitný vzor PUV 2021-38441 / 34905.