



Jan Hubert a kol.

Využití nové generace sekvenování pro diagnostiku původce moru včelího plodu *Paenibacillus larvae*

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika sekvenování

ISBN 978-80-7427-205-9



9 788074 272059



Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. Praha
Výzkumný ústav včelařský s.r.o. Dol



2016

Využití nové generace sekvenování pro diagnostiku původce moru včelího plodu *Paenibacillus larvae*

Jan Hubert a kol.

Autoři:

Mgr. Jan Hubert, Ph.D.

Ing. Bronislava Hortová, Ph.D.

Ing. Marta Nesvorná

Kristýna Haltufová

MVDr. Martin Kamler

Ing. Dalibor Titěra, CSc.

RNDr. Tomáš Erban, Ph.D.

Oponentní posudky vypracovali:

Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D. Lékařská fakulta UK v Plzni

Ing. Petr Krejčík, Ministerstvo zemědělství ČR

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu MZe ČR NAZV č. QJ1310085 s dobou řešení 2013–2017.

Metodika je určena pro státní správu. Metodice bylo uděleno osvědčení MZe č. 18890/2016-MZE-16232. O uplatnění metodiky byla dne 31.5.2016 uzavřena smlouva podle ustanovení § 269 zákona č. 513/1991 Sb. obchodního zákoníku.

Poděkování: Autoři děkují pracovníkům Státní veterinární správy ČR (SVS) za spolupráci při odběru biologických vzorků, bez této spolupráce by nemohla tato metodika vzniknout. Autorský kolektiv dále děkuje Ing. Janu Kopeckému, Ph.D., za konzultace k bioinformatickému zpracování dat a Martinu Markovičovi za pomoc při korektuře rukopisu. V neposlední řadě děkujeme Bc. Sylvě Hejdánkové, Marii Bostlové a Janu Hubertovi ml. za pomoc se zpracováním vzorků. Děkujeme recenzentům metodiky za podnětné připomínky.

Vydal:

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., a Výzkumný ústav včelařský, s. r. o., 2016

ISBN 978-80-7427-205-9

Anotace:

Metodika je zaměřena na využití sekvenování nové generace pro diagnostiku *Paenibacillus larvae*, který je původce moru včelího plodu. Použitý metodický přístup umožňuje detekci patogena v různých vývojových stádiích včel včetně dospělých dělnic, které přenášejí infekci. Metoda je tedy vhodná pro preklinickou diagnostiku moru včelího plodu. Popsaným postupem je možné nejen detekovat a kvantifikovat patogena, ale i jiné bakterie, jejichž zastoupení může patogen ovlivňovat. Postup byl ověřován na konkrétním případě moru včelího plodu. Text zahrnuje podrobně popsané postupy laboratorního zpracování vzorků včel, vyhodnocení v bioinformatickém programu mothur a interpretaci dat. Metodika je využitelná pro potřeby laboratoří zabývajících se diagnostikou onemocnění včel, je vhodná i pro potřeby výzkumné či didaktické.

Název anglicky:

Next-generation DNA sequencing method for diagnosis of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood

Annotation:

The methodology is focused on utilization of the Next-generation sequencing in diagnostics of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. The methodical approach enables detection of pathogen in different honeybee developmental stages including worker bees that transmit the disease. Thus, the method is useful for preclinical diagnostics of American foulbrood. The method enables not only detection and quantification of pathogen, but also detection of different bacteria which occurrence can be influenced by pathogen. The technique was verified on the particular case of American foulbrood. The matter includes in detail described working procedures such as sample processing, data evaluation with bioinformatics software mothur and interpretation of the data. The methodology is useful for laboratories interested in diagnostics of honeybee diseases, and is suitable also for research or didactic purposes.

Obsah

1. Cíl metodiky	1
2. Úvod	2
3. Vlastní popis metodiky	3
3.1. Sledovaná stanoviště	3
3.2. Příprava vzorků před extrakcí DNA	5
3.3. Chloroform-fenolová extrakce DNA	5
3.4. Sekvenování 16S rRNA na přístroji Illumina MiSeq	6
3.5. Bioinformatická analýza dat	7
3.6. Statistická analýza dat	13
4. Vyhodnocení výsledků modelového případu detekce <i>Paenibacillus larvae</i> pomocí nové generace metod sekvenování	17
4.1. Získané sekvence 16S rRNA bakteriálního společenstva a popis mikrobiomu dělnic a kukel včely medonosné v morovém pásmu a kontrolních vzorcích mimo morové pásmo	17
4.2. Ovlivňuje výskyt <i>Paenibacillus larvae</i> mikrobiom dělnic včely medonosné?	36
4.3. Analýza části společenstva mikrobiomu s potencionálními patogeny	38
5. Současná ekonomická náročnost použité metody	41
6. Závěr	41
7. Seznam použité literatury	42
9. Přílohy:	46

1. Cíl metodiky

Mor včelího plodu, jehož původcem je patogenní bakterie *Paenibacillus larvae*, patří mezi nejnebezpečnější nákazy včely medonosné a ohrožuje včelstva po celém světě. V laboratorních podmínkách je spolehlivá identifikace uvedeného patogena založena na molekulární analýze pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Molekulární detekce *P. larvae* probíhá nejčastěji pomocí specifických primerů, které byly navrženy na základě sekvenování genu 16S rRNA. Další možností je využití PCR v reálném čase (qPCR) umožňující také kvantifikaci patogena ve vzorcích. Postupy jednotlivých metod detekce *P. larvae* jsou dostupné v OIE Terrestrial Manual (OIE 2015), který spravuje Světová organizace pro zdraví zvířat a také v publikaci de Graaf et al. (2013).

V této metodice se zabýváme možností využití sekvenování DNA nové generace pro semikvantitativní stanovení přítomnosti bakterií *P. larvae* v dělnicích včely medonosné. Na rozdíl od dosud běžných postupů PCR či qPCR lze pomocí těchto metod identifikovat a kvantifikovat celé spektrum bakteriální komunity asociované s vyšetřovaným vzorkem a porovnat proporcionální výskyt symbiotických a zároveň patogenních bakterií.

Cílem této metodiky je demonstrovat na modelovém příkladu laboratorního zpracování vzorků včel, vyhodnocení v bioinformatickém programu mothur a interpretaci získaných dat.

2. Úvod

Paenibacillus larvae je patogenní bakterie včely medonosné, která je systematicky řazena do čeledi Paenibacillaceae, řádu Bacillales, třídy Bacilli a do kmene Firmicutes. Infekční formou *P. larvae* jsou spory. Nejvíce náchylná k infekci jarva v prvních 36 hodinách po vylíhnutí z vajíčka a v této době dokáže vyvolat infekci již několik spór. Uvádí se, že v pozdějším stádiu vývoje je k vyvolání klinických příznaků zapotřebí příliš velkého množství spór, a proto taková situace v přirozených podmínkách nenastává (Brødsgaard et al. 1998). To, zda se infekce významně projeví, se významně závisí na virulenci kmene *P. larvae* (Djukic et al. 2014). U *P. larvae* rozlišujeme čtyři různé genotypy ERIC I, II, III a IV. Tyto genotypy byly charakterizovány molekulární metodou rep-PCR za použití tzv. ERIC primerů. (Genersch et al. 2006). Nejběžnějším genotypem je ERIC I, následován ERIC II, zbylé dva jsou vzácné (Morrissey et al. 2014). Genotypy ERIC II, III a IV mají rychlejší průběh infekce a larvu usmrtí mezi 6. a 7. dnem, zatímco infekce ERIC I má pomalejší nástup a k úmrtí jedince dochází mezi 12. a 14. dnem od vylíhnutí. Ačkoliv je ERIC I nejběžnější, je nejméně virulentní (Rauch et al. 2009).

Na rozdíl od plodu není *P. larvae* infekční pro dospělé včely. Včelí dělnice fungují jako přenašeč *P. larvae* na plod a mohou rozšiřovat nákazu mezi včelstvy díky zalétávání (Wilson 1971; Lindström 2008; Lindström et al. 2008). Klinické příznaky moru včelího plodu jsou rozponatelné od určitého stupně nákazy již při prohlédnutí plodových plástů. Nápadným klinickým příznakem onemocnění je mezerovitost plodu. U zdravých včelstev je plod celistvý a jen zřídka se objevují prázdné nezakladené buňky. Je však zapotřebí mít na paměti, že mezerovitost se objevuje i jako důsledek jiných nemocí včel či špatně kladoucí matky. Některé buňky s nakaženou larvou mohou mít víčka tmavší barvy, nebo ve víčku malý otvor. Nejzřetelnějším klinickým příznakem moru včelího plodu jsou rozkládající se larvy gelovitěho či karamelovitěho vzhledu s typickým nepříjemným zápachem (Titěra 2009).

Včely a včelstva se podle veterinárního zákona řadí mezi hospodářská zvířata (Zákon č. 166/1999 Sb., § 3). Pokud vznikne podezření, že by se na určitém včelím stanovišti mohla nacházet včelstva nakažená morem včelího plodu, nařídí krajská veterinární správa (KVS) klinické vyšetření všech včelstev daného stanoviště a odebere vzorky pro laboratorní vyšetření. Odebrané vzorky jsou následně laboratorně vyšetřeny v akreditovaných specializovaných laboratořích.

Při potvrzení klinického případu moru včelího plodu se postupuje podle mimořádných veterinárních opatření (MVO), které vydá příslušná Krajská veterinární správa (Vyhláška č. 299/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů). Pokud je na stanovišti nakaženo více jak 15 % včelstev, musí být celé zlikvidováno. V případě, že je klinika prokázána v méně, než 15 % včelstev jsou likvidována pouze tato konkrétní nakažená včelstva. Včelstva jsou utracena spálením a likvidaci podléhají i hořlavé předměty používané na včelnici, nehořlavé předměty se řádně vydezinfikují. Po provedení závěrečné dezinfekce odvolá KVS vyhlášení ohniska, a pokud zde v průběhu následujícího roku mor nepropukne znovu, odvolá také ochranné pásmo (Vyhláška č. 299/2003 Sb., § 140, § 141, § 142; Zákon č. 166/1999 Sb., § 67; Nařízení č. 1069/2009, článek 19).

Nakažení včelstev morem včelího plodu lze předejít dodržováním pravidel přesunů včelstev a správnou chovatelskou praxí, zejména obezřetností při použití potenciálně kontaminovaných předmětů a krmiva nejasného původu. Pro prevenci moru je velmi důležité zjišťování příčin zimních úhynů a slábnutí včelstev (Vyhláška č. 299/2003 Sb., § 138). K udržení dobré zdravotní situace včelstev se organizují i plošná (na úrovni krajů) preventivní vyšetření včelstev.

V zahraničí se občas objevují snahy tlumit mor antibiotiky, avšak jejich používání ve včelařství není na území Evropské unie dovoleno. Tato praxe však vede pouze potlačení klinických příznaků z krátkodobého hlediska a nákaza obvykle za nějakou dobu po léčení propuká. Jedním z důvodů recidivy moru je, že antibiotika zabíjí pouze vegetativní stadia a nikoli spory (Pernal & Melathopoulos 2006). Negativními jevy používání antibiotik jsou negativní vliv na včely a jejich mikroflóru, vznik rezistence a rezidua ve včelích produktech (Kochansky et al. 2001; Evans 2003; Bogdanov 2005; Pernal & Melathopoulos 2006; Nařízení komise (EU) č. 37/2010).

3. Vlastní popis metodiky

3.1. Sledovaná stanoviště

V modelovém případě této práce jsou zahrnuta včelstva v morovém pásmu na 3 různých stanovištích a 1 kontrolní včelstvo mimo morové pásmo. Včelstva byla vzorkována v roce 2014 a jejich přehled je uveden tabulce č. 1. Celkem bylo získáno a analyzováno 39 vzorků. Dělnice byly vzorkovány smetením prvního plodového plástu, z téhož plástu byly odebírány i kukly. V případě výskytu klinických příznaků moru včelího plodu byly kukly odebírány z plástu. Vzorky kulek a dělnic odebrané do vzorkovnic byly usmrceny a zároveň hluboce

zmrazeny umístěním do polystyrenové krabice se suchým ledem. Vzorky byly po transportu do laboratoře skladovány až do zpracování v hlubokomrazícím boxu (-80 °C). Každý vzorek pro extrakci DNA představoval 10 ks včelích dělnic nebo 10 kukel.

Tabulka č. 1. Přehled stanovišť a vzorků použitých pro detekci *P. larvae* pomocí sekvenování nové generace.

Vzorek	Stanoviště					Environ. char.	
	Číslo	Místo odběru	s. š.	v. d.	Datum	Stádium	Mor
H1AMK	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	kukla	2
H2AMK	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	kukla	1
H1AMK3	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	kukla	2
H1AMK2	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	kukla	2
H1AMK1	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	kukla	2
H2AMK1	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	kukla	1
R14AMK	2	Rataje	49°42'15"	14°58'14"	10. 2. 2014	kukla	1
R10AMK	2	Rataje	49°42'15"	14°58'14"	10. 2. 2014	kukla	2
Z51AMK	3	Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10. 2. 2014	kukla	1
Z45AMK	3	Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10. 2. 2014	kukla	2
Z706AMK2	4	Štoky-Skřivánek	49°30'9"	15°35'19"	8. 7. 2014	kukla	0
Z706AMK1	4	Štoky-Skřivánek	49°30'9"	15°35'19"	8. 7. 2014	kukla	0
S6AM2	4	Hole	50°10'53"	14°15'49"	6. 3. 2014	dělnice	0
S6AM5	4	Hole	50°10'53"	14°15'49"	29. 10. 2014	dělnice	0
S6AM6	4	Hole	50°10'53"	14°15'49"	29. 10. 2014	dělnice	0
S6AM1	4	Hole	50°10'53"	14°15'49"	12. 3. 2014	dělnice	0
S6AM3	4	Hole	50°10'53"	14°15'49"	6. 3. 2014	dělnice	0
S6AM4	4	Hole	50°10'53"	14°15'49"	29. 10. 2014	dělnice	0
H1AM1	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	dělnice	2
H2AM1	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	dělnice	1
H2AM2	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	dělnice	1
H2AM3	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	dělnice	1
H1AM2	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	dělnice	2
H1AM3	1	Horní Lhota	49°35'43"	14°57'25"	26. 9. 2014	dělnice	2
R14AM1	2	Rataje	49°42'15"	14°58'14"	10. 2. 2014	dělnice	1
R10AM1	2	Rataje	49°42'15"	14°58'14"	10. 2. 2014	dělnice	2
R10AM3	2	Rataje	49°42'15"	14°58'14"	10. 2. 2014	dělnice	2
R10AM2	2	Rataje	49°42'15"	14°58'14"	10. 2. 2014	dělnice	2
R14AM2	2	Rataje	49°42'15"	14°58'14"	10. 2. 2014	dělnice	1
R14AM3	2	Rataje	49°42'15"	14°58'14"	10. 2. 2014	dělnice	1
Z45AM1	3	Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10. 2. 2014	dělnice	2
Z45AM4	3	Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10. 2. 2014	dělnice	2
Z45AM2	3	Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10. 2. 2014	dělnice	2
Z45AM3	3	Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10. 2. 2014	dělnice	2
Z51AM1	3	Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10. 2. 2014	dělnice	1

Z51AM2	3	Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10. 2. 2014	dělnice	1
Z51AM3	3	Zdislavice	49°41'12"	14°58'28"	10. 2. 2014	dělnice	1
Z706AM1	4	Štoky-Skřivánek	49°30'9"	15°35'19"	8. 7. 2014	dělnice	0
Z706AM2	4	Štoky-Skřivánek	49°30'9"	15°35'19"	8. 7. 2014	dělnice	0
Z706AM3	4	Štoky-Skřivánek	49°30'9"	15°35'19"	8. 7. 2014	dělnice	0

Legenda: Mor: 0 – stanoviště mimo morové pásmo; 1 – vzorky v morovém pásmu bez klinických příznaků moru včelího plodu; 2 – vzorky v morovém pásmu s klinickými příznaky moru včelího plodu.

3.2. Příprava vzorků před extrakcí DNA

Pro odstranění povrchové mikroflóry byly vzorky včelích dělnic nejdříve sterilizovány (2x oplach 96% etanolem a poté 2x oplach fosfátovým pufrům s tweenem (PBST: 3,2 mM Na₂HPO₄; 0,5 mM KH₂PO₄; 1,3 mM KCl; 135 mM NaCl s 0,05% w/w detergent Tween® 20) (vše Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Spojené státy). U vzorků kukel bylo předpokládáno do jisté míry sterilní prostředí, a jelikož by při manipulaci mohlo dojít k prasknutí biologického materiálu, tak kukly nebyly povrchově sterilizovány.

Poté byly vzorky (v počtu 10 dospělých dělnic na jeden vzorek) umístěny do skleněného homogenizátoru (Potter-Elvehjem homogenizer, Kavalier, Sázava, Česko), vzorky byly homogenizovány v 6 ml PBST po dobu 2 minut. Vzniklý homogenát byl přemístěn do sterilních 15 ml centrifugačních zkumavek a centrifugován při 3000 rpm po dobu 5 min. (CL31R, Thermo Fisher Scientific, Spojené státy). Supernatant byl přemístěn do 15 ml sterilních centrifugačních zkumavek a použit pro extrakci DNA.

3.3. Chloroform-fenolová extrakce DNA

Pro izolaci DNA byl použit modifikovaný protokol chloroformové-fenolové extrakce DNA. K supernatantu z homogenátu včel nebo kukel bylo přidáno 6 ml směsi fenol/chloroform/isopropanolu (Roti-Phenol®, A156.2, Carl Roth, Karlsruhe, Německo). Vzniklá směs byla jemně protřepána a centrifugována při 6000 rpm po dobu 5 minut. Poté byl supernatant promísen se 6 ml chloroform/isopropanolu (24:1), vzniklá směs byla jemně protřepána a stočena. Tento krok byl znovu opakován. Celkem jsme získali 700 µl supernatantu, který byl přepipetován do 1,5 ml sterilních zkumavek typu Eppendorf (Eppendorf® Safe-Lock™, Hamburk, Německo). Bylo přidáno 70 µl 3 M octanu sodného (Sodium acetate buffer solution, S7899, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Spojené státy) a 500 µl isopropanolu. Směs byla jemně protřepána a umístěna do mrazicího boxu při -40°C na

20 min, čímž došlo k vysrážení DNA. Následovala centrifugace při 12 000 rpm po dobu 15 min. DNA byla obsažena v pevné fázi, proto byl roztok odpipetován, poté byla peleta promyta 70% etanolem (500 µl) a následně centrifugována při 12 000 rpm po dobu 15 min. Etanol byl odstraněn a vzorky byly vysušeny (Speed Vac, Thermo Fisher Scientific, Spojené státy). Získaná peleta byla rozpuštěna ve 100 µl ohřáté ddH₂O (60 °C) a DNA byla následně přečištěna pomocí GeneClean® Turbo kitu (1102-600, MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornie, Spojené státy). Vzorky DNA byly skladovány při -40 °C do analýzy. Pro každý takto zpracovaný vzorek byla ověřena přítomnost bakteriální DNA pomocí PCR s eubakteriálními primery (Barbieri et al. 2001). Produkty amplifikace byly vizualizovány pomocí 2% agarozového gelu. V případě, že nebyla ve vzorku prokázána přítomnost PCR produktu očekávané velikosti, byl vzorek nahrazen jiným pro zachování počtu (Cariveau et al. 2014).

3.4. Sekvenování 16S rRNA na přístroji Illumina MiSeq

Vzorky byly analyzovány na přístroji Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, Kalifornie, Spojené státy) v laboratoři MR DNA (<http://mrdnalab.com>, Shallowater, Texas, Spojené státy). Zde byla provedena PCR pomocí primerů 27Fmod, 5-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG-3, a ill519Rmod, 5-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3, kde barcode byly připevněny na forward primer. Byl využit HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Německo). PCR reakce zahrnovala 30 cyklů a probíhala v následujících podmínkách: 94 °C - 3 min, následováno 28 cyklů: 94 °C - 30 s, 53 °C - 40 s a 72 °C - 1 min, elongační krok: 72 °C – 5 min. Kvalita amplifikovaného produktu byla ověřena na 2% agarozovém gelu. Jednotlivé PCR produkty byly smíchány na základě jejich molekulární hmotnosti a koncentrace DNA. Dále byly sdružené vzorky purifikovány pomocí magnetických kuliček Ampure XP beads (<http://mrdnalab.com>, Shallowater, Texas, Spojené státy). Poté byla z PCR produktů vytvořena DNA knihovna pomocí TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit (FC-121-4001, Illumina, Inc., San Diego, Kalifornie, Spojené státy), s finální koncentrací aplikonů 100 ng. Sekvence proběhla na sekvenátoru MiSeq (<http://mrdnalab.com>, Shallowater, Texas, Spojené státy) v laboratoři MR DNA za použití MiSeq Reagent Kit v3 (MS-102-3003, Illumina, San Diego, Kalifornie, Spojené státy).

3.5. Bioinformatická analýza dat

Při hodnocení bioinformatických dat popisujících bakteriální komunitu včely medonosné napadené patogenní bakterií *P. larvae* je možné postupovat několika způsoby.

Mohou být použity údaje zpracované přímo firmou, která analýzu provádí (v našem případě MR DNA). Zde jde o identifikované „operational taxonomic unit“ (OTU) a jejich počty v jednotlivých vzorcích a konsensus sekvence ve formátu *.fasta.

Dále je možné využít nezpracovaná data obsahující sekvence spojené do kontigů, tj. quality fasta soubor. Data zpracovaná programem mothur jsou uznávána mezinárodní komunitou zabývající se zdravím včel. Quality fasta soubor je poskytován buď s barcody a primerem ve formě fasta a fasta quality souborů, nebo v souborech kde jsou barcody a primer již odstraněny.

Poslední variantou je zpracování dat poskytnutých přímo firmou Illumina. Tato data zahrnují dva soubory např. *Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq* a *Sam82-108_S3_L001_R2_001.fastq* a obsahují nespojené sekvence s barcody a primery. Součástí dat je textový soubor např. *013015JH27F-mapping*, podle kterého je možné přiřadit barcody k jednotlivým vzorkům. Postup vychází přímo z Illumina souborů a je podrobně popsán v publikaci Kozich et al. (2013). Data jsou zpracována v programu mothur (Schloss et al. 2009).

Před vlastní analýzou je nezbytné získat aktuální referenční soubor z databáze SILVA, viz přílohy (Quast et al. 2013), který je dostupný na webových stránkách programu. Tento soubor je nutné upravit dle použitých primerů pomocí příkazu **pcr.seqs(fasta=silva.bacteria.fasta, start=1044, end= 13127)** a výsledný soubor je přejmenován na *silva.131.fasta*. Dalším souborem potřebným pro bioinformatickou analýzu, je referenční list z databáze RDP (Cole et al. 2014). Bude-li program mothur spouštěn v operačním systému Windows je doporučeno všechny tyto soubory nahrát do složky obsahující *mothur.exe* soubor. Příkazem **fastq.info(file=s.txt, oligos=oligo.txt, pdiffs=2, bdiffs=1, fasta=f, qfile=f)** jsou vytvořeny fasta-quality soubory pro jednotlivé vzorky. Uvedený příkaz obsahuje další parametry umožňující nastavit kvalitu rozlišení sekvencí.

Jednotlivé vzorky jsou sekvenovány z obou částí separátně (tj. forward a reverse). Je nutné spojit sekvence do kontigů, což je provedeno příkazem **make.contigs(file=s.txt, oligos=oligo.txt, processors=4)**. Tímto příkazem se vytvoří fasta soubor (s.fasta), program dále spočítá celkový počet sekvencí, počet sekvencí pro jednotlivé vzorky a zároveň zbaví sekvence primeru a barcodu. Pro zhotovení kontigů je třeba připravit dva textové soubory, jež obsahují prostý text oddělený tabulátorem. Příklad těchto textových dokumentů udávají tabulky č. 2 a 3. Námi analyzovaná data obsahovala 3 různé sady sekvenace na přístoji

Illumina MiSeq viz tabulku č. 4, proto je v následujícím textu uváděn modelový příklad pouze pro část dat.

Tabulka č. 2. Ukázka souboru s.txt. pro příkaz „make.contig“ v programu mothur.

název vzorku	forward	revers
Sam82	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq	Sam82-108_S3_L001_R2_001.fastq

Tabulka č. 3. Ukázka souboru oligo.txt pro příkaz „make.contig“ v programu mothur.

forward			
AGRGTTTGATCMTGGCTCAG			
#			
barcode	CGTAGATA	NONE	Z706AMK2
barcode	CGTAGGCT	NONE	Z706AM1
barcode	CGTATTCA	NONE	Z706AMK1
barcode	CGTCACAG	NONE	S6AM3
barcode	CGTCCAGG	NONE	S6AM4
barcode	CTAACAGC	NONE	H1AMK3
barcode	CTAAGAAC	NONE	H1AMK2
barcode	CTAATCGC	NONE	R10AM3
barcode	CTAATGCA	NONE	R10AM2
barcode	CTACACCT	NONE	Z45AM4
barcode	CTACCAAG	NONE	H1AMK1
barcode	CTACGCTG	NONE	H2AMK1

Tabulka č. 4. Přehled barcodů a souborů pro data analyzovaná v rámci sledování výskytu *P. larvae*. Data pochází ze tří sekvenací na Illumina MiSeq.

Illumina	Vzorek	Barcode	Fasta-quality -Illumina
1	S6AM2	CGTAACCA	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
2	S6AM5	CGTAAGAA	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
3	S6AM6	CGTACCCA	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
5	S6AM1	CGTAGGCT	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
27	H1AMK	CTACGCTG	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
28	H1AM1	CTACGCTT	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
29	H2AMK	CTACTCGC	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
30	H2AM1	CTAGCTGG	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
31	R14AM1	CTAGGCAG	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
32	R14AMK	CTAGGCTA	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
33	R10AMK	CTAGTGCT	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
34	R10AM1	CTATAGTC	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
35	Z51AMK	CTATCTCG	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
36	Z45AM1	CTATGTCA	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
37	Z45AMK	CTATTCAG	SAM1-69_S7_L001_R1_001.fastq
73	Z706AMK	CGTAGATA	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
74	Z706AM1	CGTAGGCT	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
75	Z706AMK	CGTATTCA	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
78	S6AM3	CGTCACAG	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
79	S6AM4	CGTCCAGG	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
90	H1AMK3	CTAACAGC	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
91	H1AMK2	CTAAGAAC	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
92	R10AM3	CTAATCGC	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
93	R10AM2	CTAATGCA	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
94	Z45AM4	CTACACCT	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
95	H1AMK1	CTACCAAG	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
96	H2AMK1	CTACGCTG	Sam82-108_S3_L001_R1_001.fastq
16	H2AM2	CGTGGTCA	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
17	H2AM3	CGTTCACG	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
18	H1AM2	CGTTTACT	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
19	H1AM3	CGTTTCTA	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
20	R14AM2	CTAACACA	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
21	R14AM3	CTAACAGC	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
22	Z45AM2	CTAAGAAC	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
23	Z45AM3	CTAATCGC	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
24	Z51AM1	CTAATGCA	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
25	Z51AM2	CTACACCT	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
26	Z51AM3	CTACCAAG	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
51	Z706AM2	CTCGTGAT	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq
52	Z706AM3	CTCTAGCG	SAM1-52_S9_L001_R1_001.fastq

Následně je zadán příkaz `summary.seqs(fasta=s.trim.contig.fasta)`, který udává přehled o kvalitě sekvencí, viz tabulku č. 5. Dále je nutné odstranit sekvence s dvojznačnou bází a také sekvence s nestandardní velikostí, což je provedeno příkazem:

```
screen.seqs(fasta=s.trim.contigs.fasta, group=s.contigs.groups, maxambig=0,
maxlength=600).
```

Příkazem **get.current()** jsou vytvořeny dva soubory: *fasta=s.trim.contigs.good.fasta* a *group=s.contigs.good.groups*. První z nich obsahuje sekvence ve fasta formátu a ve druhém textovém souboru jsou zaznamenány údaje popisující tyto sekvence. Pro zobrazení informací v tak velkém textovém souboru nejsou vhodné prohlížeče, které jsou součástí operačního systému Windows. Pro vizualizaci dat je vhodné použít Large text file viewer. Změnu v sekvencích lze zkontrolovat příkazem **summary.seqs(fasta=s.trim.contigs.good.fasta)**. Další analýza v programu mothur spočívá ve zredukování počtu sekvencí, čehož lze dosáhnout výběrem unikátních sekvencí, **unique.seqs(fasta=s.trim.contigs.good.fasta)**.

Poté je použit příkaz:

count.seqs(name=s.trim.contigs.good.names, group=s.contigs.good.groups), který zjednoduší práci se soubory, a vytvoří soubor *s.trim.contigs.good.count_table*. Změna sekvencí je následně ověřena příkazem **summary.seqs(count=s.trim.contigs.good.count_table)**. Výsledky jsou opět uvedeny v tabulce č. 5.

Nyní je možné přistoupit ke sjednocení našich sekvencí s databází SILVA pomocí příkazu **align.seqs(fasta=s.trim.contigs.good.unique.fasta, reference=silva.131.fasta)**.

Změna sekvencí po tomto kroku je zobrazena příkazem:

summary.seqs(fasta=s.trim.contigs.good.unique.align, count=s.trim.contigs.good.count_table).

Dále je nutné odstranit sekvence špatné velikosti nebo kvality, tudíž je zadán příkaz **screen.seqs(fasta=s.trim.contigs.good.unique.align, count=s.trim.contigs.good.count_table, summary=s.trim.contigs.good.unique.summary, start=1968, end=11550, maxhomop=8)**. Pro kontrolu sekvencí je opět použit **summary.seqs(fasta=current, count=current)**.

Dále je doporučena filtrace sekvencí příkazem:

filter.seqs(fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.align, vertical=T, trump=.).

Po filtrování jsou opět stanoveny unikátní sekvence příkazem:

unique.seqs(fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.fasta, count=s.trim.contigs.good.good.count_table).

Následujícím příkazem dojde k odstranění chyb a šumu způsobeného sekvenováním, **pre.cluster(fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.fasta, count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.count_table, diffs=12)**. Doporučené nastavení parametru *diffs* je (*diffs*=2) a určuje množství rozdílů v sekvencích. V našem případě jsme vzhledem k velkému počtu sekvencí zvolili tento parametr vyšší (*diffs*=12). V této kombinaci bylo získáno 123 080 unikátních sekvencí z celkového počtu 1 161 882 sekvencí.

V dalším kroku je nutné odstranit chimérické sekvence pomocí programu UCHIME (Edgar et al. 2011), který je součástí mothuru a lze ho spustit příkazem:

```
chimera.uchime(fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta,  
count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.count_table, dereplicate=t).
```

V této syntaxi program odstraní chimérické sekvence ale pouze v count-souboru. Ve fasta souboru je nutné k odstranění těchto sekvencí zadat příkaz:

```
remove.seqs(fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta,  
accnos=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.uchime.accnos).
```

Příkazem **summary.seqs**(fasta=current, count=current) je zobrazeno, kolik sekvencí bylo odstraněno jako chiméry (viz tabulku č. 5). V našem případě bylo odstraněno 99 614 chimérických sekvencí z celkového počtu 1 098 396 sekvencí.

Po zredukování počtu sekvencí je možné přistoupit k jejich porovnání s referenčním souborem RDP (Cole et al. 2014) pomocí příkazu:

```
classify.seqs(fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta,  
count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.uchime.pick.count_table,  
reference=trainset14_032015.pds.fasta, taxonomy=trainset14_032015.pds.tax, cutoff=80).
```

Po klasifikaci je nutné odstranit nežádoucí sekvence, např. sekvence mitochondrií, plastidů, případně eukaryotických organismů, které vznikly zřejmě jako kontaminace během zpracování a u analyzovaných vzorků nelze předpokládat jejich přítomnost.

K jejich odstranění je použit příkaz:

```
remove.lineage(fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta,  
count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.uchime.pick.count_table,  
taxonomy=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.taxonomy,  
taxon=Chloroplast-Mitochondria-unknown-Archaea-Eukaryota).
```

Nyní lze přistoupit k identifikaci operačně taxonomických jednotek (OTU). Analýza sekvencí vedoucí k identifikaci OTU je náročná na hardwarové vybavení počítače, tj. dostatek volného místa na disku, operační paměť a množství procesorů. V našem případě probíhala identifikace OTU v modifikaci od doporučeného protokolu (se změněnými parametry), jedná se o příkaz:

```
cluster.split(fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.fasta,  
count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.uchime.pick.pick.count_table,  
taxonomy=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.taxonomy,  
splitmethod=classify, taxlevel=6, cutoff=0.15, processors=4).
```

OTU na hladině podobnosti 0,03, která je nejčastěji používána, jsou vytvořeny pomocí příkazu:

```
make.shared(list=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.pick.an.unique_list.list,  
count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.uchime.pick.pick.pick,  
count_table, label=0.03).
```

Následně jsou identifikovány OTU pomocí databáze RDP, příkaz:

```
classify.otu(list=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.pick.an.unique_list.list,  
count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.uchime.pick.pick.pick,  
count_table,  
taxonomy=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.pick.taxonomy, label=0.03).
```

Program vytvoří dva soubory, ve kterých jsou mimo jiné uvedeny počty sekvencí klasifikovaných OTU pro jednotlivé vzorky, a jejich spojením vytvoříme přehlednou tabulku, kterou lze importovat do MS Excel nebo otevřít programem Open Office. Nevýhodou této analýzy je velké množství OTU, jež velmi často obsahují pouze jednu nebo jen několik málo sekvencí. Řešení tohoto problému spočívá v kontrolním vzorku. V našem případě však z důvodu finančních úspor tento vzorek použit nebyl. Vycházeli jsme tedy z práce Bokulich et al. (2013) a byly eliminovány všechny OTU s nižším celkovým počtem sekvencí než je např. 5 (parametr „cutoff“). Počet vyloučených sekvencí by měl být nízký cca od 1 do 3 % z celkového počtu.

Tyto sekvence jsou odstraněny příkazem:

```
split.abund(fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.fasta,  
list=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.pick.wang.unique_list.list,  
count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.pick.count_table,  
cutoff=5, label=0.03). Tento výběr zredukoval počet sekvencí na 1 020 060, tj. jejich počet se snížil o 7 %. Tímto příkazem byl zredukován i vzorek H1AMK2, který obsahoval pouze 1 unikátní sekvenci.
```

Před další analýzou je nejprve doporučeno zkrátit názvy souborů pomocí příkazu:

```
system(mv  
s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.0.03.abund.fasta).
```

Tímto způsobem lze přepsat všechny potřebné soubory tj. *.fasta, *.count_table, *.list a *.taxonomy. Alternativně je možné soubory přejmenovat manuálně.

V našem případě byl stanoven počet OTU ještě jednou tentokrát pouze s abundantními sekvencemi, proto byly opět zadány příkazy:

```
make.shared(list=s1.list, count=s1.count_table, label=0.03)
```

```
classify.otu(list=s1.list, count=s1.count_table, taxonomy=s1.taxonomy, label=0.03).
```

Nyní jsou připraveny výsledné soubory, které lze použít pro statistickou analýzu a identifikaci OTU.

Pro další analýzu je nutné vytvořit soubory obsahující sekvence jednotlivých OTU, za použití následujících příkazů **get.otulist(list=s1.list, label=0.03)**. Tímto příkazem je vytvořen soubor *s1.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.tx.1.otu*, který lze otevřít v MS Excel. Na řádcích jsou identifikovány OTU a následují kódy sekvencí. Pro vybrané OTU je nutné řádek zkopírovat na nový list a transponovat. Transponovaný soubor lze uložit jako prostý text např. *OTU1.csv*. Následně je příkazem **get.seqs(accnos=otu1.csv, fasta=s.fasta, count= s.count_table)** vytvořen fasta soubor *s.pick.fasta*. V tomto souboru jsou jednotlivé sekvence v alignmentu dle databáze SILVA. Další vytvořený soubor je soubor *s.pick.count_table*, který je možné otevřít v MS Excel a obsahuje počty sekvencí pro jednotlivé označení sekvencí ve fasta souboru. Pro porovnání sekvencí s databází GenBank je výhodné sledovat zastoupení nejpočetnějších sekvencí.

Rozdělené fasta soubory pro námi vybraná OTU lze otevřít např. pomocí programu Bioedit, nebo Codone Code Alinger. Následně jsou pomocí Blastu porovnány sekvence s databází GenBank (Altschul et al. 1997). Při identifikaci sekvencí se doporučuje pro sekvence se stejnou podobností (skórem) zohlednit jejich původ tj. souvislost se včelami, rostlinami atd. (Cariveau et al. 2014). Je vhodné vytvořit tabulku obsahující identifikované sekvence jak pomocí databáze RDP tak pomocí GenBanku. Takto zpracovaná data je možné vizualizovat pomocí programu Krona (Ondov et al. 2011). Makra pro uvedené zobrazení jsou připravena v MS Excel a lze je stáhnout ze stránek MR DNA.

3.6. Statistická analýza dat

Data popisující bakteriální komunitu včely medonosné v souvislosti s výskytem *P. larvae* byla analyzována za pomoci programů mothur, PAST a pro vizualizaci byl použit statistický software XLSTAT. V našich analýzách byly pro statistické hodnocení použity OTU, i když mothur umožňuje pracovat i s fylogeny, což není zahrnuto v této metodice.

V druhém kroku řešení bylo nutné odstranit symbiotické bakterie, jež se vyskytovaly hojněji a znemožňovaly statistickou analýzu bakterií potenciálně patogenních. Postupovali jsme podle práce Carivea et al. (2014), která se zabývá studiem bakteriálního společenstva čmeláků. Dle identifikace z databáze RDP a GenBanku byly rozděleny OTU s vyšším celkovým počtem než 50 na OTU pocházející ze symbiontů (dle Moran et al. 2015) a zbylé OTU s potencionálními patogeny. V případě, že se OTU nepodařilo identifikovat na úroveň rodu, byla automaticky považována za patogenní.

Pro analýzu diverzity je nutné, aby počty sekvencí byly vyvážené, v našem souboru byl nejmenší počet sekvencí 2130 u vzorku Z45AMK. Proto byl příkazem **sub.sample(shared=s1.shared, size=2130)** vytvořen soubor *s1.0.03.subsample.shared*, který byl následně analyzován v programu PAST. Tímto krokem byla získána data pro počet typů sekvencí (Taxa-S), inverzní Simpsonův index, a Chaos index. Vzhledem k typu pozorování byly statistické analýzy prováděny pro mikrobiom dělnic včely medonosné. Pozorování mikrobiomu kukel bylo provedeno pouze orientačně, protože vzhledem k malému počtu opakování a struktuře bakteriálního společenstva nebylo možné tento soubor analyzovat. Pro porovnání těchto indexů byl zvolen Kruskal-Wallisův neparametrický test.

Všechna tato data indikovala, že mikrobiom kukel a dělnic je naprosto rozdílný a proto byly při další analýze vzorky s kuklami z celkového souboru dat odstraněny. Pro tento krok byly využity přejmenované soubory z předchozí analýzy, tj. *s1.count_table* a *s1.list*., a pomocí příkazu **remove.groups(count=s1.count_table, groups=H1AMK-H2AMK-H1AMK3-H1AMK2-H1AMK1-H2AMK1-R14AMK-R10AMK-Z51AMK-Z45AMK-Z706AMK2-Z706AMK1, list=s1.list)**, byly vzorky ze souboru odstraněny. Příkazem byly vytvořeny soubory *s1.pick.count_table* a *s1.pick.list*, se kterými se pokračovalo v další analýze.

Příkazem **make.shared(list=s1.list, count=s1.count_table, label=0.03)** byly vytvořeny *s1.*.rabund* soubory kde * - znamená identifikaci vzorku např. R10AM1 a dále soubor *s1.pick.shared*, který je potřebný pro další analýzu. Následně byl spočítán počet sekvencí v jednotlivých vzorcích příkazem **count.groups()**. Nejméně sekvencí obsahoval vzorek S6AM6, tj. 6499 sekvencí. Pro novou analýzu dat tentokrát pouze mikrobiomu dělnic byl vytvořen vzorek příkazem **sub.sample(shared=s1.pick.shared, size=6499)**. Program vytvořil soubor *s1.pick.0.03.subsample.shared*, který lze otevřít v MS Excel, převést do programu PAST, nebo analyzovat dále v programu mothur. V našem případě byl pro statistickou analýzu využit program mothur.

Výpočet parametrů α -diverzity:

Pro výpočet parametrů α -diverzity lze využít příkaz:

summary.single(shared=s1.pick.0.03.subsample.shared, calc=nseqs-coverage-sobs-invsimpson-shannon-chao, subsample=6499), který zahrnuje výpočet nejčastěji používaných indexů pro porovnání α -diverzity. Jedná se o inverzní Simpsonův index, Shannonův index a Chaos index. Kromě výše uvedených indexů program vypočítá počet typů sekvencí (sobs), pokrytí (covarege) a nseq uvádí počet sekvencí, který je 6499, což bylo stanoveno parametrem subsample=6499. Program vytvoří dva soubory s1.pick.0.03.subsample.groups.ave-std.summary a s1.pick.0.03.subsample.groups.summary. V našem případě byla pro další práci využita data ze souboru s1.pick.0.03.subsample.groups.summary.

Výpočet parametrů β -diverzity: Tyto výpočty jsou založené na porovnání podobnosti jednotlivých vzorků. V tomto případě je důležité zjistit, zda se liší mikrobiom včel pocházejících z míst s výskytem moru včelího plodu od včel mimo morové pásmo. Pro porovnání podobnosti se využívá řada ekologických indexů, v našem případě byl zvolen Bray-Curtisův index, který je vhodný pro hodnocení bakteriální komunity včel (Engel et al. 2013). Lze využít příkaz

dist.shared(shared=s1.pick.0.03.subsample.shared, calc=braycurtis, subsample=6491), tím vytvoříme 3 soubory s maticemi Bray-Curtisova indexu, tj. s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.dist; s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.dist; s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.std.dist.

Nyní je nezbytné zjistit, do jaké míry jsou si mikrobiomy jednotlivých vzorků včelích dělnic podobné. Pro tyto výpočty je nutné doplnit design file, což je tabulka vytvořená v MS Excel exportovaná jako prostý text oddělený tabulátory, kde první sloupec je kód vzorku tj. např. S6AM2 a druhý je námi stanovený stupeň napadení včelím morem (tj. hodnoty 0,1,2) zde 0. Tuto vyexportovanou tabulku lze uložit jako soubor AFB.TXT. Pro porovnání vlivu stupně napadení včelím morem na mikrobiom dělnic včely medonosné byl použit test AMOVA (analýza molekulární variance), příkaz:

amova(phylip=s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.dist, design=AFB.txt).

Program spočítá testovou statistiku, která je v tomto případě neprůkazná a výsledky uloží do souboru s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.amova. Další test umožňující porovnat zda se v našem soboru liší variance v hodnotách indexu je HOMOVA. Tento test je spočítán příkazem:

homova(phylip=*s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.dist*, design=AFB.txt).

Po výpočtu se zobrazí údaje testu a jsou uloženy do souboru *s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.homova*. Pro zjištění, zda je mikrobiom včel ovlivněn dalším parametrem, který nebyl stanoven, případně jestli je test signifikantní, je možné data vizualizovat. Lze využít zobrazení v multidimenzionálním prostoru tj. multidimensional scaling pomocí příkazu:

nmds(phylip=*s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.dist*).

Po výpočtu je doporučeno zkontrolovat parametry lowest stress : 0.275 a R-squared for configuration: 0.679. V našem případě parametr lowest stress přesahoval hodnotu 0.2, tudíž nebylo doporučeno analýzu použít. Lze využít alternativní přístup a to Principle Coordinate analyses (PCoA), pomocí příkazu:

pcoa(phylip=*s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.dist*).

Výpočet udává hodnotu R^2 pro 3 osy, což je 0.73. Vytvořený soubor *s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.pcoa.loadings* uvádí variabilitu vysvětlenou každou osou, zatímco soubor *s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.pcoa.axes* uvádí pozice pro jednotlivé vzorky.

Dále bylo zjišťováno, jestli *P. larvae* koreluje s dalšími bakteriemi. Korelace byla vypočítána pomocí příkazu:

corr.axes(axes=*s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.pcoa.axes*,
shared=*s1.pick.0.03.subsample.shared*, method=pearson, numaxes=2).

Byl použit Pearsonův korelační koeficient a vytvořen soubor *s1.pick.0.03.subsample.pearson.corr.axes*, který uvádí korelaci s osami a zda je tato korelace signifikantní. Data byla vyexportována do MS Excel a využita pro tvorbu grafu. Lze zobrazit vybrané OTU, které jsou signifikantně korelované s osami. Pro vizualizaci sekvencí jednotlivých OTU ve vzorcích byla zvolena heat-mapa, která byla zkonstruována v programu XLSTAT (modul Omnic data analyses). Heat-mapa byla vytvořena s redukcí OTU pomocí filtrování přes interkvartilový rozsah, který odfiltroval 695 OTU z celkového počtu 731 OTU.

Analýza na úrovni populace: Tato analýza umožňuje vyhodnotit, zda je bakteriální společenstvo v našich vzorcích signifikantně ovlivněno faktorem, tj. stupeň napadení včelím morem. K tomu lze využít METASTAT analýzu. Tuto analýzu lze spustit pomocí příkazu **metastats**(shared=*s1.pick.0.03.subsample.shared*, design=AFB.txt). Program porovná jednotlivé parametry faktoru a vytvoří 3 soubory, které obsahují průměrné hodnoty relativní abundance, střední chybu průměru, varianci a hodnotu F. Vytvořené soubory jsou

s1.pick.0.03.subsample.0.03.1-0.metastats, *s1.pick.0.03.subsample.0.03.2-0.metastats*, *s1.pick.0.03.subsample.0.03.2-1.metastats* a lze je otevřít v programu MS Excel.

Analýza patogenní části mikrobiomu: V druhém kroku řešení byl soubor *s1.pick.shared* rozdělen a byly analyzovány informace o potencionálně patogenních bakteriích. Pro výpočet byla použita kombinace programů mothur a PAST a byly zadány stejné příkazy jako v případě hodnocení celkového mikrobiomu. V programu mothur byly využity již uvedené příkazy pro tvorbu Bray-Curtisovi matice a METASTAT analýzu. V programu PAST byl zvolen test PERMANOVA pro vyhodnocení vlivu environmentálních veličin na rozložení potencionálních patogenů v mikrobiomu dělnic a výsledky byly vizualizovány pomocí multidimensional scaling (msds).

Popis jednotlivých příkazů uvedeného modelového příkladu v programu mothur, datasety a další programy nutné pro bioinformatickou analýzu jsou shrnuty v tabulkách 1P až 3P viz přílohy.

4. Vyhodnocení výsledků modelového případu detekce *Paenibacillus larvae* pomocí nové generace metod sekvenování

4.1. Získané sekvence 16S rRNA bakteriálního společenstva a popis mikrobiomu dělnic a kulek včely medonosné v morovém pásmu a kontrolních vzorcích mimo morové pásmo.

Celkem bylo zachyceno 1 098 395 sekvencí 16S rRNA. Z toho 982 600 sekvencí bylo získáno z dělnic včely medonosné a 115 795 z kulek. Tyto sekvence vytvořily 1081 OTU, avšak pouze 133 OTU mělo celkový počet sekvencí větší než 100 a 40 OTU větší než 1 000. Tyto reprezentativní sekvence byly porovnány s databází GenBank a přiřazeny k jednotlivým taxonům – tedy druhům bakterií (viz tabulku č. 5).

Kompozice mikrobiomu kulek a dělnic na jednotlivých stanovištích byla graficky znázorněna pomocí programu Krona. Z grafů je patrné, že mikrobiom dělnic je velmi podobný a obsahuje především sekvence symbiotických bakterií, tj. *Gilliamella apicola* (Gamma 1), *Frischella perrara* (Gamma 2), *Snodgrassella alvi* (Beta), *Lactobacillus mellis* and *L. mellifer* (Firm 4), *L. helsingborgensis*, *L. melliventris* a *L. kimbladii* (Firm 5), *Bifidobacterium asteroides*, *B. actinocolonii*forme, *B. bohemicum* (Bifido) a bakterie skupiny Bartonellaceae (Alpha 1) (dle Moran 2015). Tyto bakterie jsou na všech stanovištích zastoupeny v přibližně stejných poměrech. Zastoupení symbiotických a potenciálně patogenních bakterií u dělnic a kulek včely medonosné je shrnuto v obrázcích 1 až 18.

Z obrázků je patrné, že celkové zastoupení *P. larvae* v celkovém mikrobiomu dělnic včely medonosné je velmi nízké. V případě vzorků kukel byla tato patogenní bakterie významnou součástí bakteriálního společenstva a to jak ve vzorcích odebraných v místech s klinickými příznaky moru včelího plodu, tak i v úlech bez klinických příznaků tohoto onemocnění.

Tabulka č. 5. Identifikace vybraných OTU pomocí databází RDP a GenBank ve vzorcích podle tabulky 1.

vztah hostitel x bal	OTU	druh	HIAM	HIAMK	HIAMK1	HIAMK3	HEAM	HEAMK	HEAMK1	RI0AM	RI0AMK	RI4AM	RI4AMK	S6AM	Z45AM	Z45AMK	Z51AM	Z51AMK	Z706AM	Z706AMK1	Z706AMK2
s	Otu00001	Lactobacillus apis	22074	42	139	814	13042	225	4175	6959	142	13047	320	12143	11648	44	19099	2299	9137	85	56
p	Otu00419	Bartonella bacilliformis	33404	17	229	4409	17731	155	919	6112	282	13292	248	11455	2661	39	12133	107	4240	56	26
s	Otu00007	Bifidobacterium asteroides	21610	14	39	274	26235	41	272	291	109	7120	66	2854	6040	3	12149	99	19576	6	8
s	Otu00003	Gilliamella apicola	10371	24	311	427	12627	140	865	2386	60	9064	153	8439	20831	10	17302	1752	9964	16	8
s	Otu00002	Snodgrassella alvi	12208	12	4	297	6542	20	762	1028	70	5187	158	5169	8925	20	22795	1068	13213	11	4
s	Otu00005	Gilliamella apicola	5343	11	131	226	7461	47	454	2482	165	4568	109	7555	15984	24	13181	1018	7827	11	14
s	Otu00006	Lactobacillus helsingborgensis	9075	55	101	1095	10646	72	301	730	413	4416	145	7158	8625	28	10294	331	8577	8	21
s	Otu00015	Lactobacillus mellis	8598	23	49	561	10046	43	936	1238	241	4325	152	3391	4672	18	8866	467	14593	0	10
p	Otu00050	Paenibacillus larvae	3609	17833	33	16	34	292	115	1731	1614	97	695	36	19725	1273	39	14	17	28	15
p	Otu00004	Enterococcus faecalis	70	28	1346	12	61	45	17	51	87	128	98	102	74	11	31	10	74	20189	12041
s	Otu00009	Frischella perrara	3554	5	45	99	953	2	37	2106	91	2400	71	1040	4051	2	7173	457	4034	4	6
s	Otu00035	Commensalibacter intestini	2706	5	10	67	736	0	77	282	21	2000	12	331	5633	3	6587	805	4903	10	3
s	Otu00172	Swingsia samuiensis	3544	3	10	507	1779	0	41	1807	194	5969	5	1609	3912	0	2254	24	1450	8	5
s	Otu00008	Lactobacillus kullabergensis	1618	3	5	920	3482	3	426	389	53	1369	24	2705	3683	1	2540	104	5284	16	6
s	Otu00010	Lactobacillus kimbladii	4632	18	68	679	3396	193	264	211	200	861	158	912	5203	16	989	555	3835	1	7
s	Otu00011	Bifidobacterium coryneforme	1424	2	7	11	1799	0	36	255	17	2234	1	150	1729	0	2021	149	5416	0	2
s	Otu00063	Lactobacillus mellifer	1316	0	66	162	1387	0	191	482	154	1967	70	865	557	12	1636	164	3873	0	0
p	Otu00264	Paenochrobactrum glaciei	2339	0	0	346	1853	0	73	816	0	1226	9	1980	421	0	682	2	298	4	0
s	Otu00016	Lactobacillus helsingborgensis	653	14	0	73	2066	0	124	102	801	983	479	732	987	53	510	37	1515	5	6
p	Otu00021	Moheibacter sediminis	8	0	0	0	30	0	0	66	0	9	12	10	3165	0	299	8	2321	0	0
s	Otu00024	Frischella perrara	1314	0	0	11	209	0	5	209	1	879	3	78	1193	0	785	2	479	3	1
s	Otu00025	Frischella perrara	124	0	1	4	73	0	0	26	0	703	10	44	113	0	2087	7	165	0	0
p	Otu00049	Spiroplasma melliferum	72	43	159	0	76	4	0	18	27	84	10	117	36	2	1	25	2647	3	0
s	Otu00039	Lactobacillus kullabergensis	743	0	0	1	335	0	54	3	0	159	21	49	68	0	492	3	513	0	0
p	Otu00043	Dysgonomonas capnocytop.	4	0	0	0	81	80	0	36	0	6	0	5	1619	0	4	0	185	1	1
p	Otu00044	Citrobacter freundii	159	0	0	0	5	0	0	375	0	2	0	19	2	0	1329	0	8	0	0

Tabulka č. 5. Identifikace vybraných OTU pomocí databází RDP a GenBank - pokračování 1.

vztah hostitel x bal	OTU	druh	HIAM	HIAMK	HIAMK1	HIAMK3	H2AM	H2AMK	H2AMK1	R10AM	R10AMK	R14AM	R14AMK	S6AM	Z45AM	Z45AMK	Z51AM	Z51AMK	Z706AM	Z706AMK1	Z706AMK2
p	Otu00033	Klebsiella pneumoniae	60	0	0	0	7	0	0	1	0	3	0	0	3	0	1804	0	7	0	0
p	Otu00057	Hafnia alvei	927	0	0	37	13	0	6	133	0	192	0	16	4	0	501	1	14	0	1
p	Otu01428	Bartonella rattimassiliensis	1	0	0	1750	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
s	Otu00148	Gilliamella apicola	463	4	0	1	19	0	98	7	0	7	0	5	48	0	27	4	969	0	0
s	Otu00020	Gilliamella apicola	191	0	0	4	241	1	51	18	0	172	0	94	501	0	239	8	125	0	0
s	Otu00027	Frischella perrara	77	1	1	3	27	0	3	8	0	412	0	6	202	0	319	4	544	1	0
p	Otu00052	Serratia liquefaciens	9	0	0	0	3	0	0	4	0	39	0	1	1	0	1485	1	3	0	0
p	Otu00238	Morganella morganii	55	25	1	0	76	235	0	12	5	13	8	922	24	2	1	13	0	1	0
s	Otu00017	Gilliamella apicola	66	0	0	0	81	0	2	10	2	80	0	57	324	0	288	4	326	0	0
s	Otu00104	Parasaccharibacter apium	50	3	694	0	14	24	5	14	5	244	47	51	28	16	16	3	16	0	1
s	Otu00084	Lactobacillus crispatus	24	0	0	0	46	0	0	25	19	383	2	142	100	0	51	31	324	1	0
s	Otu00019	Lactobacillus melliventris	23	0	5	31	154	0	9	17	2	31	4	143	155	0	293	8	242	1	0
p	Otu00067	Kluyvera intermedia	829	1	0	23	0	0	66	31	0	5	0	4	1	0	135	0	0	0	0
p	Otu00128	Bacillus cereus	5	0	0	0	1	220	1	4	168	9	635	1	6	23	0	1	0	2	0
p	Otu00056	Tatumella	824	0	0	40	3	0	9	0	0	1	0	66	1	0	53	0	1	1	0
s	Otu00012	unclassified	144	0	0	1	33	0	0	4	1	111	0	4	165	0	358	1	169	0	0
s	Otu00018	Gilliamella	72	0	1	1	102	0	1	11	0	95	3	82	164	0	308	12	113	0	0
p	Otu00094	Yersinia	570	1	28	12	4	0	15	10	2	4	0	8	7	0	246	0	3	1	0
s	Otu00072	Frischella	23	0	0	12	33	0	0	0	0	19	0	96	12	0	604	77	30	1	0
s	Otu00014	Gilliamella	122	0	7	2	103	0	13	28	4	53	1	63	158	0	164	8	161	1	1
p	Otu00054	unclassified	479	0	0	3	36	21	0	0	0	4	10	2	0	0	322	2	2	0	0
p	Otu00013	unclassified	5	0	5	5	175	0	20	22	0	34	0	30	393	0	76	0	103	5	0
p	Otu00088	unclassified	12	0	0	0	33	0	1	18	10	339	4	165	19	0	10	18	234	0	0
p	Otu00038	Escherichia/Shigella	46	2	7	0	5	0	0	150	2	45	2	14	4	1	557	5	4	1	0
p	Otu00085	Staphylococcus	0	1	419	1	1	0	0	15	46	35	254	0	4	4	1	1	0	2	3
s	Otu00022	Frischella	102	0	0	1	32	0	0	11	0	69	0	7	120	0	245	2	108	0	0

Tabulka č. 5. Identifikace vybraných OTU pomocí databází RDP a GenBank - pokračování 2.

vztah hostitel x bal	OTU	druh	H1AM	H1AMK	H1AMK1	H1AMK3	H2AM	H2AMK	H2AMK1	R10AM	R10AMK	R14AM	R14AMK	S6AM	Z45AM	Z45AMK	Z51AM	Z51AMK	Z706AM	Z706AMK1	Z706AMK2
p	Otu00167	unclassified	462	0	0	0	2	0	0	0	30	11	0	0	1	0	2	0	131	0	0
p	Otu00031	unclassified	8	0	0	0	182	0	28	93	0	3	0	20	51	0	151	31	37	2	0
p	Otu00135	Melissococcus plutonius	86	0	0	0	86	0	0	0	0	57	0	0	98	0	127	0	136	0	0
p	Otu00032	unclassified	256	0	0	3	121	0	45	1	0	40	0	14	12	0	0	3	80	0	0
p	Otu00139	unclassified	60	2	24	0	58	31	1	3	0	44	74	31	36	0	125	4	29	0	1
p	Otu00083	Enterobacter	45	0	0	0	25	0	0	4	0	1	1	3	10	0	405	18	0	0	1
s	Otu00028	Gilliamella	53	0	0	0	71	1	0	7	0	73	0	0	120	0	144	0	41	0	0
p	Otu00123	unclassified	4	1	0	0	19	9	0	21	0	8	7	25	374	0	3	0	27	0	1
p	Otu00023	unclassified	60	0	0	99	18	1	0	3	0	29	3	78	28	0	54	0	111	0	0
p	Otu00026	unclassified	21	0	0	23	113	0	2	6	0	25	0	47	44	0	67	0	136	0	0
p	Otu00061	unclassified	20	0	0	0	191	0	5	0	0	22	0	52	41	0	93	0	60	0	0
p	Otu00029	unclassified	108	0	0	2	124	0	6	3	0	56	0	35	87	0	8	1	52	0	0
p	Otu00138	Fructobacillus	92	0	0	0	60	0	0	0	0	41	0	6	64	0	106	0	94	1	0
p	Otu00079	unclassified	50	0	0	3	40	0	0	6	0	24	2	36	42	0	89	3	137	0	0
p	Otu00175	Pseudomonas	5	3	240	0	7	0	0	2	0	113	18	14	8	0	1	3	0	0	0
s	Otu00097	unclassified	70	0	0	1	16	0	0	0	2	36	0	43	32	0	100	0	95	0	0
p	Otu00113	unclassified	1	1	212	0	0	0	1	159	1	2	1	2	6	0	2	0	0	0	0
p	Otu00122	Raoultella	33	0	11	0	2	0	4	0	0	4	0	0	0	0	330	0	0	0	0
p	Otu01505	Sphingomonas	0	1	24	0	2	0	0	2	93	7	45	0	2	170	0	0	0	0	26
p	Otu00042	unclassified	50	0	0	20	127	0	7	0	1	40	0	12	16	0	8	1	62	1	0
s	Otu00051	Lactobacillus	19	1	0	1	27	0	1	4	0	11	3	150	33	2	50	0	39	1	3
p	Otu00131	unclassified	68	0	0	15	0	0	0	2	0	63	15	27	2	0	149	0	0	0	0
p	Otu00116	unclassified	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	150	0	14	0	173	0	0
p	Otu00365	Arsenophonus	34	19	0	0	31	146	0	8	4	7	6	51	13	0	0	12	0	0	0
p	Otu00146	Proteus	14	0	0	0	1	0	0	8	0	3	0	0	0	0	272	1	15	0	0
p	Otu00062	unclassified	70	0	0	0	8	0	9	2	0	1	0	13	142	0	42	1	16	0	0

Tabulka č. 5. Identifikace vybraných OTU pomocí databází RDP a GenBank - pokračování 3.

vztah hostitel x bakterie	OTU	druh	H1AM	H1AMK	H1AMK1	H1AMK3	H2AM	H2AMK	H2AMK1	R10AM	R10AMK	R14AM	R14AMK	S6AM	Z45AM	Z45AMK	Z51AM	Z51AMK	Z706AM	Z706AMK1	Z706AMK2
s	Otu00531	Acinetobacter	0	0	238	0	0	0	0	0	23	31	0	0	0	0	0	0	0	1	0
p	Otu00090	unclassified	1	0	5	0	62	0	1	0	11	8	4	11	20	0	49	0	103	0	0
p	Otu00163	unclassified	0	0	0	0	0	0	131	1	0	4	0	1	2	0	51	0	78	0	0
p	Otu00096	unclassified	1	0	0	0	4	3	0	7	0	36	1	15	174	0	1	0	18	1	0
s	Otu00041	Gilliamella	21	0	0	0	26	0	5	3	0	25	0	19	55	0	76	5	25	0	0
s	Otu00037	Gilliamella	16	0	2	0	31	1	0	6	0	37	0	10	66	0	57	1	31	0	0
p	Otu00059	unclassified	25	0	0	33	3	0	0	3	2	81	5	24	67	0	2	0	7	2	1
p	Otu00216	Propionibacterium	1	1	22	0	0	17	0	31	72	26	28	3	5	39	0	2	1	0	0
p	Otu00102	unclassified	0	0	0	0	5	0	0	55	0	0	0	69	51	0	31	0	30	1	0
p	Otu00515	Sphingomonas	0	0	49	0	0	0	0	3	32	67	21	0	4	58	0	1	1	0	0
p	Otu00030	unclassified	42	0	0	0	44	0	0	0	0	7	0	0	20	0	84	0	37	0	0
p	Otu00069	Pantoea	19	0	2	8	5	0	1	0	10	14	2	6	4	0	128	11	22	0	0
p	Otu00192	Staphylococcus	1	0	44	0	1	0	0	6	52	12	88	3	7	2	4	0	1	0	0
p	Otu00190	Pseudomonas	0	0	0	0	2	0	0	0	1	203	8	1	0	0	3	0	2	0	0
s	Otu00060	Bifidobacterium	14	0	0	0	3	0	0	0	0	15	0	7	7	0	69	0	100	0	0
p	Otu00045	unclassified	44	0	0	7	2	0	0	15	0	62	0	20	5	1	5	8	42	1	1
p	Otu00055	unclassified	11	0	0	0	21	0	0	12	0	12	0	85	19	0	15	0	33	0	0
p	Otu00204	unclassified	11	0	0	0	10	0	3	3	0	9	0	147	12	0	8	0	4	0	0
p	Otu00400	Bacillus	0	0	0	0	3	0	0	0	69	0	68	0	22	38	1	0	0	0	0
s	Otu00040	Gilliamella	16	0	0	2	17	0	1	10	1	16	0	27	37	0	52	0	21	0	0
s	Otu00068	Frischella	39	0	0	0	6	0	0	13	0	16	0	3	48	0	60	1	14	0	0
s	Otu00046	Gilliamella	33	0	0	1	15	0	1	0	0	34	1	19	19	0	46	2	26	0	0
p	Otu00080	unclassified	27	0	0	3	6	0	2	0	0	18	0	12	19	0	5	0	98	0	0
s	Otu00248	Gilliamella	2	0	0	0	3	0	0	2	0	0	0	1	181	0	0	0	0	0	0
p	Otu03606	Carnimonas	0	0	0	0	0	188	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
s	Otu00074	Gilliamella	18	0	0	0	13	0	0	0	0	26	0	3	12	0	85	0	28	0	0

Tabulka č. 5. Identifikace vybraných OTU pomocí databází RDP a GenBank - pokračování 4.

vztah hostitel x bal	OTU	druh	H1AM	H1AMK	H1AMK1	H1AMK3	H2AM	H2AMK	H2AMK1	R10AM	R10AMK	R14AM	R14AMK	S6AM	Z45AM	Z45AMK	Z51AM	Z51AMK	Z706AM	Z706AMK1	Z706AMK2
p	Otu00034	unclassified	5	0	1	1	5	0	0	3	0	9	0	131	3	0	10	0	9	2	2
p	Otu00058	unclassified	42	0	0	0	23	0	4	0	0	15	0	11	32	0	28	1	15	0	0
p	Otu00287	Tatumella	160	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	5	0	0	0	0
p	Otu00064	unclassified	58	0	0	0	12	0	12	5	0	14	0	14	15	0	9	2	26	0	0
p	Otu00036	unclassified	41	1	0	29	2	0	4	1	0	23	0	16	16	0	7	0	22	3	0
p	Otu00358	unclassified	30	1	0	0	66	0	1	1	0	11	0	49	2	0	0	0	0	0	0
s	Otu00967	Acinetobacter	0	0	114	0	1	0	0	0	0	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p	Otu00071	unclassified	5	0	0	1	13	0	5	3	0	11	0	62	5	0	11	0	31	0	0
p	Otu00048	unclassified	16	0	0	3	60	0	14	1	0	3	0	11	11	0	7	5	9	0	0
p	Otu00155	unclassified	1	0	0	4	115	0	0	0	0	1	0	1	1	0	4	0	6	0	0
p	Otu00193	Serratia	2	1	0	0	0	0	0	93	0	0	0	1	1	1	33	1	0	0	0
p	Otu00171	Enhydrobacter	0	3	31	0	0	0	1	9	17	8	24	3	4	28	0	0	1	0	1
p	Otu02013	unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	130	0	0	0	0	0	0	0
p	Otu02916	unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	63	35	0	0	0	0	0	0
s	Otu00114	Gilliamella	72	0	0	0	1	0	17	1	0	3	0	0	0	0	11	0	20	0	0
p	Otu00087	unclassified	0	0	0	1	2	0	2	4	0	3	0	5	1	0	2	0	79	22	0
p	Otu00215	unclassified	1	0	0	0	1	0	0	3	0	17	0	11	16	0	58	0	10	0	0
p	Otu00126	unclassified	34	1	0	0	4	0	0	2	0	11	0	0	31	0	14	0	18	0	0
s	Otu00077	Gilliamella	13	0	1	2	21	0	3	0	0	3	0	6	12	0	14	0	39	0	0
p	Otu00093	unclassified	53	0	0	0	17	0	2	1	0	6	0	11	3	0	5	0	15	0	0
p	Otu00053	unclassified	3	0	0	14	18	0	2	1	0	1	0	5	22	0	7	0	35	2	0
p	Otu00075	unclassified	18	0	0	0	41	0	0	1	0	2	0	7	9	0	22	0	10	0	0
s	Otu00101	Gilliamella	3	0	0	0	9	0	0	3	0	0	0	0	48	0	43	0	2	0	0
p	Otu00047	unclassified	3	0	0	1	7	0	0	0	0	26	0	11	14	0	11	0	34	0	0
s	Otu00081	Gilliamella	17	0	0	0	26	0	2	1	0	3	0	3	28	0	5	0	5	16	0
p	Otu00511	unclassified	4	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	33	0	67	0	0	0	0

Tabulka č. 5. Identifikace vybraných OTU pomocí databází RDP a GenBank - pokračování 5.

vztah hostitel x bal	OTU	druh	HIAM	HIAMK	HIAMK1	HIAMK3	H2AM	H2AMK	H2AMK1	R10AM	R10AMK	R14AM	R14AMK	S6AM	Z45AM	Z45AMK	Z51AM	Z51AMK	Z706AM	Z706AMK1	Z706AMK2
p	Otu00073	unclassified	20	0	0	0	18	0	0	0	0	6	0	2	24	0	14	0	19	0	0
p	Otu00107	unclassified	2	0	0	0	6	0	60	1	0	0	0	0	12	0	0	0	20	0	1
p	Otu00089	unclassified	14	0	0	0	19	0	8	0	0	7	0	38	5	0	3	0	7	0	0
p	Otu00098	unclassified	15	0	0	0	11	0	3	0	0	0	0	8	15	0	35	0	13	0	0
p	Otu00240	unclassified	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	91	0	0	0	0
p	Otu00065	unclassified	4	0	2	6	17	0	8	12	1	9	0	6	2	0	9	0	21	0	0
p	Otu00819	Ralstonia	0	1	51	0	0	0	0	0	34	3	0	0	1	6	0	1	0	0	0
p	Otu00095	unclassified	0	0	0	0	0	0	31	30	0	3	0	22	1	0	2	0	7	0	0
s	Otu00076	Gilliamella	12	0	1	0	13	0	0	0	0	4	0	3	28	0	25	0	9	0	0
p	Otu00158	unclassified	32	0	0	4	13	0	1	13	1	6	0	14	3	0	8	0	0	0	0
s	Otu00809	Sphingobium	0	0	91	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
p	Otu00086	unclassified	13	0	0	1	8	0	0	1	0	2	3	3	24	0	10	0	28	0	0
s	Otu00066	Gilliamella	9	0	3	0	17	0	1	5	0	13	0	10	16	0	11	0	7	0	0
p	Otu00092	unclassified	28	0	0	0	4	0	3	0	0	2	0	0	15	0	10	1	29	0	0
p	Otu00168	unclassified	4	0	0	0	16	0	0	0	0	5	0	3	3	0	16	1	44	0	0
s	Otu00233	unclassified	8	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	3	0	3	0	76	0	0
p	Otu26133	Sphingomonas	0				0			0		0		0	0		0		0		
p	Otu00693	unclassified	2	64	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0
p	Otu00731	Enterococcus	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	43	43
s	Otu00078	Gilliamella	7	0	0	0	14	0	0	1	0	3	0	6	22	0	17	0	17	0	0
p	Otu00103	unclassified	1	0	0	1	2	0	16	0	0	3	0	9	4	0	15	0	33	2	0
p	Otu00521	unclassified	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83	0	1	0	0
s	Otu00117	Frischella	13	0	0	0	2	0	0	1	0	24	0	0	15	0	27	0	2	0	0
s	Otu00145	Frischella	5	0	0	0	1	0	0	0	0	17	0	0	3	0	55	0	2	0	0
p	Otu00234	Providencia	7	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0	71	0	1	0	0
p	Otu00313	Providencia	32	0	0	1	0	0	0	0	0	13	0	0	7	0	30	0	0	0	0

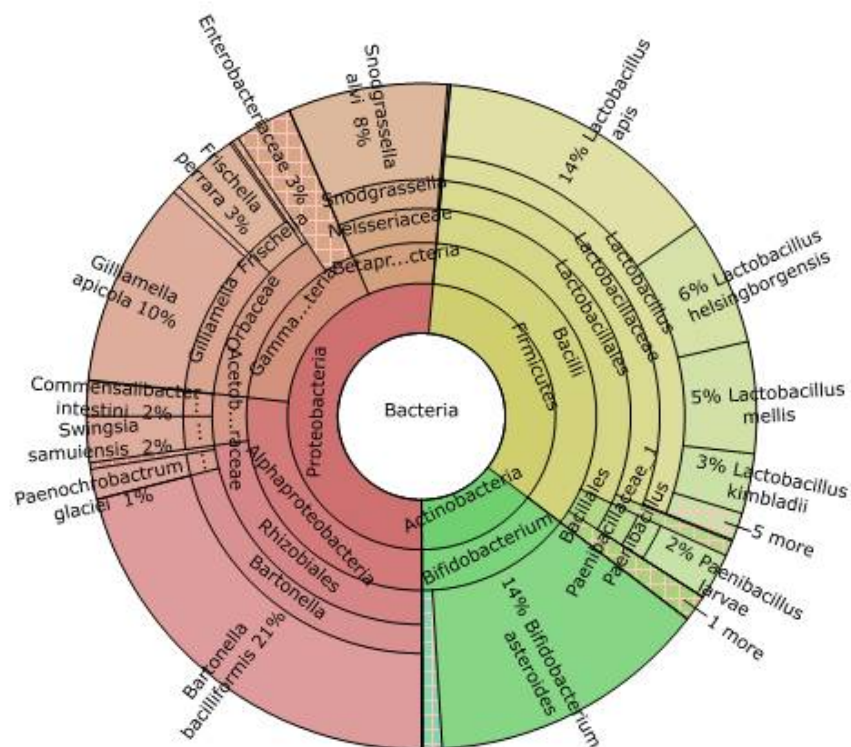
Tabulka č. 5. Identifikace vybraných OTU pomocí databází RDP a GenBank - pokračování 6.

vztah hostitel x bal	OTU	druh	H1AM	H1AMK	H1AMK1	H1AMK3	H2AM	H2AMK	H2AMK1	R10AM	R10AMK	R14AM	R14AMK	S6AM	Z45AM	Z45AMK	Z51AM	Z51AMK	Z706AM	Z706AMK1	Z706AMK2
s	Otu00149	Bifidobacterium	12	0	0	0	1	0	0	0	0	15	0	0	0	0	15	0	39	0	0
p	Otu00185	unclassified	8	0	0	0	9	0	1	0	0	1	0	56	0	0	6	0	1	0	0
p	Otu01239	unclassified	0	0	0	0	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p	Otu00082	unclassified	23	0	0	0	7	0	5	0	0	1	0	13	16	0	5	0	11	0	0
s	Otu00091	Gilliamella	25	0	0	0	3	0	0	1	0	5	0	1	7	0	32	0	7	0	0
s	Otu00133	Gilliamella	2	0	0	0	10	0	0	1	0	2	0	1	2	0	7	0	54	1	0
p	Otu00173	unclassified	38	0	0	2	17	0	0	0	0	3	0	7	2	0	9	0	0	0	0
p	Otu00070	unclassified	2	0	5	1	16	0	0	7	0	9	0	4	8	0	9	0	14	0	0
s	Otu00308	unclassified	0	0	0	0	3	0	0	3	0	1	0	0	2	0	62	2	1	0	0
s	Otu00111	Frischella	17	0	0	0	0	0	0	1	0	10	0	0	12	0	24	4	4	0	0
s	Otu00205	unclassified	8	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	9	0	35	0	8	0	0
p	Otu00100	unclassified	5	0	0	32	2	0	0	1	0	1	0	2	15	0	2	0	8	0	0
p	Otu00179	Morganella	6	5	0	0	14	0	0	11	0	1	0	15	6	0	5	5	0	0	0
p	Otu00812	Caulobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	8	1	0	24	0	0	0	0	30
s	Otu01085	Gilliamella	0	0	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
s	Otu00442	Corynebacterium	1	0	10	0	0	0	0	3	0	4	38	0	2	9	0	0	0	0	0
s	Otu00109	Bifidobacterium	12	0	0	0	0	0	0	0	0	8	2	1	8	0	11	0	23	0	0
s	Otu00203	Orbus	48	0	0	5	2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	5	0	0	0
s	Otu00209	Bifidobacterium	30	0	0	7	2	0	0	0	0	23	0	0	0	0	2	0	0	0	0
p	Otu01530	Flavobacterium	0	0	16	0	0	1	0	0	5	0	0	31	1	10	0	0	0	0	0
s	Otu00162	Frischella	9	0	0	0	1	0	0	0	0	14	0	0	8	0	22	0	9	0	0
s	Otu00124	Gilliamella	1	0	0	0	2	0	0	1	0	3	0	0	22	0	24	0	9	0	0
p	Otu00161	unclassified	1	0	0	5	6	0	0	0	0	1	0	8	1	0	0	0	40	0	0
s	Otu00157	unclassified	3	0	0	0	2	0	0	1	0	18	0	2	3	0	10	0	22	0	0
p	Otu00339	unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	58	0	0	0	0
s	Otu03678	Gluconobacter	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	47	0	0	0	0	1	0	0

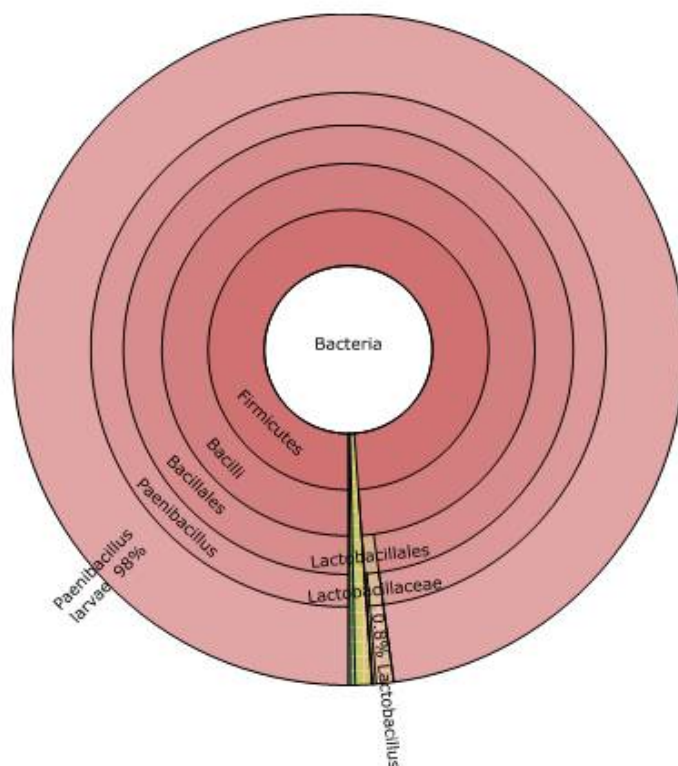
Tabulka č. 5. Identifikace vybraných OTU pomocí databází RDP a GenBank - dokončení.

vztah hostitel x bakterie	OTU	druh	H1AM	H1AMK	H1AMK1	H1AMK3	H2AM	H2AMK	H2AMK1	R10AM	R10AMK	R14AM	R14AMK	S6AM	Z45AM	Z45AMK	Z51AM	Z51AMK	Z706AM	Z706AMK1	Z706AMK2
s	Otu00184	Gilliamella	2	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	25	0	27	0	1	0	0
p	Otu00141	unclassified	46	0	0	0	4	0	2	2	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0
p	Otu00232	unclassified	24	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	26	0	0	0	4	0	0
p	Otu00808	Bradyrhizobium	0	0	3	0	0	0	0	22	1	29	1	0	0	0	0	0	0	0	1
p	Otu00112	unclassified	13	0	0	0	21	0	0	0	0	1	0	6	2	0	7	2	4	0	0
p	Otu00118	unclassified	4	0	0	0	8	0	0	2	0	7	0	4	9	0	14	0	8	0	0
p	Otu00235	Staphylococcus	0	2	0	0	0	0	0	6	26	0	0	0	17	0	2	0	2	1	0
p	Otu00366	unclassified	17	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	23	5	0	0	0	7	0	0
p	Otu00417	Finnegoldia	0	5	27	0	0	0	0	7	0	1	14	0	1	1	0	0	0	0	0
p	Otu03963	Prevotella	0	0	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
p	Otu00105	unclassified	7	0	0	0	4	1	1	2	0	13	0	0	6	0	10	1	10	0	0
p	Otu00160	unclassified	11	0	0	0	1	0	0	0	0	8	0	1	6	0	10	0	18	0	0
p	Otu00402	Erwinia	2	1	2	0	0	0	0	0	19	0	20	0	5	6	0	0	0	0	0
p	Otu00227	unclassified	15	0	0	3	0	0	1	0	0	27	0	0	3	0	1	0	4	0	0
s	Otu00125	unclassified	1	0	0	0	6	0	0	1	1	0	0	4	19	0	14	0	7	0	0
p	Otu00274	unclassified	26	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	18	0	0
p	Otu00099	unclassified	3	0	0	0	7	0	1	3	0	1	0	0	16	0	7	1	12	0	0
s	Otu00106	Frischella	11	0	0	1	2	0	0	9	0	3	0	0	7	0	11	0	7	0	0
p	Otu00217	unclassified	19	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	3	0	0	4	0	21	0	0
p	Otu00132	unclassified	3	0	0	2	21	0	0	0	0	1	0	6	9	0	0	0	8	0	0
p	Otu00136	unclassified	1	0	0	0	5	0	2	4	0	10	0	1	3	0	1	0	21	2	0
p	Otu00207	unclassified	4	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	9	22	0	9	0	1	0	0

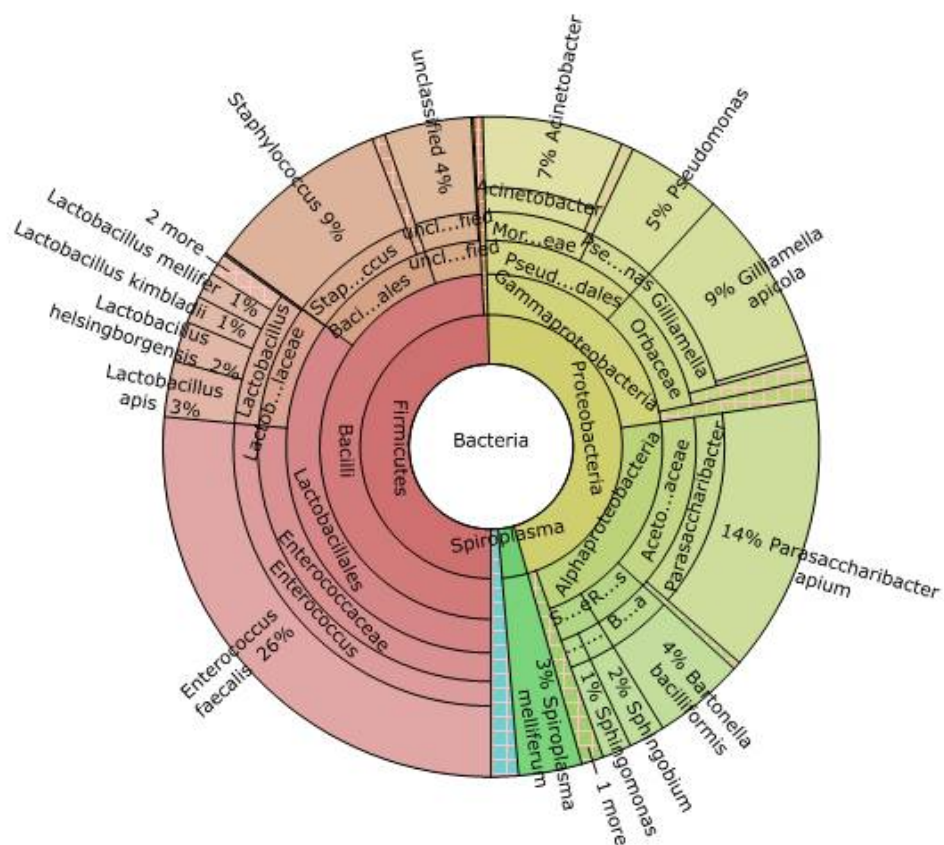
Legenda: s – symbiotické bakterie, p – potenciálně patogenní bakterie.



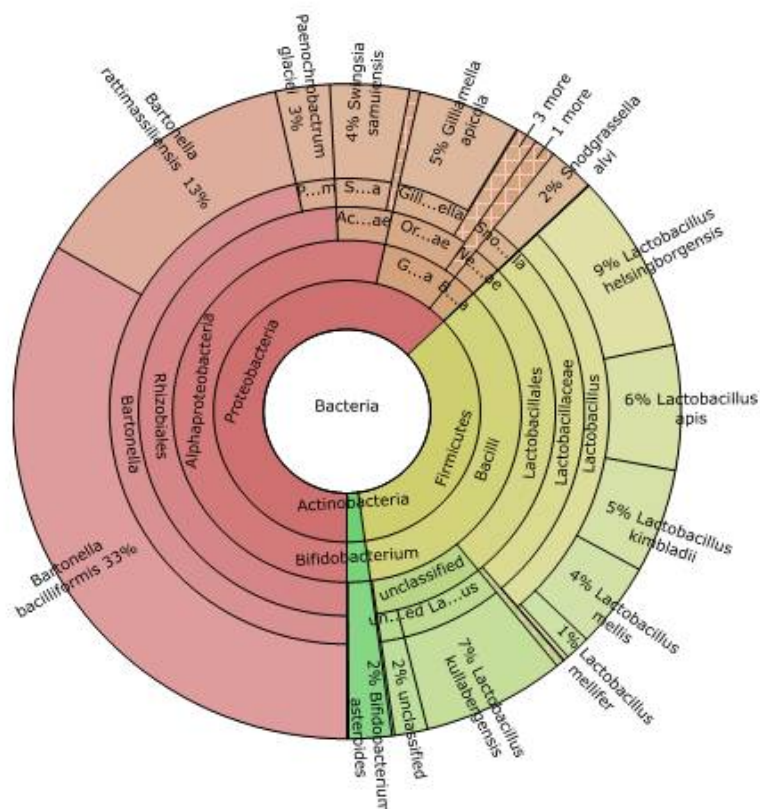
Obrázek 1. Mikrobiom dělnic včely medonosné, H1AM – lokalita: Horní Lhota, vzorky s klinickými příznaky moru včeliho plodu (2).



Obrázek 2. Mikrobiom kukly včely medonosné, H1AMK – lokalita: Horní Lhota, vzorky s klinickými příznaky moru včeliho plodu (2).



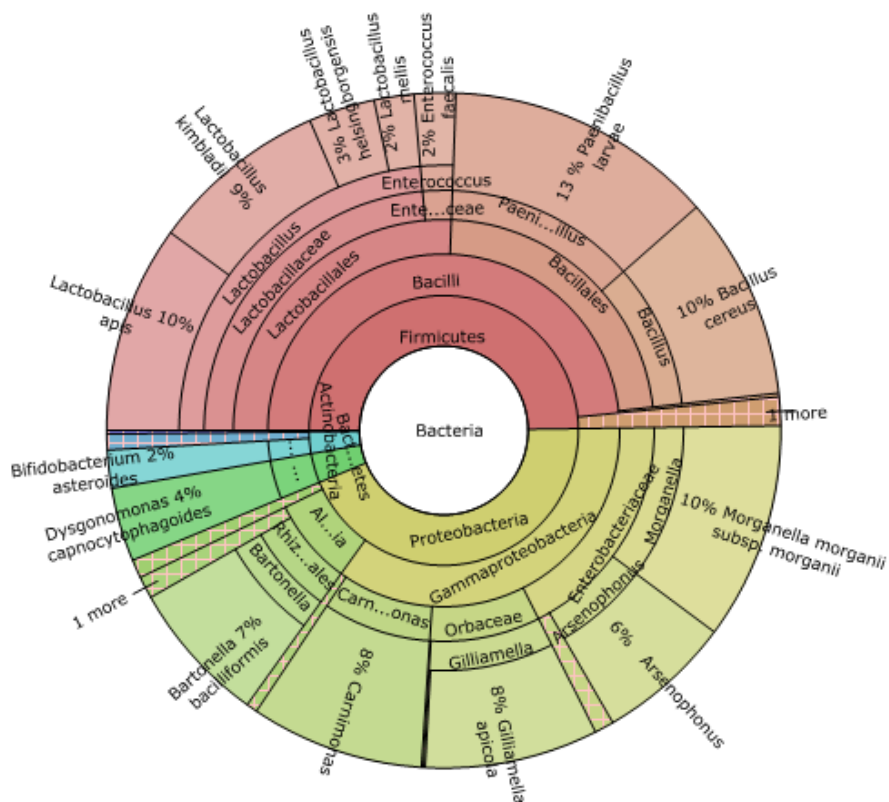
Obrázek 3. Mikrobiom kukly včely medonosné, H1AMK2 – lokalita: Horní Lhota, vzorky s klinickými příznaky moru včelího plodu (2).



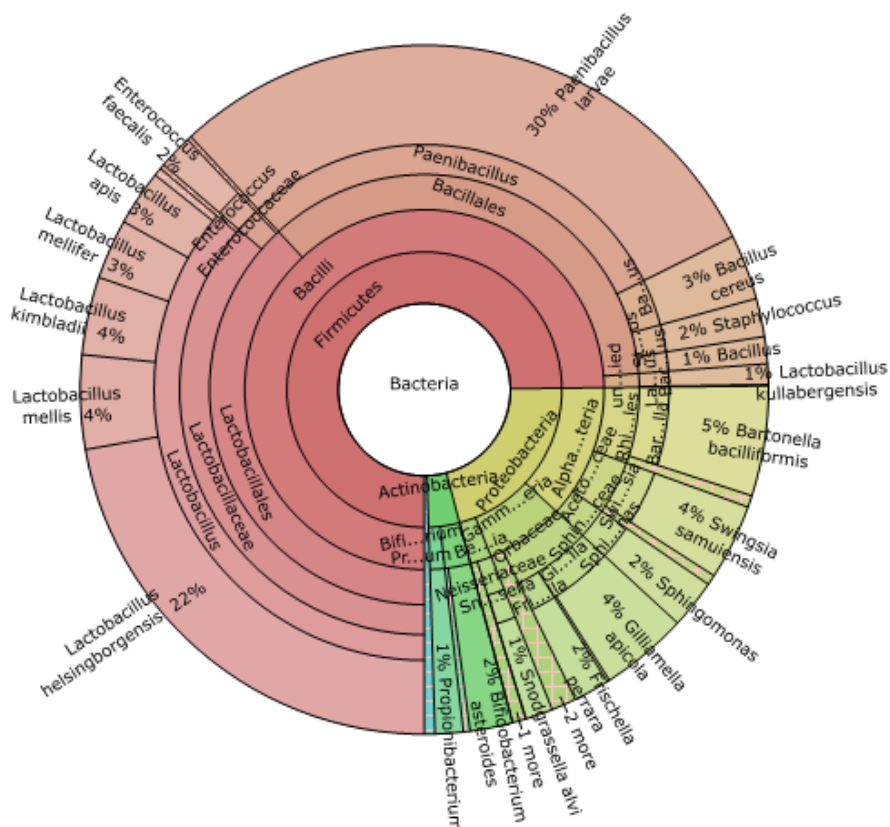
Obrázek 4. Mikrobiom kukly včely medonosné, H1AMK3 - lokalita: Horní Lhota, vzorky s klinickými příznaky moru včelího plodu (2).



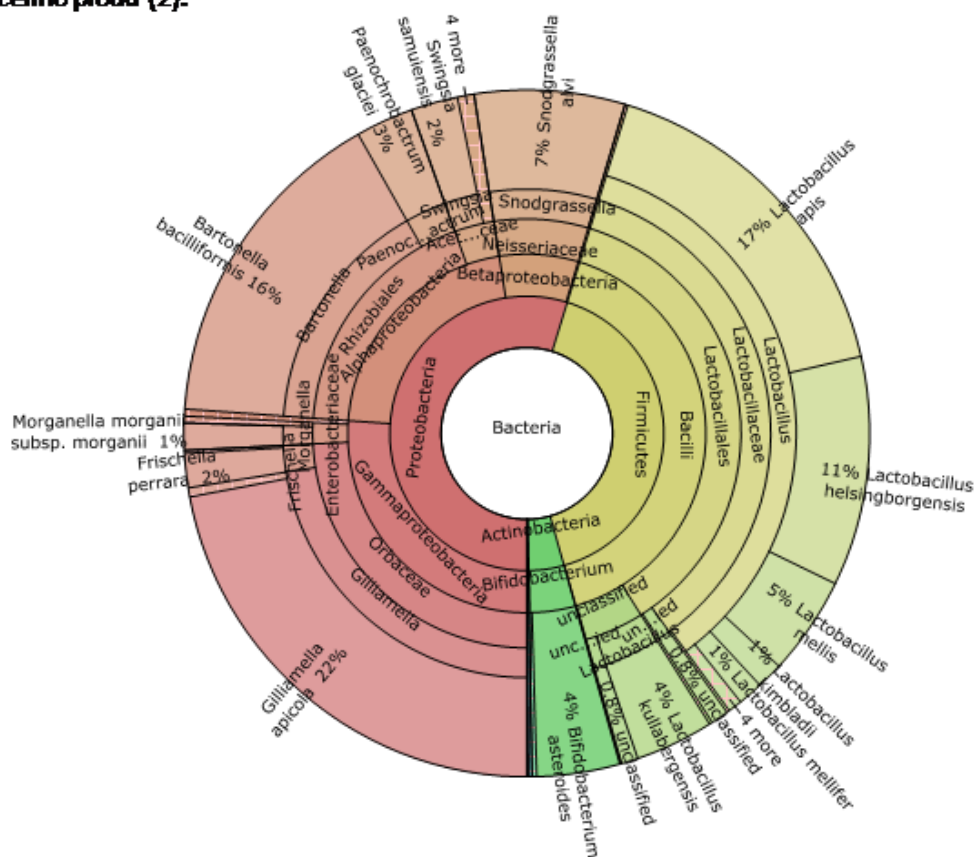
Obrázek 5. Mikrobiom dělnic včely medonosné, H2AM - lokalita: Horní Lhota, vzorky v morovém pásmu bez klinických příznaků moru včelího plodu (1).



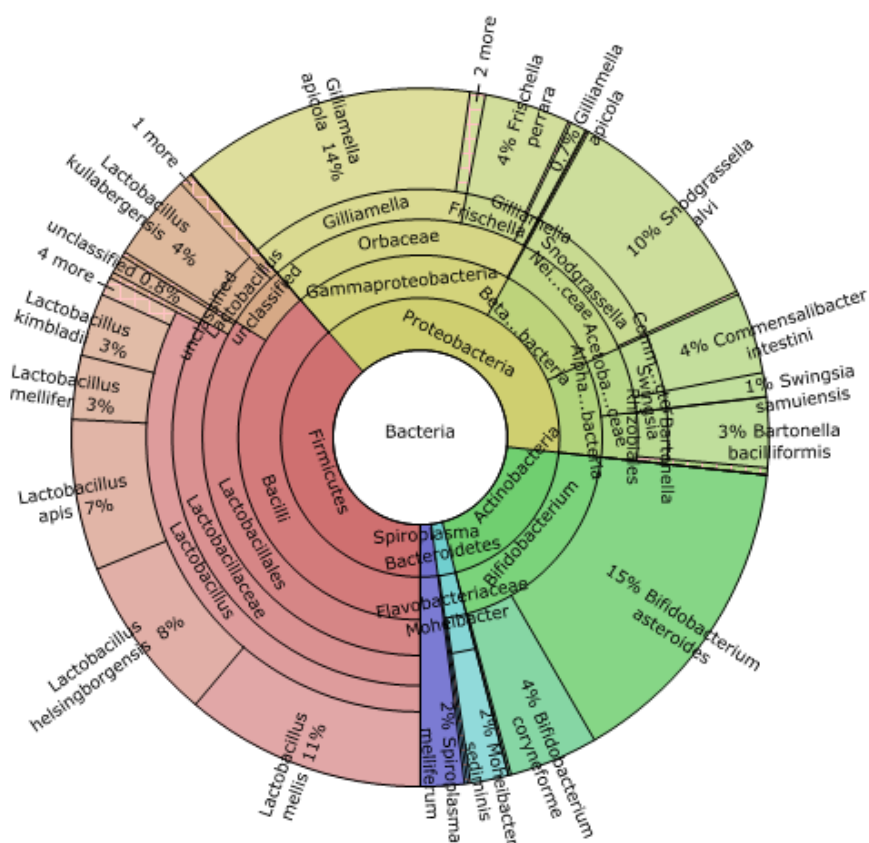
Obrázek 6. Mikrobiom kukly včely medonosné, H2AMK1 - lokalita: Horní Lhota, vzorky v morovém pásmu bez klinických příznaků moru včelího plodu (1).



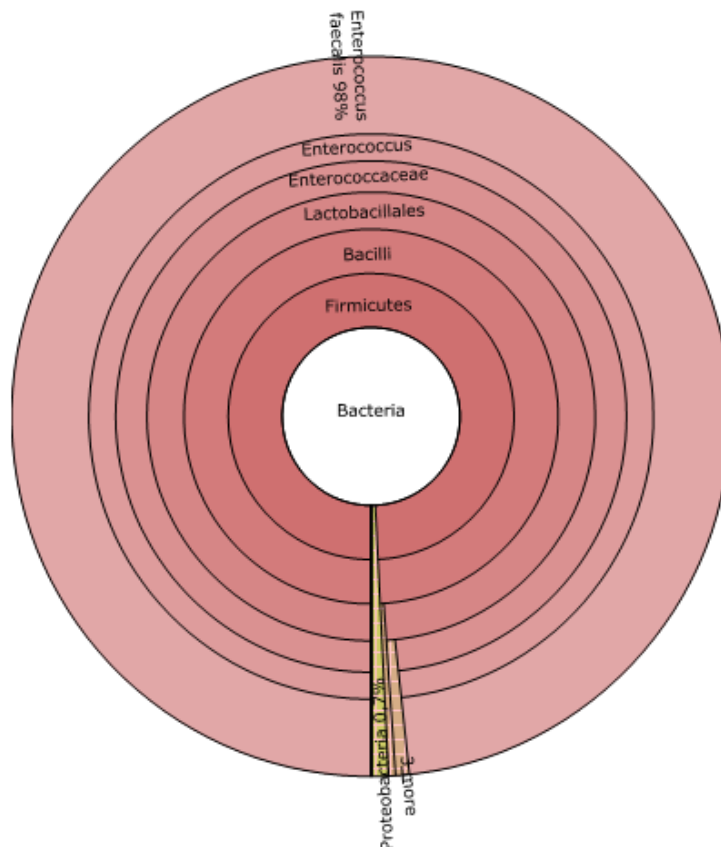
Obrázek 11. Mikrobiom kucky včely medonosné, R10AMK - lokalita: Rataje, vzorky s klinickými příznaky moru včeliho plodu (2).



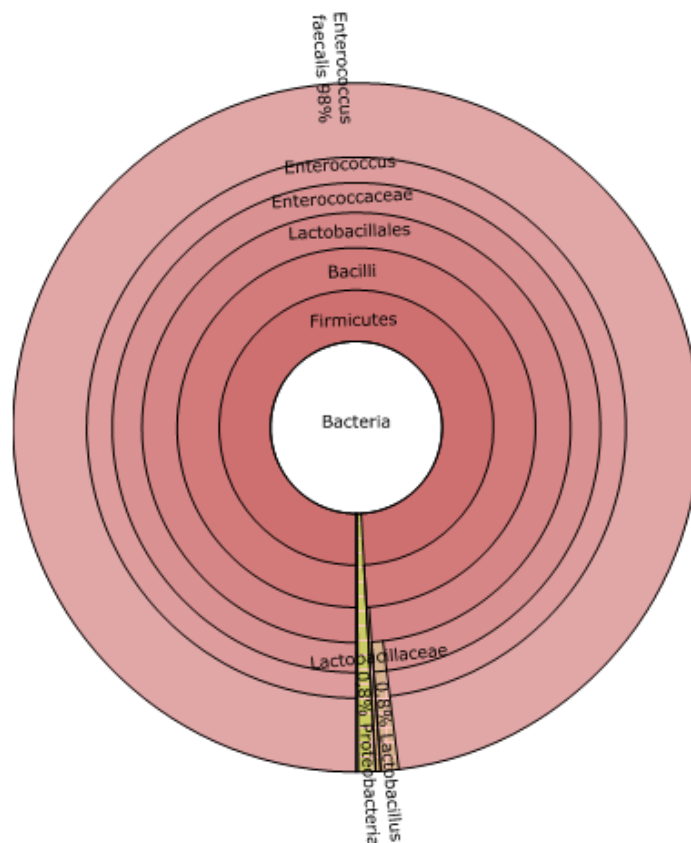
Obrázek 12. Mikrobiom dělnic včely medonosné, S6AM - lokalita: Hole, vzorky mimo morové pásmo (0).



Obrázek 17. Mikrobiom dělnic včely medonosné, Z706AM - lokalita: Štoky - Skřivánek, vzorky mimo morové pásmo (0)-



Obrázek 18. Mikrobiom kukly včely medonosné, Z706AMK1 - lokalita: Štoky - Skřivánek, vzorky mimo morové pásmo (0)



Obrázek 19. Mikrobiom kukly včely medonosné, Z706AMK2 - lokalita: Štoky - Skřivánek, vzorky mimo morové pásmo {0}.

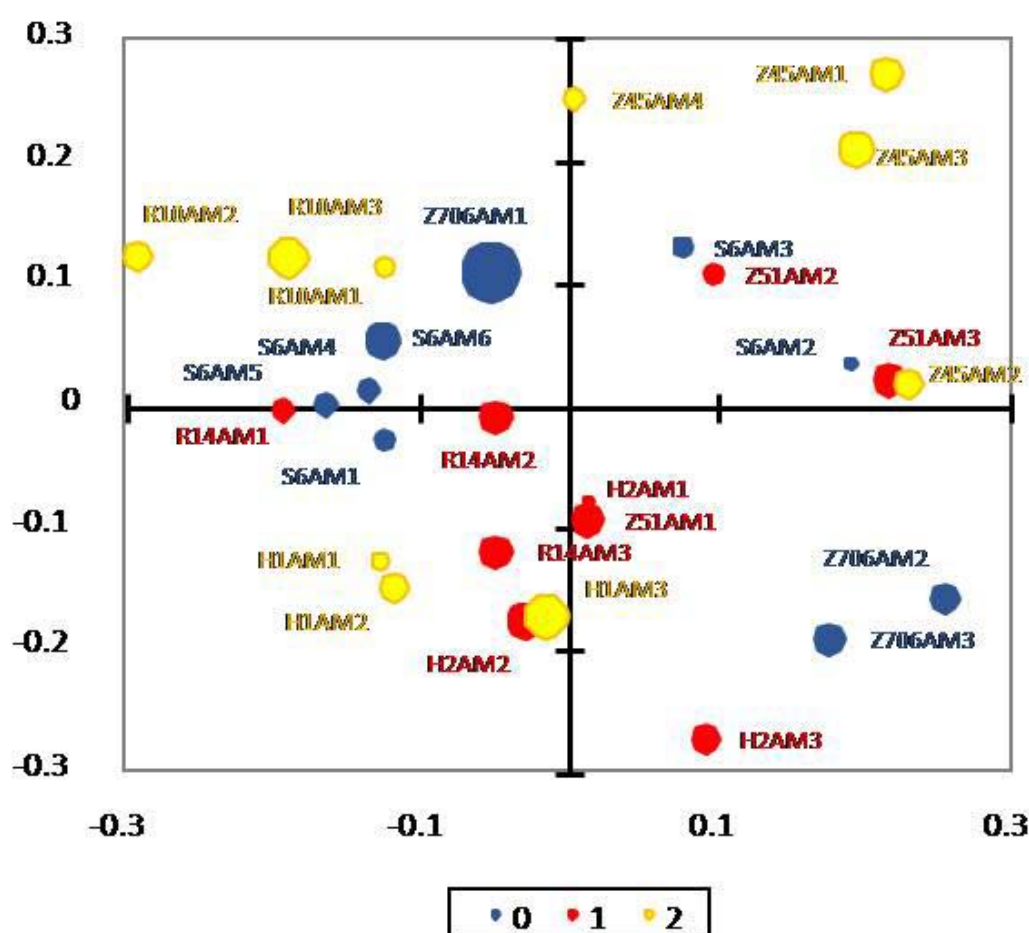
4.2 Ovlivňuje výskyt *Paenibacillus larvae* mikrobiom dělnic včely medonosné?

Vzhledem k velmi vyvinutému mikrobiomu symbiotických bakterií včel docházelo k překrytí výskytu sekvencí *P. larvae*, což se při statistických analýzách projevilo neprokázáním signifikantního efektu námi zvoleného faktoru, tj. rozdělením na kontrolní vzorky mimo morové pásmo (0), vzorky z morového pásma bez klinických příznaků moru včelího plodu (1), a vzorky ze včelstev s klinickými příznaky moru včelího plodu (2). Vypočtené indexy diverzity mikrobiomu u včelích dělnic nebyly signifikantně ovlivněny přítomností *P. larvae*, tj. Kruskal-Wallis test; počet sekvencí: $N_{(2,24)}=0.176$, $P = 0,176$; počet typů OTU Taxa_ $S_{(2,24)}=0.812$, $P = 0,812$; diverzity indexy Simpsonův index: $1-D_{(2,24)}=0.478$, $P = 0,478$; Chao index: $Chao-1_{(2,24)}=0.824$ $P = 0,824$.

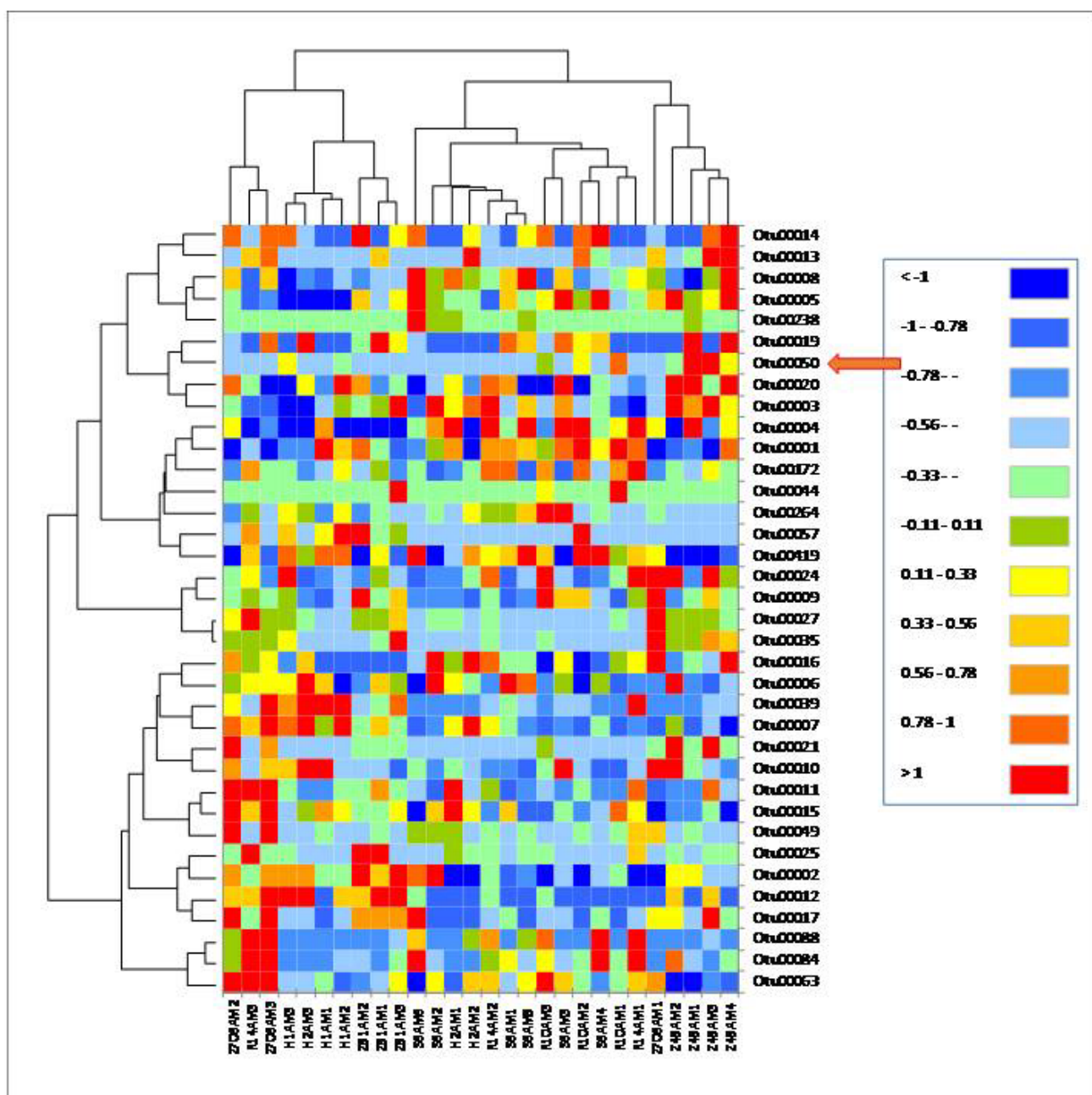
Kompozice mikrobiomu dělnic včely medonosné nebyla signifikantně ovlivněna námi zvoleným faktorem, tj. výskytem moru včelího plodu (AMOVA, $N=10000$ permutací, $F=0,05$, $P = 0,15$). Avšak mikrobiom dělnic byl signifikantně ovlivněn stanovištěm (AMOVA, $N=10000$ permutací, $F = 0,43$, $P < 0.001$). Podobnost vzorků a stanovišť byla vizualizována pomocí principal component analyse (PcoA), kde rozložení stanovišť vůči

prvním třem osám vysvětlilo 42% celkové variability (obrázek 20). METASTAT analýza neprokázala signifikantní rozdíl v relativní abundanci *P. larvae* v závislosti na výskytu onemocnění. Tyto výsledky byly vizualizovány pomocí heatmapy (obrázek 21), ve které je patrná vysoká variabilita výskytu *P. larvae* (OTU50) v jednotlivých vzorcích, a to i u vzorků pocházejících ze stejného stanoviště.

Tyto výsledky ukazují, že *P. larvae* neovlivňoval mikrobiom dělnic včely medonosné a vzhledem k dominanci symbiotických bakterií včely medonosné nelze uvedenou metodou detekovat výskyt této patogenní bakterie.



Obrázek 20. PcoA, dělnice včely medonosné, podobnost mikrobiomu vybraných potencionálně patogenních bakterií v jednotlivých vzorcích a stanovištích. Třetí rozměr obrázku určuje velikost bodu. Analýza vysvětlila 42% celkové variability v datovém souboru, vliv výskytu moru včelího plodu na distribuci jednotlivých vzorků byl nesignifikantní. Legenda: 0 – vzorky mimo morové pásmo, 1 – vzorky v morovém pásmu bez klinických příznaků moru včelího plodu, 2 – vzorky s klinickými příznaky moru včelího plodu.



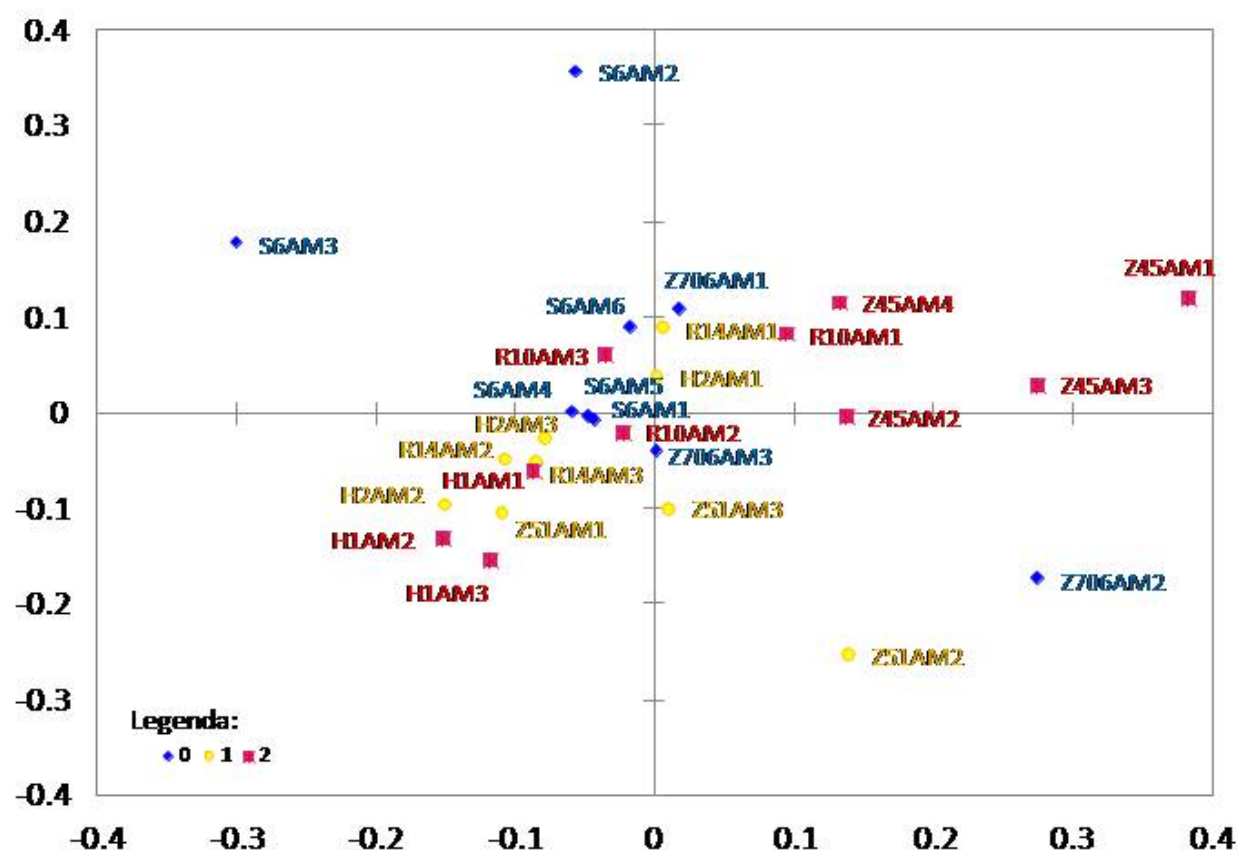
Obrázek 21. Heatmapa popisující zastoupení OTU v mikrobiomu ze vzorků dělnic včely medonosné. Šipka ukazuje OTU50 – *Paenibacillus larvae*.

4.3. Analýza části společenstva mikrobiomu s potencionálními patogeny

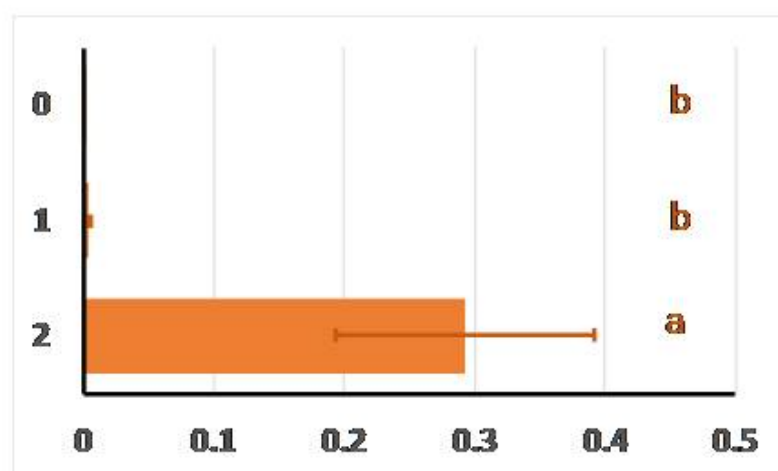
Pro odstínění mikrobiomu symbiontů byla bakteriální komunita dělnic včely medonosné rozdělena na symbiotické bakterie (Moran 2015) a bakterie potencionálně patogenní. Mezi potenciálně patogenní byly zařazeny také taxony, které byly identifikovány pouze do rodu a stejně tak jsme považovali za patogenní bakterie také skupinu Bartonellaceae (Alpha 1).

Celkem bylo vybráno 88 OTU s celkovým počtem sekvencí vyšším než 50, jednalo o 176 676 sekvencí. Patogenní mikrobiom dělnic byl signifikantně ovlivněn přítomností *P. larvae* (PERMANOVA, N permutací=10000, $F=2,07$, $P = 0,0134$). Kontrolní stanoviště se kompozicí patogenů lišila od stanoviště s klinickými příznaky výskytu moru včelího plodu (2), avšak ne od stanovišť v morovém pásmu bez klinických příznaků (1). Zároveň se lišila stanoviště v morovém pásmu bez klinických příznaků (1) od stanovišť s klinickými příznaky moru včelího plodu (2). Tuto situaci jsme vizualizovali pomocí multidiminsional scaling obrázku (stress=0,14, $R^2=0,85$). Z tohoto obrázku je patrné, že se vzorky včel na jednotlivých lokalitách od sebe liší, což indikuje různou kompozici potencionálně patogenních bakterií v mikrobiomu včel pocházejících ze stejného úlu. Kontrolní vzorky jsou soustředěny do záporných hodnot osy x a kladných hodnot osy y, s výjimkou vzorku Z706AM2. Vzorky z morového pásma formují dva shluky, první v pozici záporných hodnot os x a y a druhý shluk je naopak v pozici kladných hodnot obou os (obrázek 22).

Na populační úrovni identifikovala METASTAT analýza 14 OTU, jejichž relativní abundance se signifikantně lišila v závislosti na výskytu moru včelího plodu. Mezi těmito taxony byl rovněž *P. larvae* (OTU50), jehož výskyt byl ve vzorcích dělnic včely medonosné pocházejících ze stanoviště s klinickými příznaky onemocnění signifikantně vyšší a dosahoval cca 50% relativní abundance z celkového počtu potencionálně patogenních bakterií. Mezi lokalitou v morovém pásu bez klinických příznaků výskytu moru včelího plodu a kontrolní lokalitou mimo morové pásmo nebyl ve výskytu *P. larvae* zjištěn průkazný rozdíl (obrázek 22).



Obrázek 22. Multidimensional scaling, dělnice včely medonosné, podobnost mikrobiomu vybraných potenciálně patogenních bakterií v jednotlivých vzorcích a stanovištích. Legenda: 0 – vzorky mimo morové pásmo, 1 – vzorky v morovém pásmu bez klinických příznaků moru včelího plodu, 2 – vzorky s klinickými příznaky moru včelího plodu.



Obrázek 23. Relativní abundance *Paenibacillus larvae* u dělnic včely medonosné, analýza mikrobiomu byla založena na počtu vybraných potenciálně patogenních bakterií v jednotlivých vzorcích a stanovištích a vyhodnocena statistickou analýzou METASTAT, sloupce jsou průměrné hodnoty relativní abundance, úsečky střední chyby průměru, písmena uvádí statistickou odlišnost na hladině $\alpha=0,05$.

5. Současná ekonomická náročnost použité metody

Tato metoda vyžaduje přípravu vzorků, tj. extrakci DNA z povrchově sterilizovaných včel a kukel. Zároveň výsledky modelového příkladu ukazují, že je nutné provádět více opakování z jednoho včelstva, budou-li následně prováděny statistické analýzy. Náklady na extrakci DNA z jednoho vzorku se pohybují okolo 100 Kč. Takto extrahovaná DNA může být využita pro ověření přítomnosti *P. larvae* pomocí klasické PCR detekce. Sekvenování 1 vzorku včetně bioinformatické analýzy oblasti V1 až V3 stálo 80 USD. Konkurenční sekvenační firmy nabízejí 20-30 USD za sekvenování fragmentu V4 - V5. Tím je možné výrazně snížit náklady na sekvenaci. V této studii byla využita analýza 40 vzorků, odhadovaná cena analýzy je 100 tisíc bez zahrnutí nákladů na práci spojenou s interpretací výsledků. Předpoklad je, že v nedaleké budoucnosti bude cena na obdobnou analýzu vzorků několikanásobně nižší.

6. Závěr

Předložená metoda využití nové generace sekvenování části genu 16S rRNA na přístroji Illumina MiSeq pro identifikaci *Paenibacillus larvae* je funkční. Metoda je v současné době značně finančně náročná, avšak měnící se trendy v sekvenování povedou k zlevnění postupů během příštích dvou let. Metodu lze tedy využít ke klinické i předklinické diagnostice v terénu.

Výskyt patogenních bakterií lze kvantifikovat jak v dělnicích, tak v kuklách včely medonosné. Charakteristickou vlastností metody je identifikace všech složek mikrobiomu. Po identifikaci části datového souboru obsahující symbiotické bakterie v mikrobiomu dělnic včely medonosné, lze zbylou část bakteriální komunity obsahující potencionálně patogeny dále analyzovat. To je další možné využití popsané metody pro spolehlivou diagnostiku, např. jako součást systému tlumení hniloby včelího plodu (původce *Melissococcus plutonius*).

7. Seznam použité literatury

- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389–3402.
- Barbieri E., Paster B. J., Hughes D., Zurek L., Moser D. P., Teske A., Sogin M. L. (2001) Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg capsules of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). *Environmental Microbiology* 3 (3): 151–167.
- Bogdanov S. (2005) Contaminants of bee products. *Apidologie* 37 (1): 1–18.
- Bokulich N. A., Subramanian S., Faith J. J., Gevers D., Gordon J. I., Knight R., Mills D. A., Caporaso J. G. (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods* 10 (1): 57–59.
- Brødsgaard C. J., Ritter W., Hansen H. (1998) Response of *in vitro* reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae* larvae spores. *Apidologie* 29 (6): 569–578.
- Cariveau D. P., Powell J. E., Koch H., Winfree R., Moran N. A. (2014) Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *ISME Journal* 8 (12): 2369–2379.
- Cole J. R., Wang Q., Fish J. A., Chai B., McGarrell D. M., Sun Y., Brown C. T., Porras-Alfaro A., Kuske C. R., Tiedje J. M. (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D633–D642.
- de Graaf D. C., Alippi A. M., Antúnez K., Aronstein K. A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D. W., Evans J. D., Foster L. J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K. D., Nguyen B. K., Poppinga L., Spivak M., VanEngelsdorp D., Wilkins S., Genersch E. (2013) Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1): 52.1.11. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.11.
- Djukic M., Brzuszkiewicz E., Fünfhaus A., Voss J., Gollnow K., Poppinga L., Liesegang H., Garcia-Gonzalez E., Genersch E., Daniel R. (2014) How to kill the honey bee larva:

- genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. PLoS One 9 (3): e90914. DOI: 10.1371/journal.pone.0090914.
- Edgar R. C., Haas B. J., Clemente J. C., Quince C., Knight R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27 (16): 2194–2200.
- Engel P., James R. R., Koga R., Kwong W. K., McFrederick Q. S., Moran N. A. (2013) Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. Journal of Apicultural Research 52 (4): UNSP 52.4.07. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.07.
- Evans J. D. (2003) Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology 83 (1): 46–50.
- Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. (2006) Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56 (3): 501–511.
- Kochansky J., Knox D. A., Feldlaufer M., Pettis, J. S. (2001) Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. Apidologie 32 (3): 215–222.
- Kozich J. J., Westcott S. L., Baxter N. T., Highlander S. K., Schloss P. D. (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. Applied and Environmental Microbiology 79 (17): 5112–5120.
- Lindström A. (2008) Distribution of *Paenibacillus larvae* spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of American foulbrood. Microbial Ecology 56 (2): 253–259.
- Lindström A., Korpela S., Fries I. (2008) 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. Journal of Invertebrate Pathology 99 (1): 82–86.

- Moran N. A. (2015) Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science* 10: 22–28.
- Morrissey B. J., Helgason T., Poppinga L., Fünfhaus A., Genersch E., Budge G. E. (2015) Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environmental Microbiology* 17 (4): 1414–1424.
- OIE (World Organisation for Animal Health) (2015) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Dostupné z: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/> [citováno 6. ledna 2016].
- Ondov B. D., Bergman N. H., Phillippy A. M. (2011) Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12: 385. DOI: 10.1186/1471-2105-12-385.
- Pernal S. F., Melathopoulos A. P. (2006) Monitoring for American foulbrood spores from honey and bee samples in Canada. *Apiacta* 41 (1): 99–109.
- Rauch S., Ashiralieva A., Hedtke K., Genersch E. (2009) Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (10): 3344–3347.
- Schloss P. D., Westcott S. L., Ryabin T., Hall J. R., Hartmann M., Hollister E. B., Lesniewski R. A., Oakley B. B., Parks D. H., Robinson C. J., Sahl J. W., Stres B., Thallinger G. G., Van Horn D. J., Weber C. F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (23): 7537–7541.
- Titěra D. (2009) Mor včelího plodu. Dol: Výzkumný ústav včelařský, 47 s.
- Wilson W. T. (1971) Resistance to American foulbrood in honey bees. XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *Journal of Invertebrate Pathology* 17 (2): 247–255.

8. Seznam právních norem

Česká republika. Vyhláška č. 299/2003 Sb. ze dne 1. září 2003, o opatřeních pro předcházení a zdolávání nákaz a nemocí přenosných ze zvířat na člověka. In: Sbírka zákonů ČR, ročník 2003. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-299> [citováno 6. ledna 2016].

Česká republika. Zákon č. 166/1999 Sb. ze dne 13. července 1999, o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). In: Sbírka zákonů ČR, ročník 1999. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166> [citováno 6. ledna 2016].

Evropská unie. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 ze dne 21. října 2009, o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě, a o zrušení nařízení (ES) č. 1774/2002 (nařízení o vedlejších produktech živočišného původu). In: Úřední věstník Evropské unie, ročník 2009, L 300/1. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?qid=1439418853630&uri=CELEX:32009R1069> [citováno 6. ledna 2016].

Evropská unie. Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009, o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu. In: Úřední věstník Evropské unie, ročník 2010, L 15/1. Dostupné z: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-5/index_en.htm#reg nebo z: http://web.vscht.cz/~kocourev/files/Reg_37_2010-CZ-veterinari%20farmaka.pdf [citováno 6. ledna 2016].

9. Přílohy:

Tabulka 1P. Programy použité pro bioinformatickou analýzu dat.

Mothur	http://www.mothur.org/wiki/Download_mothur
PAST	http://folk.uio.no/ohammer/past/
XLSTAT	https://www.xlstat.com/en/
Krona	http://mrnafreeware.com/krona.html
Bioedit	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html
Codone Code Alinger	http://www.codoncode.com/aligner/
Openoffice	https://www.openoffice.org
Large Text File Viewer	http://sourceforge.net/projects/largetextfile/

Tabulka 2P. Datasetsy nutné pro bioinformatickou analýzu dat

referenční list SILVA	http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files
referenční list RDP	http://www.mothur.org/wiki/Download_mothur

Tabulka 3P. Seznam příkazů v programu mothur použitých pro bionformatickou analýzu dat uvedeného modelového příkladu.

pcr.seqs (fasta=silva.bacteria.fasta, start=1044, end= 13127)	úprava referenčního listu SILVA dle použitých primerů
fastq.info (file=s.txt, oligos=oligo.txt, pdiffs=2, bdiffs=1, fasta=f, qfile=f)	tvorba fasta quality souborů pro jednotlivé vzorky
make.contigs (file=s.txt, oligos=oligo.txt, processors=4)	tvorba kontingencí
summary.seqs (fasta=s.trim.contig.fasta)	kontrola kvality sekvencí
screen.seqs (fasta=s.trim.contigs.fasta, group=s.contigs.groups, maxambig=0, maxlength=600).	odstranění nekvalitních sekvencí
get.current()	uložení souborů
summary.seqs (fasta=s.trim.contigs.good.fasta).	kontrola kvality sekvencí
unique.seqs (fasta=s.trim.contigs.good.fasta)	stanovení unikátních sekvencí
count.seqs (name=s.trim.contigs.good.names, group=s.contigs.good.groups)	zjednodušení názvů souborů
summary.seqs (count=s.trim.contigs.good.count_table)	kontrola kvality sekvencí
align.seqs (fasta=s.trim.contigs.good.unique.fasta, reference=silva.131.fasta)	spojení sekvencí s databází SILVA
summary.seqs (fasta=s.trim.contigs.good.unique.align,count=s.trim.contigs.good.count_table).	kontrola kvality sekvencí
screen.seqs (fasta=s.trim.contigs.good.unique.align, count=s.trim.contigs.good.count_table, summary=s.trim.contigs.good.unique.summary, start=1968, end=11550, maxhomop=8)	odstranění nekvalitních sekvencí
summary.seqs (fasta=current, count=current)	kontrola kvality sekvencí
filter.seqs (fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.align, vertical=T, trump=.).	filtrace sekvencí
unique.seqs (fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.fasta,count=s.trim.contigs.good.good.count_table)	stanovení unikátních sekvencí
pre.cluster (fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.fasta,count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.count_table, diffs=12)	odstranění chyb sekvenování
chimera.uchime (fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta, count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.count_table, dereplicate=t).	stanovení chimérických sekvencí
remove.seqs (fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.fasta, accnos=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.uchime.accnos).	odstranění chimérických sekvencí ve fasta souboru
remove.lineage (fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.fasta,	odstranění nežádoucích sekvencí

<code>count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.uchime.pick.count_table,</code> <code>taxonomy=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.taxonomy,</code> <code>taxon=Chloroplast-Mitochondria-unknown-Archaea-Eukaryota)</code>	(např. plastidy, mitochondrie)
cluster.split (<code>fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.fasta,</code> <code>count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.uchime.pick.pick.count_table,</code> <code>taxonomy=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.taxonomy,</code> <code>splitmethod=classify, taxlevel=6, cutoff=0.15, processors=4).</code>	klastrování sekvencí
make.shared (<code>list=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.pick.an.unique_list.list,</code> <code>count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.uchime.pick.pick.pick.count_table,</code> <code>label=0.03)</code>	tvorba OTU na hladině podobnosti 0.03
classify.otu (<code>list=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.pick.an.unique_list.list,</code> <code>count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.denovo.uchime.pick.pick.pick.count_table,</code> <code>taxonomy=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pds.wang.pick.pick.taxonomy,</code> <code>label=0.03).</code>	identifikace OTU pomocí databáze RDP
split.abund (<code>fasta=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.fasta,</code> <code>list=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.pick.wang.unique_list.list,</code> <code>count=s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.pick.count_table, cutoff=5,</code> <code>label=0.03)</code>	odstranění OTU s počtem sekvencí nižším než 5
system (<code>mv s.trim.contigs.good.unique.good.filter.unique.precluster.pick.pick.0.03.abund.fasta)</code>	zkrácení názvů souborů
make.shared (<code>list=s1.list, count=s1.count_table, label=0.03)</code>	tvorba OTU na hladině podobnosti 0.03
classify.otu (<code>list=s1.list, count=s1.count_table, taxonomy=s1.taxonomy, label=0.03)</code>	identifikace OTU pomocí databáze RDP
Nyní máme výsledné soubory, které využijeme pro statistickou analýzu a identifikaci OTU	
get.otulist (<code>list=s1.list, label=0.03)</code>	tvorba souborů pro identifikaci OTU pomocí databáze GenBank
get.seqs (<code>accnos=otu1.csv, fasta=s.fasta, count= s.count_table)</code>	tvorba souborů pro identifikaci

	OTU pomocí databáze GenBank
sub.sample (shared=s1.shared, size=2130)	vzorkování sekvencí
remove.groups (count=s1.count_table, groups=H1AMK-H2AMK-H1AMK3-H1AMK2-H1AMK1-H2AMK1-R14AMK-R10AMK-Z51AMK-Z45AMK-Z706AMK2-Z706AMK1, list=s1.list)	odstranění vzorků ze souboru dat
make.shared (list=s1.list, count=s1.count_table, label=0.03)	tvorba souborů pro statistickou analýzu
count.groups ()	stanovení počtu sekvencí v jednotlivých vzorcích
sub.sample (shared=s1.pick.shared, size=6499)	vzorkování sekvencí
summary.single (shared=s1.pick.0.03.subsample.shared, calc=nseqs-coverage-sobs-invsimpson-shannon-chao, subsample=6499)	výpočet parametrů α - diverzity
dist.shared (shared=s1.pick.0.03.subsample.shared, calc=braycurtis, subsample=6491)	výpočet parametrů β - diverzity
amova (phylip=s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.dist, design=AFB.txt)	výpočet molekulární variance
homova (phylip=s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.dist, design=AFB.txt)	výpočet homogenity molekulární variance
nmds (phylip=s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.dist).	analýza nmds
pcoa (phylip=s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.dist).	analýza PcoA
corr.axes (axes=s1.pick.0.03.subsample.braycurtis.0.03.lt.ave.pcoa.axes, shared=s1.pick.0.03.subsample.shared, method=pearson, numaxes=2).	výpočet korelace
metastats (shared=s1.pick.0.03.subsample.shared, design=AFB.txt)	analýza na úrovni populace