

Tomáš Erban a kol.

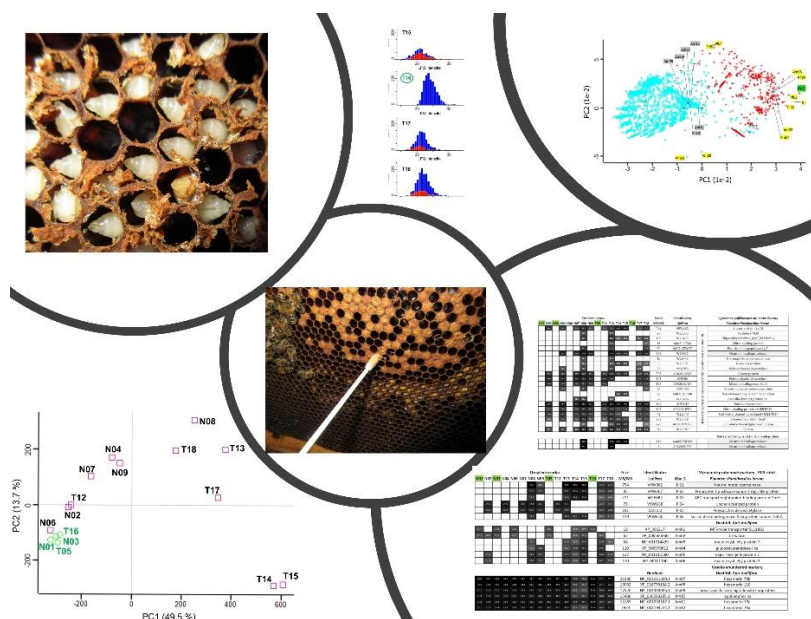
Metodika pro identifikaci virulentních faktorů *Paenibacillus larvae* proteomickým přístupem

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

2022





Metodika pro identifikaci virulentních faktorů *Paenibacillus larvae* proteomickým přístupem

Tomáš Erban a kolektiv

Autorský tým (podíly na realizaci):

Tomáš Erban^{1,*} (50 %)

Bruno Sopko¹ (15%)

Miroslava Bodrinová¹ (15 %)

Martin Markovič¹ (10 %)

Martin Kamler² (10 %)

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

²Výzkumný ústav včelařský, s. r. o., Máslovice–Dol 94, 252 66 p. Libčice nad Vltavou

*Korespondenční autor: RNDr. Tomáš Erban, Ph.D., ORCID: 0000-0003-1730-779X

arachnid@centrum.cz; erban@vurv.cz

Oponenti:

MVDr. Leoš Čeleda, CSc. Oddělení ochrany zdraví zvířat, Státní veterinární správa

doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D., Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

Vydal: © Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2022

1. vydání

ISBN 978-80-7427-384-1



Obsah

1. Financování, certifikace, prohlášení, poděkování.....	- 1 -
2. Název a anotace česky	- 2 -
3. Název a anotace anglicky.....	- 3 -
4. Úvod.....	- 4 -
4.1. Mor včelího plodu je globálně významné onemocnění včel.....	- 4 -
4.2. Charakteristika původce a problematika nákazy	- 5 -
4.3. Rozeznání klinických příznaků.....	- 6 -
4.4. Detekce původce a hodnocení nákazy	- 6 -
4.5. Identifikace různě virulentních kmenů <i>Paenibacillus larvae</i>	- 7 -
4.6. Znalost genomu <i>P. larvae</i> klíčová pro identifikaci virulentních faktorů.....	- 8 -
5. Cíl metodiky.....	- 9 -
6. Vlastní popis metodiky	- 9 -
6.1. Volba biologického vzorku.....	- 9 -
6.2. Odběr biologického vzorku.....	- 11 -
6.3. Zpracování vzorku pro molekulární detekci a následnou proteomickou analýzu	- 11 -
6.4. Molekulární detekce <i>P. larvae</i> ve vzorku – PCR	- 12 -
6.5. Proteomická analýza pro identifikaci virulentních faktorů.....	- 14 -
6.6. Schématické znázornění metodiky	- 16 -
6.7. Výsledky příkladu provedení	- 17 -
6.7.1. Výsledky PCR analýzy a vizuální popis.....	- 17 -
6.7.2. Vzorky vybrané pro další analýzu na základě PCR analýzy s vizuálním popisem	- 18 -
6.7.3. Σ MS1+MS2 spekter	- 19 -
6.7.4. Vizualizace proteinů <i>P. larvae</i> a <i>A. mellifera</i> histogramy.....	- 20 -
6.7.5. Analýza hlavních komponent a zatížení	- 21 -
6.7.6. Výběr klíčových virulentních faktorů.....	- 22 -
7. Srovnání novosti metodiky	- 24 -
8. Uplatnění metodiky.....	- 24 -
9. Ekonomické přínosy metodiky	- 25 -
10. Publikace kolektivu, které předcházely metodice.....	- 25 -



1. Financování, certifikace, prohlášení, poděkování

Financování:

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu NAZV QK1710228 s názvem „Nové spolehlivé metody pro rutinní rozlišení kmenů a predikci rizik vzniku a šíření nákazy původce moru včelího plodu (*Paenibacillus larvae*)“ řešeného v období 2017–2021. Realizace výsledku byla podpořena také institucionální podporou MZE RO0418.

Certifikace:

Metodice bylo uděleno osvědčení č. SVS/2022/164316-G – Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy ČR.

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

Oponentní posudky vypracovali: MVDr. Leoš Čeleda, CSc., a doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

Prohlášení:

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Poděkování:

Autorský tým děkuje recenzentům metodiky za podnětné a cenné připomínky. Autoři děkují Mgr. Julii Chalupníkové a Mgr. Veronice Krčmářové za technickou pomoc.



2. Název a anotace česky

Název: Metodika pro identifikaci virulentních faktorů *Paenibacillus larvae* proteomickým přístupem

Anotace:

Mor včelího plodu je velmi nebezpečná nákaza včel v Česku i jinde ve světě o čemž svědčí zařazení na seznamu nákaz Světové organizace pro zdraví zvířat (WOAH). Důležitým poznatkem při řešení nákaz zvířat a lidí je znalost virulence původce onemocnění. Na tuto otázku se zaměřuje tato metodika, která nově přináší hodnocení virulence patogenu *Paenibacillus larvae* proteomickým přístupem. Metodika umožňuje v rámci jednoho vzorku ověření přítomnosti *P. larvae* a následnou identifikaci virulentních faktorů *P. larvae* a dokonce i interagujících proteinů z hostitele *A. mellifera*. Metodika přesahuje svými možnostmi tradiční rozdělní virulentních kmenů na tzv. ERIC genotypy. Unikátnost metodiky spočívá také v zaměření na analýzu larev ve stádiu před zavíčkováním (předkukly), což umožňuje porovnání vzorků ve stejném stádiu v rámci jedné analýzy. Aplikace metodiky na ohniska moru včelího plodu umožní sběr komplexních dat, která budou využitelná v hodnocení rizik onemocnění a nastavení opatření.

Klíčová slova: mor včelího plodu; *Paenibacillus larvae*, virulentní faktory, neutrální metaloproteáza



3. Název a anotace anglicky

Title: Methodology for identification of virulence factors of *Paenibacillus larvae* employing proteomics

Abstract:

American foulbrood (AFB) is a very dangerous infection of bees in Czechia and around the world. Its importance is highlighted by the fact that the disease is listed in the Animal Health Code of the World Organization for Animal Health (WOAH). The important required information in dealing with animal and human infections is the virulence of the causative agent of the disease. This methodology focuses on this question, which brings a new evaluation of the virulence of the pathogen *Paenibacillus larvae* using a proteomic approach. The methodology enables the verification of the presence of *P. larvae* within one sample and the subsequent identification of virulence factors of *P. larvae* and even interacting proteins from the host *A. mellifera*. The methodology goes beyond the traditional determination of virulent strains into ERIC genotypes. The uniqueness of the methodology also lies in the focus on the analysis of larvae in the stage before capping (prepupae), which enables the comparison of samples at the same stage within one analysis. The application of the methodology to outbreaks of American foulbrood will enable the collection of complex data useful in the assessment of disease risks and the setting of measures.

Keywords: American foulbrood; *Paenibacillus larvae*; virulence factors, neutral metalloprotease



4. Úvod

4.1. Mor včelího plodu je globálně významné onemocnění včel

Mor včelího plodu (MVP, *Histolysis infectiosa perniciosa larvae apium*, *Pestis americana larvae apium*; anglicky American foulbrood, zkratka AFB) je velmi nebezpečná nákaza včel. Globální význam této nemoci včel potrhují fakt, že je zařazena na seznamu nákaz Světové organizace pro zdraví zvířat (WOAH, dříve OIE) [1]. Ne ve všech zemích se však k MVP přistupuje stejným způsobem. Mimo Evropskou unii (EU) jsou v některých zemích, jako např. v Kanadě, ve Spojených státech (USA) nebo v Ukrajině, k potlačování MVP povolena antibiotika. Antibiotika však problém moru neřeší, protože v podstatě pouze maskují průběh nemoci. Používání antibiotik je navíc spojeno s nežádoucími kontaminacemi včelích produktů, hlavně medu, a podporuje vznik rezistentních bakterií [2–5]. V EU je mor včelího plodu podle prováděcího nařízení č. 2018/1882, o uplatňování některých pravidel pro prevenci a tlumení nákaz na kategorie nákaz uvedených na seznamu a o stanovení seznamu druhů a skupin druhů, které představují značné riziko šíření zmíněných nákaz uvedených na seznamu, nákaza, v souvislosti s níž je třeba přijmout opatření s cílem zabránit jejímu šíření v důsledku jejího zavlečení do Unie nebo přemísťování zvířat mezi členskými státy. Navíc se jedná o nákazu, v souvislosti s níž je zapotřebí dozoru v rámci Unie [6]. Nejeфективnějším a legislativně jediným možným řešením nákazové situace v EU je spálení včelích úlů. V Česku je MVP zařazen mezi nebezpečné nákazy včel vyjmenované v příloze č. 2 zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinárního zákona). MVP je zakázáno léčit a v případě podezření z výskytu nebezpečné nákazy má chovatel povinnost oznámit místně příslušné krajské veterinární správě podezření z výskytu nákazy na svém stanovišti [7].

4.2. Původce moru včelího plodu

Velmi důležité je uvědomit si, že MVP je, stejně jako jiná infekční onemocnění, způsoben určitým původcem nemoci. Tím je v případě MVP grampozitivní bakterie, která byla poprvé úspěšně kultivovaná G. F. Whitem v roce 1904 [8]. Původní název *Bacillus larvae* stanovený jeho objevitelem nevydržel. Se získáváním nových informací, a i díky postupným aplikacím nových a novějších metodických postupů založených na molekulární biologii, následovalo několik reklasifikací. Zařazení do samostatného rodu jako *Paenibacillus larvae* navrhli Ash a kol. [9]. Jistou dobu byly rozeznávány dva druhy původce *Bacillus/Paenibacillus larvae* a



Bacillus/Paenibacillus pulvifaciens. Ty můžeme po reklasifikaci v rámci druhu [10] dnes nalézt ve sbírkách a databázích jako poddruhy *P. larvae larvae* a *P. larvae pulvifaciens*. Je na místě uvést, že druhý vzácný poddruh původce popsáný H. Katznelsonem [11] měl být asociován s onemocněním nazvaným rozpad včelího plodu, a to díky netypickým příznakům projevujícím se úhynem plodu ještě před zavíčkováním a jeho rozpadem na prášek. Běžná forma onemocnění MVP je charakterizována rozkladem včelí larvy na typickou kašovitou hmotu s hnilobným zápachem připomínajícím klíh, která se mění v pevný příškvár lpící na spodní stěně buňky [1, 12].

4.2. Charakteristika původce a problematika nákazy

Penibacillus larvae je sporulující, pohyblivá, grampozitivní tyčinka, velikosti $0,5\text{--}1 \times 2,5\text{--}5 \mu\text{m}$. V tekutých kultivačních médiích obvykle tvoří řetízky [13]. Spory jsou velké $0,6 \times 1,3 \mu\text{m}$. Jejich extrémní odolnost vůči fyzikálně-chemickým vlivům je zásadní příčinou tak vysoké nebezpečnosti MVP. Spory totiž představují jedinou infekční jednotku původce. Jsou však virulentní pouze pro larvální stádium včely medonosné. Jako přenašeč spor *P. larvae* na plod se uplatňují včelí dělnice. Ty přenášejí spory, a tedy i nákazu nejen ve včelstvu, ale také mezi včelstvy. Na včelnicích se v tomto smyslu uplatňuje zejména zalétávání, kdy nemocné včelstvo kontaminuje sousední zdravé včelstvo. Velmi rizikové jsou však také loupeže včelstev s rozvinutou infekcí. Jako přenašeč se však uplatňuje také samotný včelař, který přemístí kontaminované matrice [14–18]. Včely nejsou schopny efektivně odstranit spory ze včelstva. Spory totiž přetrvávají ve včelích matricích. Navíc jsou velmi odolné a schopné přežít řádově delší dobu, než je nejdelší možný život královny. Nepomáhají dokonce ani evoluční výhody včel, kterými jsou sociální chování a čistící pud [3, 19–21].

Náchylná k onemocnění je včelí larva. Avšak není tomu tak po celé larvální stadium. Larva onemocní zpravidla pouze do 36 hodin po vylíhnutí z vajíčka. V tomto období larvy stačí pro rozvinutí nákazy méně než 10 spor. U starších larev k nákaze prakticky nedochází, protože by bylo zapotřebí příliš mnoha spor [22, 23]. Mezi včelstvy existují někdy až velmi velké individuální rozdíly k propuknutí MVP. Tyto až řádově větší tolerance vůči koncentraci patogenu ve včelstvu spočívají zejména v rezistenci vůči patogenu [24]. Přestože existují snahy o šlechtění včelstev na odolnost proti MVP [19], je nutno upozornit, že řádově zvýšená koncentrace spor ve včelstvech bez klinických příznaků nebo se subklinickým rozvojem nemoci může být pro okolní méně odolná



včelstva osudná. Včelstva, která odolávají až řádově vyšším náložím spor *P. larvae*, než běžná a v tomto ohledu průměrná včelstva, mohou v konečném důsledku sloužit jako zdroj infekce.

4.3. Rozeznání klinických příznaků

Klinická diagnostika MVP je založena na rozeznání přítomnosti klinických příznaků a následné identifikaci původce [1]. Klíčovým krokem je včasné rozpoznání klinických příznaků na plodu. Příznaky jsou sice typické, ale mohou být do jisté míry proměnlivé a ovlivněné genotypem původce *P. larvae*. Příznaky MVP jsou ovlivněny také aktuální silou včelstva a jeho přirozenou odolností vůči nákaze [25]. Základním indikátorem toho, že včelstvo není v pořádku, je mezerovitost plodu, která i když je typickým příznakem MVP, může mít více příčin. Asi nejtypičtějším klinickým příznakem jsou rozkládající se larvy gelovitého či karamelovitého vzhledu, jejichž výskyt je doprovázen nepříjemným klišovitým zápachem. Pokud jsou larvy zavičkovány, tak se může vyskytovat další typický znak. Buňky s nakaženou larvou mohou být tmavší barvy než okolní, víčko bývá propadlé a některá víčka mohou být proděravělá [1].

4.4. Detekce původce a hodnocení nákazy

Nejstarší a tradiční metodou používanou při identifikaci *P. larvae* je kultivace. Spory *P. larvae* jsou velmi odolné vůči vysokým teplotám. A právě této vlastnosti se úspěšně využívá, protože ostatní bakterie vysoké teploty nepřežijí a na kultivačním mediu nevyrostou [26]. Kultivačnímu postupu předchází zahřátí suspenze spor na 80 °C po dobu 10 min a 95–96 °C po dobu 3–5 min [26]. Zahřátí není nutné v případě izolace *P. larvae* z příškvaru, protože příškvár obsahuje prakticky čistou kulturu spor *P. larvae*. Kmeny *P. larvae* jsou nejen různě odolné k tepelnému ošetření a odlišují se i klíčovostí, a proto je vhodné tento faktor brát také v potaz [26]. Dosud bylo popsáno několik postupů kultivace *P. larvae*. Uznávanou metodou detekce z měli a vosku je metoda využívající Tween 80 [27]. Nejčastěji používaným agarem pro kultivaci je MYPGP [28]. Pro zvýšení selektivity a inhibici dalších bakterií jako *Paenibacillus alvei* se doporučuje přidání nalidixové kyseliny do kultivačního média [29]. Ještě větší selektivity lze dosáhnout obsahem oxidu uhličitého pod 5 % zvláště v MYPGP a J agarech, což je pro růst *P. larvae* výhodné [30].

Důležitým krokem v identifikaci původce je však také exaktní prokázání pomocí sofistikovanějších přístupů, než je kultivace. Nejrozšířenější je polymerázová řetězová reakce



(PCR) s využitím specifických primerů [31, 32]. Pokročilejší metodou je pak kvantitativní PCR označovaná jako real-time PCR nebo qPCR. Ta umožňuje molekulární detekci i kvantifikaci původce [33, 34]. Taxonomicky specifickou identifikaci umožňuje také MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Tato metoda je velmi přesná a srovnatelná s metodou sekvenování genu pro 16S rRNA [35]. Jednou z možných metod identifikace je také použití protilátek [36]. Klíčovým dokumentem na mezinárodní úrovni pro hodnocení nákazy a využívání testovacích metod pro MVP je kapitola 3.2.2. ve zdravotních standardech WOA (dříve OIE). Metody dostupné pro diagnostiku MVP a jejich účel přehledně znázorňuje tabulka 1 v příslušném dokumentu ([1]). Její překlad uvádíme níže a je označena jako tabulka 1. Je však vhodné uvést, že existují také další metody, které dokáží určit původce MVP a zároveň identifikovat i jeho genotyp/kmen či virulenci (viz další kapitola). Jejich využití pro prosté potvrzení patogenu však není běžné nebo lépe řečeno není vhodné.

Tabulka 1. Metody dostupné pro diagnostiku MVP a jejich účel (dle dokumentu WOA [1]).

Metoda	Účel					
	Vyloučení nákazy v populaci	Vyloučení nákazy včelstva před přesunutím na jinou lokalitu	Příspěvek k eradiaci onemocnění	Potvrzení klinických případů	Prevalence infekce – dozor nad onemocněním	Imunitní stav v jedincích nebo populacích po vakcinaci
Identifikace původce						
Izolace bakterií	+++	+++	+++	+++	+++	–
Mikroskopie	++	++	++	+++	+++	–
Antigení detekce	++	++	++	++	++	–
Konvenční PCR	+++	+++	+++	+++	+++	–
Kvantitativní PCR	+++	+++	+++	+++	+++	–
Hmotnostní spektrometrie	–	–	–	++	–	–

Klíč: +++ = "doporučené pro tento účel; ++ doporučené s omezeními; + = použitelné za (velmi) omezených okolností; – = není vhodné pro tento účel. PCR = polymerázová řetězová reakce

4.5. Identifikace různých virulentních kmenů *Paenibacillus larvae*

Modifikací PCR je repetitive element PCR (rep-PCR), která je založená na shlukové analýze PCR produktů získaných s primery komplementárními k rozptýleným repetitivním sekvencím. Jedná se o přístup, který byl využit ke genotypování izolátů *P. larvae* v Německu, přičemž při použití specifických primerů k lokusům BOX A1R, MBO REP1 a ERIC [37] vznikaly rozdílné fingerprinty studovaných izolátů. Výsledkem byla historicky velmi důležitá identifikace 4 podtypů *P. larvae* [38]. Biochemická charakterizace ukázala, že různé genotypy *P. larvae* jsou



odlišné i biochemicky [39]. Různá virulence genotypů byla také hodnocena úmrtností [25]. Asi zásadní analýzou je pro rozdělení *P. larvae* do čtyř podtypů pomocí ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus) [10]. Dlouhou dobu rozlišované čtyři standardní podtypy se v současné době označují jako genotypy ERIC I–IV [10]. Metoda ERIC-PCR se stala celosvětově uznávaným postupem pro nomenklaturu genotypů původce MVP. Navíc podle klasifikace Genersch [3] korespondují genotypy ERIC I a II s původním označením poddruhu *P. larvae* subsp. *larvae*. Genotypy ERIC III a IV korespondují s původním označením poddruhu *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* [3]. Vrátime-li se trochu více do minulosti, tak reklasifikace na poddruhy *P. larvae* subsp. *larvae* a *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* byla původně provedena na základě fenotypických a genotypických rozdílů a také vzhledem k rozdílné patologii [40]. Ještě dříve byly na molekulární úrovni dokonce klasifikovány druhy *P. larvae* a *P. pulvifaciens* dle analýzy 16S rRNA [9]. Toto rozdělení na dva druhy však nemělo dostatečné opodstatnění, a proto byly klasifikovány výše zmíněné poddruhy [40, 41]. V roce 2020 byla publikovaná práce, ve které autoři označili dle vžité klasifikace nový genotyp ERIC V [42]. Je možné, že by mohly být podle ERIC-PCR identifikovány i další genotypy. Klíčové je, že dokážeme rozlišit kmeny *P. larvae*, které mají odlišnou morfologii spor, metabolismus zdroje uhlíku a zejména virulenci. Jako zásadní se jeví informace, že nejrozšířenější genotyp ERIC I usmrtí všechny larvy přibližně 12. den po infekci, zatímco ostatní genotypy ERIC II–V se vyznačují schopností usmrtit všechny nakažené larvy dříve, tj. již kolem 7. dne od infekce [3, 10, 25, 42].

4.6. Znalost genomu *P. larvae* klíčová pro identifikaci virulentních faktorů

To, že jsou genotypy patogenu v rámci druhu různě virulentní, má svoje důvody zakotvené v jejich genomu. V zásadě mohou být umístěny na chromozomech nebo na plazmidech. Genotypové rozdíly se pak mohou projevovat fenotypovými rozdíly patogenu, což ovlivňuje také následný průběh infekce. Důležitou roli hrají kvalitativní i kvantitativní rozdíly mezi virulentními faktory. Důležitý je také fyziologický stav hostitele [43]. U *P. larvae* byla popsána celá řada virulentních faktorů, které hrají menší či větší roli v průběhu onemocnění MVP a také jeho šíření. Protože může být virulentních faktorů celá řada, tak zásadním krokem pro jejich identifikaci nebo vytipování je popsání genomu původce. Hrubý genom *P. larvae* byl poprvé získán v roce 2006 [44] a další byl získán v roce 2011 [45]. Následně byly získávány další genomové sekvence patogenu *P. larvae*. Důležitým milníkem bylo, když v roce 2014 byly získány a porovnány genomy



dvou klíčových genotypů ERIC I a II [46]. Toto porovnání genomů dvou nejvíce se vyskytujících genotypů *P. larvae* indikovalo řadu virulentních faktorů [46]. Později přibyly genomy dalších izolátů a genotypů *P. larvae* [42, 47]. Díky získaným genomům bylo možné následně studovat vytipované kandidátní virulentní faktory. Studium probíhalo na úrovni jednotlivých virulentních faktorů [48–51], ale genomy umožnily také funkční identifikaci více virulentních faktorů mezi genotypy najednou. Unikátní roli pro funkční identifikaci řady virulentních faktorů má vysokokapacitní proteomika, která využívá pro vyhodnocení dat sekvencí z genomu, a umožnila identifikaci virulentních faktorů v exoproteinové frakci různých genotypů *P. larvae in vitro*. Později byly identifikované proteomickým přístupem virulentní faktory *in vivo* na larvách v období blízském zavíčkování [52, 53].

5. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je poskytnout nový postup využitelný při identifikaci funkčních virulentních faktorů původce MVP *P. larvae*. Cílem je také pomocí aplikace metodiky na vzorcích larev určit stav jedinců infikovaných *P. larvae*. Metodika tak umožní získání výsledků, které poskytnou jednak informace o virulenci původce MVP, ale navíc i informace o imunitním stavu včelích larev.

6. Vlastní popis metodiky

Metodika je založena na inovativním přístupu, jehož aplikací je možné získat poměrně v krátkém čase mnoho informací o virulentních faktorech původce MVP a také interakcích se včelí larvou. Metodika je založena především na možnostech aplikací vysokokapacitní proteomiky využívající state-of-the-art metody, které umožňují získávání abundančních dat s velkou efektivitou. Metodika využívá také vizuálního pozorování a běžných instrumentálně méně náročných metod, které jsou důležité pro identifikaci nákazy a potvrzení přítomnosti původce MVP ve vzorku individuálních včel. Jednodušší a finančně méně náročné metody tedy umožňují selekci vzorků před aplikací klíčové vysokokapacitní analýzy, která poskytne nejdůležitější informace.

6.1. Volba biologického vzorku

Biologický vzorek pro účel metodiky tvoří larvální stádium včelí dělnice. Důležitým prvkem při výběru vzorků pro srovnávací analýzy je, aby byly ve stejném vývojovém stádiu. Pro

účel této metodiky bylo určeno jako nejvhodnější vývojové stádium larvy v období, kdy dochází k zavíčkování (obr. 1). Někdy je toto stádium nazýváno také předkukla. Tento biologický vzorek má hned několik výhod a významů.



Obrázek 1. Stádium larvy před zavíčkováním neboli ve stádiu předkukly.

- a) Stádium je relativně dobře rozeznatelné díky typickému vzhledu. Charakterizuje jej navíc prakticky exaktně snaha včel o zavíčkování buňky.
- b) Zavíčkování larvy je velmi důležité z pohledu patogeneze MVP. Dojde-li totiž k zavíčkování larvy infikované *P. larvae*, je velké riziko, že dojde k namnožení spor na největší nálož. Ta může 11 dní po vylíhnutí larvy z vajíčka tvořit průměrně $2,5 \times 10^9$ spor na larvu [54–56].

Pozn. Včelstva s dobrým čistícím pudem mohou mít lepší tendenci k odstranění infikovaných larev ještě před zavíčkováním. Larvy odstraněné včelami před zavíčkováním mají buňky *P. larvae* spíše ve vegetativním stádiu. Odstraněním larev před zavíčkováním včely v podstatě dělají prevenci před vznikem velké nálože extrémně odolných spor patogenu [19]. Faktorem, který má vliv na odstraňování larev z plodového plástu, je jejich uhynutí. Pokud larvy uhynou v brzkém stádiu, pak pokud je dospělé včely odstraní, tak v plodovém plástu zůstávají pouze prázdné buňky [57]. Na době usmrcení larev se významnou měrou podílí virulence původce, kterou dobře charakterizuje rychlost, s jakou usmrtí hostitele. Virulentnější genotypy *P. larvae* mají schopnost usmrtit všechny larvy dokonce do 7. dne od infekce, zatímco málo virulentní



kmen dokáže totéž až 12. den [3, 10, 25]. V tomto kontextu může být paradoxně hodně virulentní kmen *P. larvae* méně rizikový z hlediska šíření nákazy, protože kvůli brzkému úhynu larev nemusí docházet k zavíčkování infikovaného plodu a vzniku spor, které jsou pro šíření nákazy nejnebezpečnější. V této souvislosti je na místě uvést, že infekce způsobované poddruhem *P. l. pulvifaciens* (dříve *Bacillus pulvifaciens*) měly způsobovat onemocnění nazývané rozpad včelího plodu. Jedná se o virulentnější kmen, pro jehož nákazu byl charakteristický úhyn plodu ještě před zavíčkováním, a tak nedocházelo k tvorbě příškvarů plných spor [58, 59].

6.2. Odběr biologického vzorku

Pro analýzy dle této metodiky jsou z plodového plástu vybírány pouze larvy ve stádiu, kdy dochází k zavíčkování. Larvy jsou odebírány do vzorkovnic, které jsou uloženy na suchý led a poté transportovány na místo uložení v hlubokomrazícím boxu do provedení analýz.

- a) Před odběrem se provede prohlédnutí plodového rámu. Larvy jsou vizuálně kontrolovány.
- b) Pro odběr jsou vybírány larvy s různým stupněm infekce dle vizuálního vzhledu. Všímáme si různého zabarvení larvy. Odeberou se také vzorky, u nichž dle vizuální kontroly předpokládáme, že by mohly být kontrolními vzorky bez infekce *P. larvae*. Kontrolní vzorky mají typicky bílou barvu bez jiných zabarvení nebo jiného narušení, jako je polehnutí (polehlá larva).
- c) Vzhled jednotlivých odebraných larev je zaznamenán pro pozdější porovnání s výsledky následujících molekulárních analýz.

6.3. Zpracování vzorku pro molekulární detekci a následnou proteomickou analýzu

Ačkoliv jsou k dispozici vzorky larev, které pocházejí z ohniska nákazy, není jistota, že jsou skutečně infikované *P. larvae*. Před proteomickou analýzou, která je nejnáročnějším i nejdůležitějším krokem metodiky, je potřeba ověřit, zda je vzorek infikován původcem MVP. Vzorek je potřeba zpracovat tak, aby mohla být v rámci stejného biologického vzorku provedena PCR analýza a následná proteomická analýza.

- a) Vzorek larvy je přemístěn do homogenizéru (skleněný s teflonovým pístem nebo jiná alternativa). Ke vzorku larvy je přidáno 1,25 ml sterilní ddH₂O a je homogenizován za chlazení na ledu.



- b) Ze vzniklého prehomogenátu se odebere 100 μ l pro PCR analýzu. Prehomogenát se smíchá s extrakčním roztokem a izoluje se DNA následujícím nebo alternativním způsobem dle zavedených postupů v laboratoři.

Příklad provedení: Preferenčně se dle metodiky smíchá 100 μ l prehomogenátu s 400 μ l extrakčního roztoku (0,5 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, 0,05 M NaCl, 5% SDS). Směs se řádně promíchá na vortexu. Lyzát se smíchá se stejným objemem chloroformu překlopením mikrozkušavky a centrifuguje se 5 min při 10 000 x g. Supernatant se přemísť do čisté mikrozkušavky a smíchá se se stejným objemem isopropanolu, vortexuje se a inkubuje 20 min při -20°C . Následuje centrifugace při 20 000 x g po dobu 15 min. Přidá se 300 μ L 70% ethanolu k peletě a mikrozkušavka se vortexuje a pak centrifuguje 3 min při 20000 x g. Peleta vysušená na vzduchu se resuspenduje v 50 μ L vody prosté nukleáz.

- c) Ke zbylému objemu 1,15 ml prehomogenátu se přidá stejný objem (tedy 1,15 ml) roztoku pro zpracování na proteomickou analýzu. Přidá se dvojnásobně koncentrovaný roztok, který konkrétní laboratoř preferenčně používá pro proteomické shot-gun analýzy, protože původní vzorek je vodný prehomogenát. Vzorky se dohomogenizují a uloží do hlubokomrazicího boxu pro pozdější použití. Vhodné je rozdělení homogenátu do několika aliquotů (např. 3 až 4 po 500 μ l).

Příklad provedení: Preferenčně se dle metodiky pro proteomiku volí roztok o složení: 200 mM triethylamonium bikarbonátový pufr (TEAB) a 4% deoxycholát sodný (SDC). Výsledný roztok je *de facto* 100 mM TEAB a 4% SDC.

6.4. Molekulární detekce *P. larvae* ve vzorku – PCR

Nejvhodnější je ověření molekulárním přístupem PCR metodou pomocí specifických primerů. Kromě ověření přítomnosti patogenu *P. larvae* ve vzorku je však vhodné ověřit kvalitu izolované DNA a mít tak ověřenou informaci o úspěšném izolování genomické/bakteriální DNA. Důležitost tohoto kroku oproti specifickým primerům je zvláště pro negativní vzorky na specifické AFB primery.

- a) DNA extrahovaná ze 100 μ l prehomogenátu získaného z larvy se použije na celkem 3 PCR reakce. DNA se použije na (i) amplifikaci a ověření genomické DNA (18S); (ii) amplifikaci pomocí univerzálních eubakteriálních primerů pro potvrzení přítomnosti bakteriální DNA (EUB); a (iii)



potvrzení přítomnosti *P. larvae* pomocí specifických primerů (MVP). První dvě PCR analýzy jsou ověřovací genomické/bakteriální DNA a třetí krok identifikuje nebo vyloučí původce MVP ve vzorku.

- b) Podle provedení v této metodice se použije Red Taq DNA Polymerase Master Mix (VWR, Randor, PA, USA). Reakční objem je 25 μ L a koncentrace R+F primerů je 0,4 μ M a koncentrace gDNA na reakci je 50 ng. PCR reakce se provedou v termocycleru C1000 Touch (Bio–Rad, Hercules, CA, USA). Primery a podmínky pro cycler jsou uvedeny v následujících bodech. PCR produkty jsou separovány na 1% agarosovém gelu a obarveny pro vizualizaci v dokumentačním systému pomocí DNA Stain Clear G (SERVA, Heidelberg, Německo).

- c) (i) Amplifikace 18S rRNA genu pro verifikaci genomické DNA (18S)

Primery:

FF390/FR1 (5'-CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3'/5'- A/I/C CAT TCA ATC GGT A/I/T-3') [60].

Program pro cycler:

počáteční denaturace: 95 °C (8 min); 28 cyklů: 95 °C – 30 s, 50 °C – 45 s, 68 °C – 120 s; finální extenze: 72 °C – 10 min.

Velikost výsledného amplikonu: 350 bp

- d) (ii) Amplifikace pomocí universálních eubakteriálních primerů pro ověření bakteriální DNA (EUB)

Primery:

27F/1492R (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') [61].

Program pro cycler:

počáteční denaturace: 95 °C (3 min); 34 cyklů: 95 °C – 30 s, 55 °C – 30 s, 72 °C – 60 s; finální extenze: 72 °C – 5 min.

Velikost výsledného amplikonu: 1465 bp

- e) (iii) Amplifikace pro specifické potvrzení, nebo vyvrácení přítomnosti *P. larvae*

Použité primery:

AFB-F/AFB-R (5'-CTTGTGTTTCTTTTCGGGAGACGCCA-3'/5'- TCTTAGAGTGCCACCTCTGCG-3') [32].



Program pro cycler:

počáteční denaturace: 95 °C (3 min); 34 cyklů: 95 °C – 30 s, 55 °C – 30 s, 72 °C – 60 s; finální extenze: 72 °C – 5 min.

Velikost výsledného amplikonu: 1106 bp

6.5. Proteomická analýza pro identifikaci virulentních faktorů

Protože proteomická analýza představuje instrumentálně a také finančně nejnáročnější část metodiky, je vhodné vybrat pro analýzu pouze vybrané vzorky. Proteomická analýza dokáže poskytnout informaci o přítomnosti proteinů z původce MVP ve vzorcích včelích larev, ale zároveň dokáže identifikovat proteiny larvy, a tak ukázat rozdíly vyvolané stupněm infekce. Pro takové porovnání je však potřeba analyzovat vzorky larev zaručeně infikované *P. larvae*, a také kontrolní vzorky bez infekce.

- a) Spolehlivé rozdělení vzorků na pozitivní a negativní umožní výsledky PCR analýzy a indikátorem stupně vývoje infekce je také záznam o vizuálním vzhledu vzorku.
- b) Pro srovnávací vysokokapacitní analýzu se tedy zvolí kontrolní vzorky bez infekce a zaručeně pozitivní vzorky. Počet vzorků se volí dle finančních anebo kapacitních možností. Celkově by se měly vybrat alespoň 3 pozitivní a 3 negativní vzorky. Pozitivních vzorků je však vhodné vybrat více a s různým zdravotním stavem larev (zabarvená, nažloutlá, polehlá apod.).
- c) Vzorky homogenizované pro proteomiku a uložené v hlubokomrazícím boxu (viz kapitolu 6.3. c) se dále zpracují pro proteomickou analýzu na nano-LC-MS/MS. Další zpracování vzorku je dle protokolu používaného v dané analytické laboratoři, které se typicky liší, ale je principiálně založen na analýze tryptických štěpů na nano-LC-MS/MS instrumentaci.
- d) Vyhodnotí se celkový počet hmotnostních spekter ($\sum MS1+MS2$). Tato data se vyexportují z vyhodnocovacího softwaru, kterým je v případě společnosti Thermo Xcalibur QualBrowser. Porovnání $\sum MS1+MS2$ mezi vzorky s různým stupněm infekce a bez infekce poskytne informaci, zda existuje jistá disproporce mezi proteinovým obsahem ve vzorcích a naměřenými spektry. Vzorky larev výrazně ovlivněné lyzí můžou mít signifikantně nižší $\sum MS1+MS2$ než patogenem méně ovlivněné a zdravé larvy.

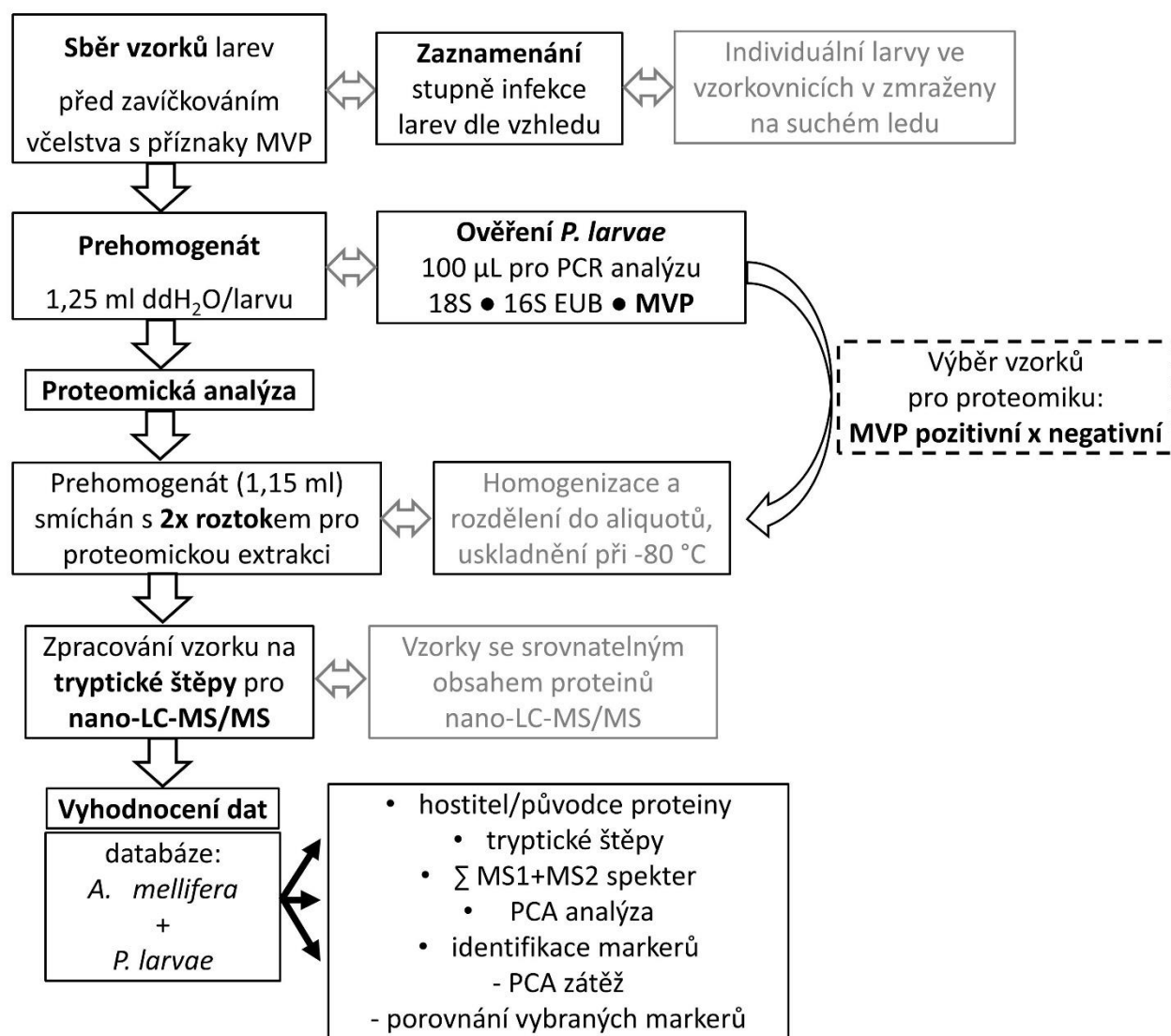


- e) Hrubá proteomická data se vyhodnotí v příslušném softwaru, z nichž některé jsou dostupné komerčně a některé jsou k dispozici zdarma. Kritickým krokem při vyhodnocení je volba vhodné databáze. Ve vzorcích se vyskytují proteiny hostitele a také patogenu, resp. původce MVP. Mor včelího plodu není náchylný ke koinfekcím [62, 63]. Proto je pro prohledání proteomických dat vhodné použít sekvenční původce (*Paenibacillus larvae*) a hostitele (*Apis mellifera*). Databáze proteinových sekvencí se získá z UniProt (<https://www.uniprot.org/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nebo případně z jiného alternativního zdroje. Vhodné je použít set sekvencí, které jsou zařazeny do databáze referenčních sekvencí (RefSeq) [64]. V případě původce *P. larvae* jsou k dispozici sekvenční z několika genotypů. Právě různé genotypy je vhodné do databáze zařadit, protože následné identifikace mohou indikovat daný genotyp. V případě hostitele *A. mellifera*, by bylo teoreticky možné také volit mezi genotypem, protože včela medonosná má různé poddruhy – současné databáze však takovou možnost prozatím neumožňují.
- e) Provede se inspekce identifikovaných proteinů v histogramech, které zahrnují intenzitu a počet spekter identifikovaných proteinů z hostitele (*A. mellifera*) a také z původce MVP (*P. larvae*). Vizualizace poskytne informaci o míře infekce vzorků původcem na proteinové úrovni. Profil histogramů by měl být zvláště odlišný u kontrolních neinfikovaných larev a těch, které jsou v pokročilém stádiu infekce.
- f) Provede se analýza hlavních komponent (principal component analysis, PCA), která indikuje rozdíly v proteomu analyzovaných larev v jiné podobě než histogramy (viz 6.5c). Kromě PCA analýzy se provede také hodnocení PCA zátěže, která umožní identifikaci proteinů, které měly největší vliv na posun v PCA. Kombinace analýz umožní identifikaci klíčových virulentních faktorů původce ve vzorku.
- g) Vyhledají se klíčové virulentní faktory, které byly určeny v dřívějších studiích zaměřených na virulentní faktory. Zejména se zohlední vysokokapacitní proteomické studie [52, 53]. Kromě virulentních faktorů *P. larvae* se hodnotí také intenzita vybraných referenčních markerů hostitele *A. mellifera*. Jedná se především o virulentní faktory a referenční markery, které zobrazuje tabulka 5.

6.6. Schématické znázornění metodiky

Schématické znázornění metodiky (obr. 2) ilustruje obecné kroky, které lze aplikovat v různých modifikacích. Dodržením kroků v postupu s modifikací použitých technologií by se mělo dojít v principu ke stejnému výsledku.

Obrázek 2. Schématické znázornění metodiky.





6.7. Výsledky příkladu provedení

V příkladu provedení metodiky jsou uvedeny analýzy na vzorcích, které pocházejí z ohnisek MVP na Zlínsku v roce 2020.

6.7.1. Výsledky PCR analýzy a vizuální popis

Analýza vzorků kombinací tří různých primerů pro potvrzení a vyvrácení přítomnosti původce MVP v odebraných vzorcích (tabulka 1).

Tabulka 1. Výsledky PCR analýzy vybraných vzorků.

Použité primery			
Vzorek	18S	AFB	EUB
N1	+	–	–
N2	+	+	+
N3	+	–	–
N4	+	+	+
N5	+	–	–
N6	+	+	+
N7	+	+	+
N8	+	+	+
N9	+	+	+
N10	+	–	–
N11	+	–	–
N12	+	+	+
T1	+	–	–
T2	+	–	–
T3	+	+	+
T4	+	–	–
T5	+	–	–
T6	+	–	–
T7	+	–	–
T8	+	–	–
T9	+	–	–
T10	+	–	–
T11	+	+	+
T12	+	+	+
T13	+	+	+
T14	+	+	+
T15	+	+	+
T16	+	–	–
T17	+	+	+
T18	+	+	+

Legenda: N – Nevšová; T – Tetčice; + – pozitivní PCR výsledek; – – negativní PCR výsledek

Interpretace: Pozitivní výsledek na původce MVP je v případě positivity na všechny 3 primery/PCR reakce.



6.7.2. Vzorky vybrané pro další analýzu na základě PCR analýzy s vizuálním popisem

Vybrané vzorky pro proteomickou analýzu s popisem vizuálního hodnocení shrnuje tabulka 2. Hrubá data k těmto vzorkům byla získána naměřením pomocí nano-LC-MS/MS technologie, přičemž dataset s potřebnými detaily je přístupný v databázi MassIVE (MSV000089235) anebo Pride (PXD033155). Data byla vyhodnocena pomocí softwaru MaxQuant v1.6.17.0 [65] a Perseus v1.6.15.0 [66]. Databáze pro vyhodnocení byla konstruována z 23 504 sekvencí *A. mellifera* a 28 585 sekvencí *P. larvae*.

Tabulka 2. Výsledky PCR analýzy vzorků vybraných na proteomiku a popis vzhledu.

Vzorek	Potvrzení přítomnosti <i>P. larvae</i>	Vizuální hodnocení larvy na MVP
N01	–	zdravá
N02	+	zploštělá
N03	–	zdravá
N04	+	zploštělá
N06	+	zploštělá
N07	+	vyfouklá, nažloutlá
N08	+	vyfouklá, lyzovaná, nažloutlá
N09	+	vyfouklá, lyzovaná, nažloutlá
T05	–	zdravá
T12	+	matná
T13	+	zploštělá, nažloutlá
T14	+	lyzovaná
T15	+	lyzovaná
T16	–	zdravá
T17	+	zploštělá
T18	+	zploštělá

Legenda: N – Nevšová; T – Tetčice; + – pozitivní PCR výsledek; – – negativní PCR výsledek

Interpretace: Pro srovnávací proteomickou analýzu byly z kapacitních důvodů vybrány 4 negativní – srovnávací vzorky a další 12 vzorků bylo v různém stupni infekce.

Následující proteomické analýzy umožňují identifikaci virulentních faktorů původce MVP *P. larvae* ve vzorcích, ale také proteinů hostitele *A. mellifera* interagujících s patogenem a ovlivněných infekcí.



6.7.3. Σ MS1+MS2 spekter

Rozdíly v Σ MS1+MS2 spektrech získané pomocí nástroje Thermo Xcalibur QualBrowser (tabulka 3) neindikují závratně velké rozdíly mezi jednotlivými vzorky, ale tři až čtyři vzorky se podle vyhodnocení jeví jako vcelku odlišné od ostatních. Jedná se o vzorky T14, T15, T17 a T18. Statistické vyhodnocení však indikuje, že signifikantně ($p < 0,05$) snížený počet spekter byl získán pro vzorky T15 a T14.

Tabulka 3. Vyhodnocení rozdílu sumy spekter MS1+MS2.

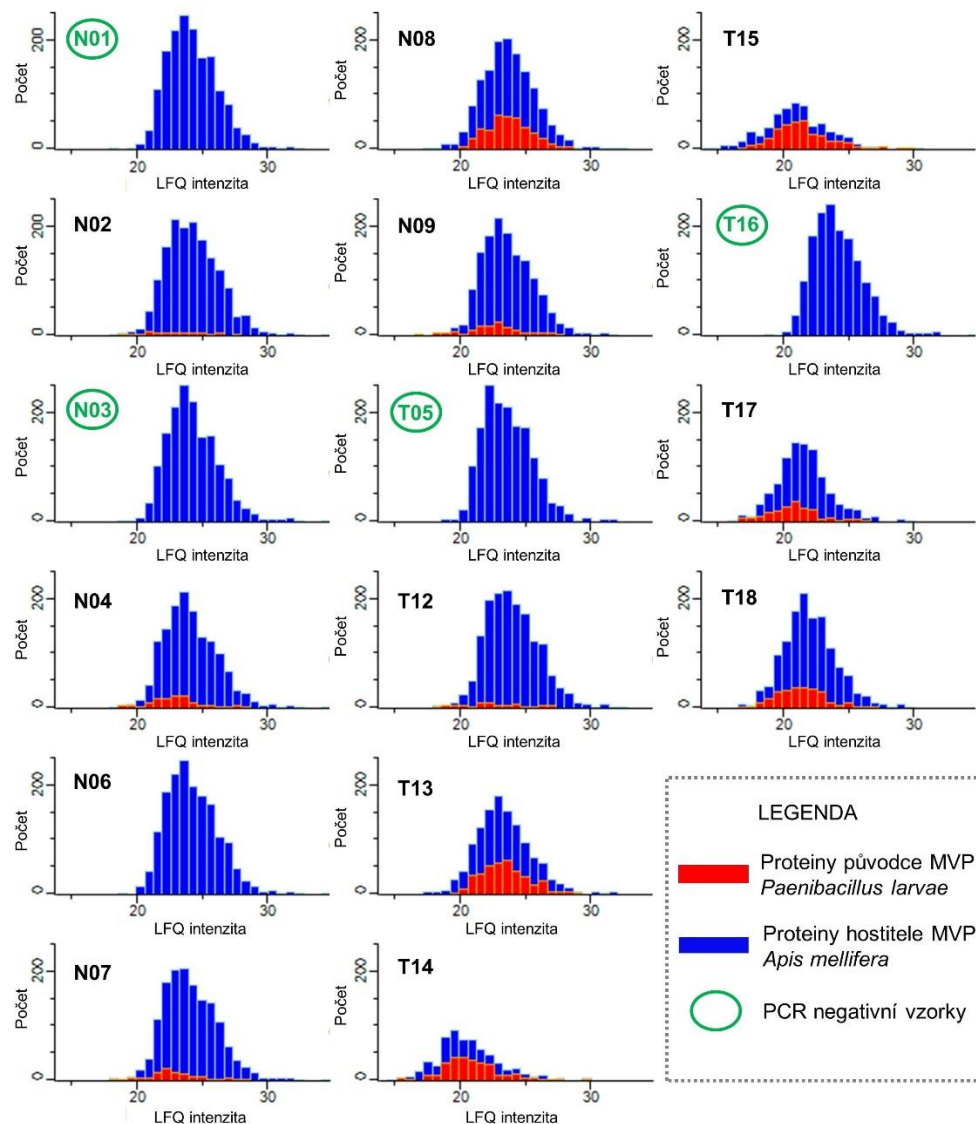
Označení vzorku	Σ MS1+MS2 spekter	Z-Score	p-hodnota
N01	128 885	0,456	0,324
N02	130 087	0,762	0,223
N03	129 797	0,688	0,245
N04	127 010	-0,020	0,492
N06	132 245	1,311	0,094
N07	127 564	0,120	0,452
N08	127 268	0,045	0,482
N09	126 483	-0,155	0,438
T05	129 631	0,646	0,259
T12	132 276	1,318	0,094
T13	128 066	0,248	0,402
T14	119 227	-2,000	0,022
T15	119 078	-2,038	0,020
T16	128 168	0,274	0,392
T17	122 702	-1,117	0,131
T18	124 978	-0,537	0,295

Interpretace: Vzorky v pokročilém stádiu infekce *P. larvae* mohou být ovlivněné lyzí, a proto bylo v konečném důsledku získáno méně spekter. Nejvíce patrné je to pro statisticky odlišné vzorky T14 a T15, které byly zároveň popsány vizuálně jako lyzované a podle proteomické identifikace obsahovaly nejvíce proteinů *P. larvae*, což názorně ukazují histogramy (viz kapitolu 6.7.4, obr. 3).

6.7.4. Vizualizace proteinů *P. larvae* a *A. mellifera* histogramy

Důležitým krokem ve vyhodnocení je identifikace tryptických štěpů proteinů *P. larvae* a *A. mellifera* ve vzorku. Jejich přítomnost a proporce zobrazují názorně histogramy (obr. 3) ukazující počet proteinových identifikací a jejich intenzitu. Důležité je všimnout si také profilů histogramů, jelikož indikují na rozdílnost proteomu vzorků.

Obrázek 3. Histogramy zobrazující identifikace *A. mellifera* a *P. larvae*.



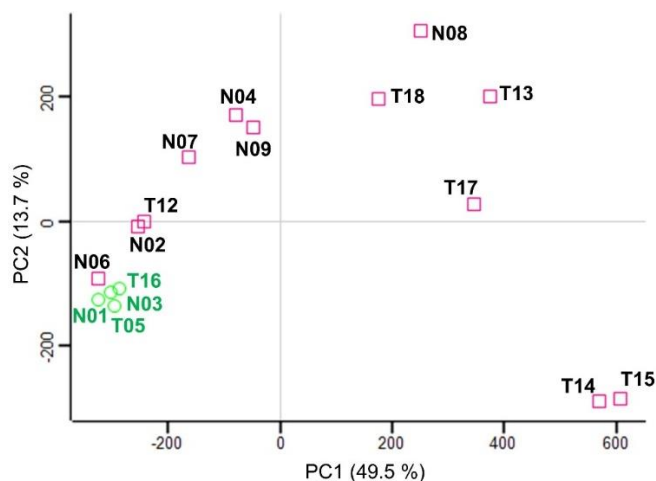
Interpretace: Největší rozdíly v histogramech jsou mezi kontrolními vzorky a lyzovanými larvami (T14 a T15). Kontrolní a PCR pozitivní vzorky mohou mít z důvodu malé infekce podobný profil (viz T16 a N06). Výsledek prezentuje podobnosti a rozdíly v proteomu jinak než PCA (obr. 4).



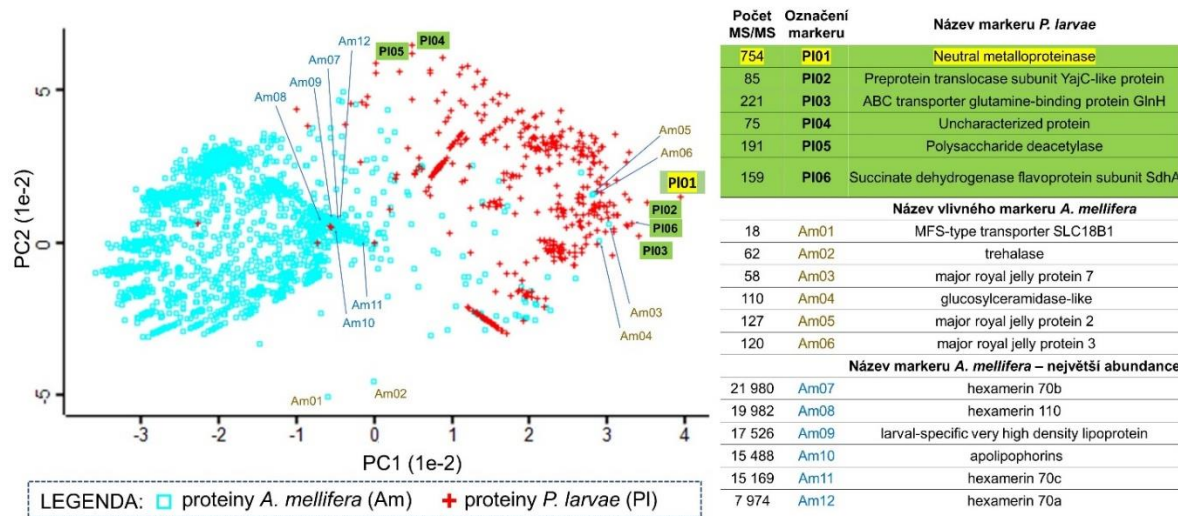
6.7.5. Analýza hlavních komponent a zatížení

PCA analýza (obr. 4) je velmi důležitým vyhodnocením, které názorně ukazuje rozdíly v proteomu analyzovaných vzorků. Proteiny původce MVP i hostitele zodpovědné za nejdůležitější posuny v PCA pak identifikujeme pomocí zatížení (obr. 5).

Obrázek 4. PCA analýza zobrazující rozdíly v proteomu vzorků.



Obrázek 5. Zatížení zobrazující příspěvek proteinů *P. larvae* a *A. mellifera* k posunům v PCA.



Interpretace: PCA analýza ukázala velké rozdíly mezi kontrolními a silně infikovanými vzorky. Málo infikované vzorky však mají podobnou pozici v PCA jako vzorky kontrolní. V tomto směru se v podstatě jedná o obdobný výsledek jako v případě vizualizace histogramy. Zatížení identifikuje klíčové virulentní faktory *P. larvae* a také vlivné markery *A. mellifera*. Zajímavým výsledkem je, že nejabundantnější proteiny *A. mellifera* neměly zásadní vliv na posuny v PCA.



6.7.6. Výběr klíčových virulentních faktorů

Důležitým krokem ve vyhodnocení proteomických dat je porovnání přítomnosti a intenzity důležitých virulentních faktorů. Při tomto kroku je vhodné zohlednit aktuální poznatky o virulentních faktorech *P. larvae*. Zásadní jsou v podstatě výsledky vysokokapacitních analýz [52, 53]. Do porovnání se můžou uvést také markery identifikované v PCA zátěži. Vybrané virulentní faktory odpovídající PCA analýze a zátěži zobrazuje tabulka 4. Pro relativní srovnání intenzity virulentních faktorů *P. larvae* je důležité uvést také vysoce abundantní proteiny *A. mellifera*. Zásadním markerem budou v každém případě isoformy neutrálních metaloproteáz, které převládají v posledním stádiu infekce *P. larvae*. Jejich přítomnost a intenzita korespondují s postupem v infekci [53, 67] a jsou také relevantní k průkazu MVP Holstovým mléčným testem [53, 68].

Tabulka 4. Vybrané virulentní markery *P. larvae*, zásadní markery larev *A. mellifera* z PCA zátěže a srovnávací vysoko abundantní proteiny z *A. mellifera*. Markery mají stejné označení jako v obr. 5.

Označení vzorku																Počet	Identifikátor	Obr. 5	Významné proteinové markery - PCA zátěž
N01	N02	N03	N04	N06	N07	N08	N09	T05	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	MS/MS	UniProt		Původce: <i>Paenibacillus larvae</i>
						30.6	21.2			30.6	30.2	30.2		24.3	24.1	754	V9WB82	PI01	Neutral metalloproteinase
						25.5	23.3			26.2	27.4	27.5		22.4	23.0	85	V9W6C7	PI02	Preprotein translocase subunit YajC-like protein
						23.7				24.0	26.8	27.6		19.4	20.0	221	W2E6R2	PI03	ABC transporter glutamine-binding protein GlnH
	26.1		27.0		26.7	27.1	26.0		26.5	27.3				22.5	23.6	75	V9W6G8	PI04	Uncharacterized protein
	25.0		25.7		25.6	25.8	25.3		25.1	24.8				23.2	23.8	191	W2E3I0	PI05	Polysaccharide deacetylase
						24.3				24.9	24.2	25.9		20.5	21.3	159	V9W6Q0	PI06	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit SdhA
Hostitel: <i>Apis mellifera</i>																			
21.7		21.4		21.8					21.2				19.0	19.9	21.6	18	XP_396217	Am01	MFS-type transporter SLC18B1
21.1	20.6	21.5		20.7					20.2				19.6	21.4	20.3	62	XP_006560260	Am02	trehalase
						21.4				21.6	20.0	23.8		23.0	19.3	58	NP_001014429	Am03	major royal jelly protein 7
						19.2	23.1			20.7	23.0	25.4				110	XP_006570612	Am04	glucosylceramidase-like
	21.6					24.7	23.3			23.3	20.9	24.6		24.6	21.8	127	NP_001011580	Am05	major royal jelly protein 2
	21.9					24.2	23.2			23.0	20.6	24.9		24.2	22.0	120	NP_001011160	Am06	major royal jelly protein 3
Vysoko abundantní markery Hostitel: <i>Apis mellifera</i>																			
GenBank																			
34.0	34.5	34.3	34.6	34.2	34.5	34.6	34.4	33.7	34.3	34.2	28.0	26.6	34.4	32.2	33.1	21980	NP_001011600.1	Am07	hexamerin 70b
34.6	34.4	34.5	34.3	34.4	34.4	32.9	34.0	34.1	34.1	32.4	26.6	25.2	34.6	31.7	32.1	19982	XP_016770154.2	Am08	hexamerin 110
32.1	32.5	32.1	32.4	32.3	32.4	32.3	32.0	31.6	31.9	31.8	24.8	23.8	32.0	29.4	30.5	17526	NP_001318046.1	Am09	larval-specific very high density lipoprotein
31.9	31.9	32.0	31.8	31.6	31.8	30.8	31.4	31.4	31.4	31.2	26.1	26.7	31.9	28.8	29.0	15488	XP_026298285.1	Am10	apolipoproteins
31.8	32.3	32.2	32.2	32.2	32.0	31.9	32.1	31.7	32.0	31.9	29.6	30.1	31.9	29.4	28.7	15169	NP_001092187.1	Am11	hexamerin 70c
32.1	32.2	32.4	32.5	32.3	32.3	32.5	32.2	31.7	32.3	31.9	25.4	24.5	32.4	29.5	31.1	7974	NP_001104234.1	Am12	hexamerin 70a

Přítomnost a relativní intenzitu markerů znázorňuje intenzita teplotní mapy v příslušných polích, která odpovídá log₂ LFQ intenzitě (číslo v buňce). Bílé pole znamená, že marker nebyl ve vzorku detekován.

Interpretace: Zastoupení a intenzita markerů *P. larvae*, které byly vybrány na základě PCA zátěže (obr. 5), prokazuje jejich význam v infekci. Nejvýznamnějším markerem je neutrální metaloproteáza (PI01), která je vysoce zastoupená v již pokročilém stádiu infekce. (Pozn. V tabulce 5 jsou uvedeny další tři isoformy neutrální metaloproteázy.) Významnou roli však hrají i další markery. Zároveň jsou vyobrazeny klíčové markery hostitele *A. mellifera*, pro některé z nich je



velmi zajímavá informace, že jejich přítomnost je pouze u kontrolních vzorků. U nejvíce ovlivněných vzorků (T14 a T15) je zjevný úbytek „vysoko abundantních“ markerů hostitele, což koresponduje s pokročilou infekcí.

Tabulka 5. Virulentní markery *P. larvae* vybrané na základě předchozích studií. Navíc jsou uvedeny ve spodní části 2 isoformy neutrální metaloproteázy, a to pro důležitost těchto proteinů/proteáz v pozdním stádiu infekce MVP.

Označení vzorku																Počet	Identifikátor	Významné publikované virulentní faktory	
N01	N02	N03	N04	N06	N07	N08	N09	T05	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	MS/MS	UniProt	Původce: <i>Paenibacillus larvae</i>	
24.3		23.2		22.3	25.2	22.2			21.3	23.9	26.3	26.7		21.0	23.7	462	V9W2V1	Markery vybrané ve vysokopátných <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> studiích	S-layer protein (SplA)
					21.5					21.8						20	W2E966		Peptidase M20
					23.7					25.0	19.3	20.6		20.7	21.2	105	W2E439		Oligoendopeptidase, pepF/M3 family
										21.0					18.4	11	A0A2L1TZ44		Chitin-binding protein
					24.3					22.6					21.5	34	A0A2L1TWY7		Putative endopeptidase LytE
			26.2		25.0	27.4	25.9			27.8	24.6	24.8		25.0	25.0	266	W2E8C5		Neutral metalloproteinase
					21.1					21.0						10	W2EFP2		Thermophilic serine proteinase
					20.5					21.2	22.6	22.0		16.9	17.7	56	W2ECP1		Toxin-like protein
				21.6		22.3				22.7				20.8		26	V9W9F6		Polysaccharide deacetylase
24.3		24.9	24.9	24.9	25.0	24.5			24.1	24.8	24.6	24.8		22.0	22.6	905	A0A2L1U843		S-layer protein
25.0		25.7	25.6	25.8	25.3				25.1	24.8				23.2	23.8	191	W2E3I0		Polysaccharide deacetylase
23.8		23.9	23.9	24.1	23.3				23.3					21.1	22.0	165	A0A2L1UJN7		Microbial collagenase ColA
		21.4			22.2										19.3	24	V9WAH1		S-layer domain-containing protein
												22.4	22.8			29	A0A2L1UCM8		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
					21.5	21.6				20.4						27	W2EA55		Penicillin-binding protein 2B
26.8		28.4	27.6	28.1	27.5				27.1	28.7	29.5	30.0		26.4	26.9	144	W2EAN2		Putative bacteriocin
21.7		23.6	22.6	24.5	23.2				21.1	24.4	22.2	22.5		20.7	23.0	147	A0A2L1UFG4		Chitin-binding protein 49 (PICBP49)
23.0		24.1	23.5	23.6	23.4				23.1	24.1	20.8			21.4	21.7	48	W2EC40		Cell wall endopeptidase, family M23/M37
18.6		22.9	21.4	25.6	21.2				20.0	25.1	22.3	23.0		20.8	22.3	232	W2E7K8		Chaperone protein DnaK
					19.2					21.5	25.1	24.7			15.7	220	A0A1U9YUT7		Endo-beta-N-acetylglucosaminidase
22.1		23.1	22.6	26.6	22.9				21.7	26.6	23.6	24.5		22.1	23.0	312	W2EEN7		Enolase
																		Další 2 isoformy neutrálních metaloproteáz	
					23.8					24.4	24.2	24.0				112	A0A6C0QQD9		Neutral metalloproteinase
					24.6					24.4						5	A0A2A5K257		Neutral metalloproteinase

Přítomnost a relativní intenzita markerů znázorňuje intenzita teplotní mapy v příslušných polích, která odpovídá log₂ LFQ intenzitě (číslo v buňce). Bílé pole znamená, že marker nebyl ve vzorku detekován.

Interpretace: Výsledky prezentované v tabulce 5 ukazují význam virulentních faktorů *P. larvae* identifikovaných dříve *in vitro* pro různé genotypy *P. larvae* [52, 53]. Panuje tedy vcelku dobrá shoda s významností virulentních faktorů identifikovaných *in vitro* a *in vivo* ve stádiu larvy před zavíčkovaním (předkukly), na které je zaměřena tato metodika. Význam ve virulenci *P. larvae* v tomto stádiu lze podtrhnout pro marker bacteriocin, pro který je zjevná role v larvách v různém stádiu infekce. Bacteriocin bude jeden z klíčových proteinů, který je zodpovědný za dominanci *P. larvae* v larvě a nenáchylnost ke koinfekcím. Důležité je také, že nebyl ve vzorcích vůbec identifikován virulentní faktor immune inhibitor A (InhA), který tvoří klíčový rozdíl mezi ERIC genotypy, jelikož není přítomen u ERIC I. Velkou důležitost představuje také přítomnost virulentního faktoru microbial collagenase ColA, který má tendenci k vymizení ze vzorků nejvíce infikovaných. Tento virulentní faktor je patrně důležitější v méně infikovaných larvách, protože u



nejvíce infikovaných larev vymizel. V tabulce jsou vyobrazeny celkem tři isoformy neutrálních metaloproteáz, které doplňují zásadní isoformu (V9WB82) v tabulce 4 [52, 53].

7. Srovnání novosti metodiky

Metodika nově přináší hodnocení virulence patogenu *P. larvae* proteomickým přístupem, a to na vzorcích odebraných přímo z nemocných včelstev případů MVP. Metodika umožňuje v rámci jednoho vzorku ověření přítomnosti *P. larvae* a následnou identifikaci virulentních faktorů *P. larvae* a dokonce i interagujících proteinů z hostitele *A. mellifera*. Unikátnost metodiky spočívá také v tom, že je zaměřena na analýzu larev ve stádiu před zavíčkováním neboli předkukly, což umožňuje porovnání vzorků ve stejném stádiu v rámci jedné analýzy. Volba tohoto stádia je zásadní tím, že umožní další porovnání virulentních faktorů z jiných klinických případů MVP. Celkově metodika významným způsobem rozšiřuje možnosti analýzy a hodnocení klinických případů MVP. Dokonce mezinárodně dle WOAH je zatím uvedeno využití hmotnostní spektrometrie v metodách dostupných pro diagnostiku MVP pouze okrajové (viz tabulku 1 v metodice), což metodika v podstatě mění. Využití proteomického přístupu založeného na hmotnostní spektrometrii dokáže nejen identifikaci patogenu, ale i stanovení imunitního stavu hostitele (včely). Metodika svými možnostmi překonává také identifikace na ERIC genotypy, protože identifikuje aktivní virulentní faktory a interakci v hostiteli.

8. Uplatnění metodiky

Metodika se uplatní při hodnocení virulence *P. larvae* a hodnocení nákaz MVP. Metodika představuje velkou extenzi k dosud používaným postupům při hodnocení MVP, které jsou zaměřeny na identifikaci původce *P. larvae*. Metodika umožňuje nejen exaktní prokázání přítomnosti *P. larvae* ve vzorku, ale zároveň hodnocení stupně infekce, a dokonce i interakci s hostitelem, tj. larvou včel. Uplatnění metodiky je tedy při hodnocení vývoje klinického MVP, což bude možné využít pro nastavení prevence a řešení MVP. Získané informace o průběhu MVP a charakterizaci dle metodiky na různých lokalitách má potenciál využití v hodnocení rizik nákazových situací.



9. Ekonomické přínosy metodiky

MVP způsobuje každoročně značné ztráty na včelstvech. V případě rozeznání MVP jsou veterinární správou vyhlášována mimořádná veterinární opatření k prevenci a tlumení nebezpečné nákazy – MVP a vydávána nařízení o vyhlášení ochranných pásem. V řadě případů jsou včelstva, a dokonce celé včelnice likvidovány. Chovatelé včel mohou být podle § 67 zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči, odškodněni ke kompenzaci nákladů a ztrát, které jim vznikly v důsledku provádění mimořádných veterinárních opatření. Ani náhrady nemohou dostatečně nahradit ztrátu včelstev. Na druhou stranu věnuje veterinární správa velké úsilí při řešení nálezů MVP a eliminaci šíření. Tato metodika může svým rozsahem a možnostmi získání velkého obsahu informací o konkrétních případech s MVP poskytnout data využitelná k nastavení efektivních opatření. Aplikací metodiky v praxi a sbírání dat o virulenci původce by mělo mít dlouhodobý přínos v nastavení efektivní prevence MVP. Při zohlednění ročních náhrad, ztrát na včelstvech a včelích produktech, zejména medu, opylovací aktivitě, a také vynuceným aktivitám státní správy v souvislosti s MVP, může být roční ekonomický přínos metodiky kvantifikován až na desítky milionů korun českých jen v Česku. Metodika má však využití globálně.

Náklady na komplexní analýzu jednoho vzorku se pohybují v hodnotě cca 10 tis. Kč.

10. Publikace kolektivu, které předcházely metodice

Publikace (IF)

Erban T., Ledvinka O., Kamler M., Nesvorna M., Hortova B., Tyl J., Titera D., Markovic M., Hubert J. (2017). Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. Sci. Rep. 7: 5084. DOI: 10.1038/s41598-017-05076-8. (IF₂₀₁₇= 4,122; Q2)

*Erban T., Sopko B., Bodrinova M., Talacko P., Chalupnikova J., Markovic M., Kamler M. (2023). Proteomic insight into the interaction of *Paenibacillus larvae* with honey bee larvae before capping collected from an American foulbrood outbreak: pathogen proteins within the host, lysis signatures and interaction markers. Proteomics 23 (1): 2200146. DOI: 10.1002/pmic.202200146. (IF₂₀₂₁= 5,393; Q1)

*Erban T., Zitek J., Bodrinova M., Talacko P., Bartos M., Hrabak J. (2019). Comprehensive proteomic analysis of exoproteins expressed by ERIC I, II, III and IV *Paenibacillus larvae* genotypes reveals a wide range of virulence factors. Virulence 10 (1): 363–375. DOI: 10.1080/21505594.2019.1603133. (IF₂₀₁₉= 5,542; Q2)



Certifikované metodiky

Hubert J., Hortová B., Nesvorná M., Haltufová K., Kamler M., Titěra D., Erban T. (2016). Využití nové generace sekvenování pro diagnostiku původce moru včelího plodu *Paenibacillus larvae*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 45 s. ISBN: 978-80-7427-205-9.

Kamler M., Erban T., Hubert J. (2018). Postupy pro diagnostiku, tlumení, dezinfekci a obnovu včelařských provozů při výskytu bakteriálních chorob včel – manuál pro chovatele včel: Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav včelařský, Dol a Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 22 s. ISBN: 978-80-87196-40-3.

Odborné knihy

Titěra D., Kamler M., Erban T., Hubert J. (2018). Mor včelího plodu: diagnostika, prevence a tlumení. Výzkumný ústav včelařský, Dol, 106 s. ISBN 978-80-87196-36-6.

Recenzované časopisy bez IF

*Erban T., Bartoš M., Markovič M., Kamler M., Kovářová J., Hrabák J. (2018). Proč studovat virulenci bakterie *Paenibacillus larvae*, obávaného původce moru včelího plodu? Veterinářství 68 (1): 38–44.

Erban T., Markovič M., Sopko B. (2020). Význam interakce patogenů a mikrobiomu včel s pesticidy. Veterinářství 70 (6): 365–372.

Abstrakty a konference

*Haltufová K., Kamler M., Tyl J., Nesvorná M., Hubert J. (2018). Is shook swarm method effective to control American foulbrood? In: Bryja J., Solský M. (eds.) Zoologické dny Praha 2018. Sborník abstraktů z konference 8.–9. února 2018. Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno, s. 78–79.

Hortová B., Nesvorná M., Haltufová K., Kamler M., Titěra D., Erban T., Hubert J. (2016). Využití metod nové generace sekvenování pro diagnostiku původce moru včelího plodu *Paenibacillus larvae*. In: Bryja J., Sedláček F., Fuchs R. (eds.) Zoologické dny České Budějovice 2016. Sborník abstraktů z konference 11.–12. února 2016. Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno, s. 83–84.

Popularizační publikace

*Erban T. (2022). Mor včelího plodu pod mikroskopem za využití proteomiky. Mod. včelař 19 (11): 24–25.

*Erban T. (2022). Proč je důležité znát agresivitu kmenu *Paenibacillus larvae*. Mod. včelař 19 (1): 16–17.

*Sopko B., Erban T. (2022). Role mikrobiomu včel. Mod. včelař 19 (2): 24–25.



Prezentace, semináře: popularizace pro veřejnost a transfer výsledků a znalostí

- *Erban T. (2021). Inovativní detekce původce moru včelího plodu *Paenibacillus larvae*. In: Konference „Problematika kontaminace životního prostředí pesticidy ve vztahu ke včelám, ale i dalším necílovým organismům“. Aula VÚRV, Praha 6-Ruzyně, 27. 11. 2021.
- *Erban T., Šimonovský M. (2021). Přednáška a praktický workshop „Mor včelího plodu: Význam rozlišení kmenů *Paenibacillus larvae* pro klinickou a preklinickou diagnostiku“. Aula Výzkumného ústavu rostlinné výroby a spolková včelnice Včelařského spolku pro Prahu 6 a 7 v areálu VÚRV, Praha 6-Ruzyně, 26. 9. 2021.
<https://www.youtube.com/watch?v=kxYL9sVxckY>
- * Publikační výsledky s dedikací projektu NAZV QK1710228.



Seznam literatury

1. Alippi A. (2018). Chapter 3.2.2.: American foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*). In: WOAHA (ed.) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018. World Organisation for Animal Health (WOAH), Paris, s. 719–735. URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf
2. Evans J. D. (2003). Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathol. 83 (1): 46–50.
3. Genersch E. (2010). American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathol. 103 (Suppl. 1), S10–S19.
4. Bonerba E., Panseri S., Arioli F., Nobile M., Terio V., Di Cesare F., Tantillo G., Chiesa L. M. (2021). Determination of antibiotic residues in honey in relation to different potential sources and relevance for food inspection. Food Chem. 334: 127575.
5. Zabrodski M. W., DeBruyne J. E., Wilson G., Moshynskyy I., Sharafi M., Wood S. C., Kozii I. V., Thebeau J., Klein C. D., de Mattos I. M., Sobchishin L., Epp T., Ruzzini A. C., Simko E. (2022). Comparison of individual hive and apiary-level sample types for spores of *Paenibacillus larvae* in Saskatchewan honey bee operations. PLoS ONE 17 (2): e0263602.
6. Evropská komise. (2022). Konsolidovaný text: Prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/1882 ze dne 3. prosince 2018 o uplatňování některých pravidel pro prevenci a tlumení nákaz na kategorii nákaz uvedených na seznamu a o stanovení seznamu druhů a skupin druhů, které představují značné riziko šíření zmíněných nákaz uvedených na seznamu. Úř. věst. E. U. OJ L 308: 21–29. Dokument 02018R1882-20220705. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A02018R1882-20220705>
7. Česká republika. (1999). Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). Aktuální znění 01.10.2022 – 30.06.2023 (verze 38). Sbírka zákonů ČR: částka 57/1999. URL: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166>
8. White GF. (1906). The bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases. Technical series no. 14. U. S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Washington, DC, 50 s.
9. Ash C., Priest F. G., Collins M. D. (1993/1994). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test: proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. Antonie van Leeuwenhoek 64 (3–4): 253–260.
10. Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56 (3): 501–511.
11. Katznelson H. (1950). The influence of antibiotics and sulfa drugs on *Bacillus larvae*, cause of American foulbrood of the honeybee, *in vitro* and *in vivo*. J. Bacteriol. 59 (4): 471–479.
12. Drobníková V. (1983). Tlumení moru včelího plodu. Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha a Federální ministerstvo zemědělství a výživy, Praha, 29 s.



13. Hansen H., Brødsgaard C. J. (2001). American foulbrood – biology and control. In: Euroconference on MOMEDITO (molecular mechanisms of disease tolerance in honeybees), Kralupy near Prague, 17. – 19. 10. 2000: proceedings. Bee Research Institut, Dol, s. 75–96.
14. Wilson W. T. (1971). Resistance to American foulbrood in honey bees. XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. J. Invertebr. Pathol. 17 (2): 247–255.
15. Lindström A. (2008). Distribution of *Paenibacillus larvae* spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of American foulbrood. Microb. Ecol. 56 (2): 253–259.
16. 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. J. Invertebr. Pathol. 99 (1): 82–86.
17. Fries I., Camazine S. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. Apidologie 32 (3): 199–214.
18. Datta S., Bull J. C., Budge G. E., Keeling M. J. (2013). Modelling the spread of American foulbrood in honeybees. J. R. Soc. Interface 10 (88): 20130650.
19. Spivak M., Reuter G. S. (2001). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. Apidologie 32 (6): 555–565.
20. Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N. H., Starks P. T. (2009). Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. Annu. Rev. Entomol. 54: 405–423.
21. Hasemann L. (1961). How long can spores of American foulbrood live? Am. Bee J. 101: 298–299.
22. Woodrow A. W. (1942). Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. J. Econ. Entomol. 35 (6): 892–895.
23. Brødsgaard C. J., Ritter W., Hansen H. (1998). Response of *in vitro* reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae* spores. Apidologie 29 (6): 569–578.
24. Hansen H., Brødsgaard C. J. (1999). Foulbrood diseases. Apiacta 34 (3): 69–83.
25. Genersch E., Ashiralieva A., Fries I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. Appl. Environ. Microbiol. 71 (11): 7551–7555.
26. Forsgren E., Stevanovic J., Fries I. (2008). Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. Vet. Microbiol. 129 (3–4): 342–349.
27. Bzdil J. (2007). Detection of *Paenibacillus larvae* spores in the debris and wax of honey bee by the Tween 80 method. Acta Vet. Brno 76 (4): 643–648.
28. Dingman D. W., Stahly D. P. (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. Appl. Environ. Microbiol. 46 (4): 860–869.
29. Hornitzky M. A. Z., Karlovskis S. (1989). A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. J. Apic. Res. 28 (2): 118–120.
30. Nordström S., Fries I. (1995). A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. J. Apic. Res. 34 (2): 97–103.



31. Dobbelaere W., de Graaf D. C., Peeters J. E., Jacobs F. J. (2001). Comparison of two commercial kits for biochemical characterization of *Paenibacillus larvae larvae* in the diagnosis of AFB. J. Apic. Res. 40 (1): 37–40.
32. Govan V. A., Allsopp M. H., Davison S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. Appl. Environ. Microbiol. 65 (5): 2243–2245.
33. Han S.-H., Lee D.-B., Lee D.-W., Kim E.-H., Yoon B.-S. (2008). Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood (AFB). J. Invertebr. Pathol. 99 (1): 8–13.
34. Martínez J., Simon V., Gonzalez B., Conget P. (2010). 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. 50 (6): 603–610.
35. Schäfer M. O., Genersch E., Fünfhaus A., Poppinga L., Formella N., Bettin B., Karger A. (2014). Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. Vet. Microbiol. 170 (3–4): 291–297.
36. Olsen P. E., Grant G. A., Nelson D. L., Rice W. A. (1990). Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. Can. J. Microbiol. 36 (10): 732–735.
37. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F. J., Lupski J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Mol. Cell. Biol. 5 (1): 25–40.
38. Genersch E., Otten C. (2003). The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Apidologie 34 (3): 195–206.
39. Neuendorf S., Hedtke K., Tangen G., Genersch E. (2004). Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. Microbiology 150 (7): 2381–2390.
40. Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., de Vos P., Logan N. A., Ali N., Berkeley R. C. W. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46 (1): 270–279.
41. Nakamura L. K. (1984). *Bacillus pulvifaciens* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 34 (4): 410–413.
42. Beims H., Bunk B., Erler S., Mohr K. I., Spröer C., Pradella S., Günther G., Rohde M., von der Ohe W., Steinert M. (2020). Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American foulbrood. Int. J. Med. Microbiol. 310 (2): 151394.



43. Peterson J. W. (1996). Bacterial pathogenesis. In: Baron S. (ed.) Medical microbiology, 4. vyd. University of Texas, Medical Branch at Galveston, Galveston, TX, s. 121–135. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8526/>
44. Qin X., Evans J. D., Aronstein K. A., Murray K. D., Weinstock G. M. (2006). Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. Insect Mol. Biol. 15 (5): 715–718.
45. Chan Q. W. T., Cornman R. S., Birol I., Liao N. Y., Chan S. K., Docking T. R., Jackman S. D., Taylor G. A., Jones S. J. M., de Graaf D. C., Evans J. D., Foster L. J. (2011). Updated genome assembly and annotation of *Paenibacillus larvae*, the agent of American foulbrood disease of honey bees. BMC Genomics 12: 450.
46. 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.
47. Dingman D. W. (2017). Four complete *Paenibacillus larvae* genome sequences. Genome Announc. 5 (22): e00407-00417.
48. Garcia-Gonzalez E., Poppinga L., Fünfhaus A., Hertlein G., Hedtke K., Jakubowska A., Genersch E. (2014). *Paenibacillus larvae* chitin-degrading protein *PlCBP49* is a key virulence factor in American foulbrood of honey bees. PLoS Pathog. 10 (7): e1004284.
49. Fünfhaus A., Poppinga L., Genersch E. (2013). Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. Environ. Microbiol. 15 (11): 2951–2965.
50. Ebeling J., Fünfhaus A., Knispel H., Krska D., Ravulapalli R., Heney K. A., Lugo M. R., Merrill A. R., Genersch E. (2017). Characterization of the toxin Plx2A, a RhoA-targeting ADP-ribosyltransferase produced by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. Environ. Microbiol. 19 (12): 5100–5116.
51. Krska D., Ravulapalli R., Fieldhouse R. J., Lugo M. R., Merrill A. R. (2015). C3larvin toxin, an ADP-ribosyltransferase from *Paenibacillus larvae*. J. Biol. Chem. 290 (3): 1639–1653.
52. Erban T., Zitek J., Bodrinova M., Talacko P., Bartos M., Hrabak J. (2019). Comprehensive proteomic analysis of exoproteins expressed by ERIC I, II, III and IV *Paenibacillus larvae* genotypes reveals a wide range of virulence factors. Virulence 10 (1): 363–375.
53. Erban T., Sopko B., Bodrinova M., Talacko P., Chalupnikova J., Markovic M., Kamler M. (2022). Proteomic insight into the interaction of *Paenibacillus larvae* with honey bee larvae before capping collected from an American foulbrood outbreak: pathogen proteins within the host, lysis signatures and interaction markers. Proteomics 23 (1): 2200146.
54. Bailey L. (1963). Infectious diseases of the honeybee. Land Books, London, 176 s.
55. Ratnieks F. L. W. (1992). American foulbrood: the spread and control of an important disease of the honey bee. Bee World 73 (4): 177–191.
56. Hansen H., Brødsgaard C. J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. Bee World 80 (1): 5–23.



57. Brødsgaard C. J., Hansen H., Ritter W. (2000). Progress of *Paenibacillus larvae* infection in individually inoculated honey bee larvae reared singly *in vitro*, in micro colonies, or in full-size colonies. J. Apic. Res. 39 (1–2): 19–27.
58. Hitchcock J. D., Stoner A., Wilson W. T., Menapace D. M. (1979). Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honey bee larvae of various ages (Hymenoptera: Apidae). J. Kansas Entomol. Soc. 52 (2): 238–246.
59. Katznelson H. (1950). *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. J. Bacteriol. 59 (2):153–155.
60. Vainio E. J., Hantula J. (2000). Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. Mycol. Res. 104 (8): 927–936.
61. Galkiewicz J. P., Kellogg C. A. (2008). Cross-kingdom amplification using *Bacteria*-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 74 (24): 7828–7831.
62. Erban T., Ledvinka O., Kamler M., Hortova B., Nesvorna M., Tyl J., Titera D., Markovic M., Hubert J. (2017). Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. PeerJ 5: e3816.
63. Erban T., Ledvinka O., Kamler M., Nesvorna M., Hortova B., Tyl J., Titera D., Markovic M., Hubert J. (2017). Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. Sci. Rep. 7: 5084.
64. O'Leary N. A., Wright M. W., Brister J. R., Ciufu S., Haddad D., McVeigh R., Rajput B., Robbertse B., Smith-White B., Ako-Adjei D., Astashyn A., Badretdin A., Bao Y., Blinkova O., Brover V., Chetvernin V., Choi J., Cox E., Ermolaeva O., Farrell C. M., Goldfarb T., Gupta T., Haft D., Hatcher E., Hlavina W., Joardar V. S., Kodali V. K., Li W., Maglott D., Masterson P., McGarvey K. M., Murphy M. R., O'Neill K., Pujar S., Rangwala S. H., Rausch D., Riddick L. D., Schoch C., Shkeda A., Storz S. S., Sun H., Thibaud-Nissen F., Tolstoy I., Tully R. E., Vatsan A. R., Wallin C., Webb D., Wu W., Landrum M. J., Kimchi A., Tatusova T., DiCuccio M., Kitts P., Murphy T. D., Pruitt K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. Nucleic Acids Res. 44 (D1): D733–D745.
65. Cox J., Hein M. Y., Luber C. A., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. Mol. Cell. Proteomics 13 (9): 2513–2526.
66. Tyanova S., Temu T., Sinitcyn P., Carlson A., Hein M. Y., Geiger T., Mann M., Cox J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. Nat. Methods 13 (9): 731–740.
67. Antúnez K., Arredondo D., Anido M., Zunino P. (2011). Metalloprotease production by *Paenibacillus larvae* during the infection of honeybee larvae. Microbiology 157 (5): 1474–1480.
68. Holst E. C., Sturtevant A. P. (1940). Relation of proteolytic enzymes to phase of life cycle of *Bacillus larvae*, and two new culture media for this organism. J. Bacteriol. 40 (5): 723–731.



ISBN 978-80-7427-384-1