

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Laboratorní diagnostika patogenních mikroorganismů včely medonosné (*Apis mellifera*)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Kristýna Myslínová**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.**
Rok: 2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. za jeho vstřícný přístup, ochotu, cenné rady a připomínky při psaní.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kristýna Myslínová
Název práce	Laboratorní diagnostika patogenních mikroorganismů včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je bezpochyby nejdůležitějším opylovatelem na světě. Úbytek včelstev v posledních letech je způsoben vzájemným působením mnoha faktorů, mezi které patří i patogeny. Tato práce je zaměřena na pět vybraných patogenů, kterými jsou *Serratia marcescens*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae* a méně prostudovaní parazité *Crithidia mellificae* a *Lotmaria passim*.

V teoretické části byly popsány složky imunitního systému včel, také byla popsána důležitost včelího mikrobiomu a vliv jeho narušení na zdraví včel. Dále byly popsány vybrané patogeny, a to především mechanismy jejich infekčnosti pro včely a šíření infekce. Poslední kapitola teoretické části je poté věnována diagnostice patogenů, a to mikrobiální kultivaci, mikroskopii, analýze MALDI-TOF MS a PCR.

V poslední části práce byl popsán návrh experimentální části, tedy jak by se mohly zpracovat včelí vzorky, jak by mohla být izolována DNA z těchto vzorků a jakým způsobem by byla provedena PCR a elektroforéza v agarosovém gelu pro detekci patogenů.

Klíčová slova	Včelí patogeny, <i>Crithidia</i> , <i>Lotmaria</i> , <i>Nosema</i> , <i>Serratia</i>
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kristýna Myslínová
Title	Laboratory diagnostics of pathogenic microorganisms of honey bee (<i>Apis mellifera</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

The Honeybee (*Apis mellifera*) is without a doubt the most important pollinator in the world. The decline in honeybee population in recent years is caused by several factors, that include bee pathogens. This thesis focuses on five selected pathogens, *Serratia marcescens*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae* and less known parasites *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*.

In the theoretical part of this thesis, the components of honeybee immune system were described, as well as the importance of bee microbiom and the impact of its disruption on bee health. Next, the selected pathogens were described with an emphasis on the mechanisms of their infectivity and the spread of infection. The last chapter is focused on laboratory diagnostics of pathogens, which includes microbial cultivation, microscopy, MALDI-TOF MS and PCR analysis.

In the last part of this theses, a proposed experiment was described, which includes a description of honeybee samples processing, DNA isolation from these samples, PCR, and agarose gel electrophoresis for pathogen detection.

Keywords	Bee pathogens, <i>Crithidia</i> , <i>Lotmaria</i> , <i>Nosema</i> , <i>Serratia</i>
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Včelí patogeny	2
2.2	Obranné mechanismy včel vůči patogenům	3
2.2.1	Fyzikální bariéry	4
2.2.2	Buněčná imunita	4
2.2.3	Humorální imunita	5
2.2.4	Sociální imunita	5
2.3	Mikrobiom včel	6
2.3.1	Faktory ovlivňující včelí mikrobiom	7
2.4	<i>Serratia marcescens</i>	8
2.4.1	Patogenita <i>S. marcescens</i> u včel	9
2.4.2	<i>S. marcescens</i> kmen Sicaria	10
2.5	Hmyzomorka včelí (<i>Nosema apis</i>)	11
2.5.1	Průběh a šíření infekce <i>N. apis</i>	11
2.5.2	Vliv infekce <i>N. apis</i> na včelstvo	14
2.6	Hmyzomorka východní (<i>Nosema ceranae</i>)	14
2.6.1	Vliv infekce <i>N. ceranae</i>	15
2.7	<i>Crithidia mellificae</i>	16
2.8	<i>Lotmaria passim</i>	18
2.8.1	Šíření trypanosomatid	19
3	METODY DIAGNOSTIKY VČELÍCH PATOGENŮ	20
3.1	Kultivační metody	20
3.1.1	Mikrobiální kultivace <i>S. marcescens</i>	20
3.1.2	Mikrobiální kultivace trypanosomatid	21
3.1.3	Mikrobiální kultivace <i>Nosema</i> spp.	21
3.2	Mikroskopické techniky	22
3.2.1	Mikroskopie <i>S. marcescens</i>	22
3.2.2	Mikroskopie <i>Nosema</i> spp.	23
3.2.3	Mikroskopie <i>C. mellificae</i> a <i>L. passim</i>	24
3.3	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	25
3.3.1	Princip MALDI-TOF MS	25
3.3.2	MALDI Biotyper®	27
3.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	27
3.4.1	Složení PCR směsi	28
3.4.2	Průběh reakce	28

3.4.3	Modifikace PCR	30
3.4.3.1	PCR v reálném čase	30
3.4.3.2	PCR s reverzní transkripcí	31
3.4.3.3	Multiplexní PCR	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	Zpracování vzorků	32
4.2	Izolace DNA	33
4.3	PCR	34
4.4	Elektroforéza v agarosovém gelu	37
5	ZÁVĚR	41
6	LITERATURA	42
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	47

Cíle práce

- Zpracování literární rešerše o vybraných patogenech a jejich nebezpečnosti pro včely.
- Zpracování poznatků o molekulárně-biologické a biochemické podstatě jejich infekčnosti a vlivu na zdraví včel.
- Sepsání poznatků o cestách obranyschopnosti včel vůči těmto patogenům (imunita).
- Vypracování literární rešerše o metodách diagnostiky těchto patogenů (mikrobiologické kultivace, mikroskopie, PCR, MALDI MS).

1 ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedním z nejvýznamnějších opylovatelů na světě a její ekologická a ekonomická důležitost je nezpochybnitelná. V posledních letech ale dochází k neobvykle vysokému úbytku včelstev, a to zejména v Severní Americe a Evropě. Tento úbytek je přisuzován působení mnoha faktorů jako jsou včelí patogeny, pesticidy, antibiotika nebo nedostatečná výživa. Tyto faktory mají často synergický efekt, například v případě oslabení včely antibiotiky či nedostatečnou výživou může dojít ke zvýšení náchylnosti vůči některým patogenům (Matthijs *et al.*, 2020).

Včelích patogenů existuje poměrně velké množství, přičemž ne všechny jsou velmi dobře prostudovány. Znalost včelích patogenů a studium mechanismu jejich patogeneze jsou velmi důležité a nezbytné pro vývoj opatření k zajištění zdraví včel. Stejně tak i komplexní screeniny včelích patogenů jsou velmi užitečné, jelikož prevalence patogenů odráží zátěž nemoci ve včelstvu a může také poukázat na případné aditivní interakce mezi určitými patogeny. Tato práce je věnována pěti vybraným patogenům, a to bakterii *Serratia marcescens*, mikrosporidiím *Nosema apis* a *Nosema ceranae* a parazitickým prvokům *Crithidia mellificae* a *Lotmaria passim*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Včelí patogeny

Včelí patogeny jsou jedním z faktorů zapříčiňujících ztráty včelstev. Řadí se mezi ně bakterie, houby, viry, prvoci, ale také i mnohobuněční parazité, jako je roztoč *Varroa destructor*, který navíc funguje jako vektor pro přenos jednobuněčných patogenů (Ravoet *et al.*, 2013).

Asi nejznámějšími včelími onemocněními bakteriálního původu jsou mor a hniloba včelího plodu. Mor včelího plodu je zapříčiněn sporulující bakterií *Paenibacillus larvae* a je to nejvíce prostudované bakteriální onemocnění včel, které se projevuje přeměnou larev na lepkavou zapáchající hmotu. Hniloba včelího plodu je nemoc způsobená bakterií *Melissococcus plutonius* a projevuje se mezerovitostí plodu a úmrtím larev ještě před zavíčováním. Dalšími známými bakteriálními patogeny jsou například *Spiroplasma apis* a *Spiroplasma melliferum*. Včely nakažené *S. apis* jsou neschopné letu a mají ztvrdlé a nafouknuté zadečky. *S. melliferum* byla nalezena v trávicím traktu a hemolymfě a ovlivňuje délku života včel. Častou bakterií, izolovanou z hmyzích hostitelů je také *Serratia marcescens*, která po vniknutí do hemolymfy včel způsobuje letální septikémii (Fünfhaus *et al.*, 2018).

Mezi parazitické houby napadající včely se řadí mikrosporidie *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Oba tyto parazité napadají trávicí trakt včel a způsobují nemoc zvanou nosematóza. Další známou parazitickou houbou je například *Ascosphaera apis*, způsobující zvápenatění včelího plodu. Dále pak *Aspergillus fumigatus* a *Aspergillus flavus*, způsobující zkamenění včelího plodu (Fries *et al.*, 2013; Sarwar, 2016).

Kromě hub existují i další eukaryotické patogeny včel, například parazité z řádu *Trypanosomatida*. U včel byly zatím nalezeny trypanozómy *Crithidia mellificae* a *Lotmaria passim*, které jsou u včel poměrně neprozkoumanými parazity. Někteří zástupci trypanosomatid, parazitující na příbuzném hmyzu, jsou ale původci mnoha nemocí (Williams *et al.*, 2019).

Virů napadajících včelu medonosnou je známo více jak 20 druhů a většina z nich jsou RNA viry. Mohou napadat všechna vývojová stádia včel a způsobují mnoho různých klinických příznaků, jako jsou deformity křídel, ztráta ochlupení, smrt larev či

behaviorální změny u dospělých včel. Viry se přenášejí buď vertikálně čili z infikované matky na potomstvo, nebo horizontálně, tedy například ze včely na včelu pomocí trofalaxe (tedy předávání potravy či tekutin mezi včelami), či při krmení larev, nebo také přenosem z roztoče *V. destructor*, který se živí tukovou tkání a hemolymfou včel (Matthijs *et al.*, 2020).

Mnoho včelích virů neprodukuje žádné jasně viditelné fyzické či behaviorální změny u včel. Viry, které jsou nejvíce studovány obvykle mají alespoň jeden specifický symptom, který umožňuje spolehlivou diagnózu. Častými viry jsou například virus deformovaných křídel (DWV), virus akutní paralýzy včel (ABPV), virus chronické paralýzy včel (CBPV), virus černání matečnicku (BQCV), kašmírský virus (KBV) a virus pytlíčkovitého plodu (SBV). Mezi méně časté viry patří například virus jezera Sinai (LSV), virus smrtelné paralýzy mšic (ALPV) kmen Brookings, virus velké řeky Sioux (BSRV), včelí virus Y (BVY) a vláknitý virus (AmFV) (Ravoet *et al.*, 2013; Beaufort *et al.*, 2020; Matthijs *et al.*, 2020).

DWV napadá tkáň celého včelího těla a projevuje se deformací křídel, zkrácením zadečku, paralýzou, zkrácením délky života atd. ABPV, KBV a CBPV napadají nervový systém a hypofaryngeální žlázy, projevují se např. třasem, neschopností letu a rychlou smrtí silně nakažených včel. BQCV napadá střevní tkáň, způsobuje zežloutnutí až zhnědnutí larev matek, přičemž plod má pytlíčkovitý tvar a dospělci mají zkrácenou délku života. SBV napadá hypofaryngeální žlázy včelích dělnic a svalové buňky a buňky trachejí larev, projevuje se pytlíčkovitostí plodu, narušuje metabolickou aktivitu a životnost včel (Beaufort *et al.*, 2020).

2.2 Obranné mechanismy včel vůči patogenům

Obranu proti mikrobiálním patogenům zajišťuje imunitní systém včel. Narozdíl od obratlovců disponuje včela medonosná pouze vrozeným imunitním systémem. Imunita včely jako jedince se skládá ze tří složek, a to z fyzikálních bariér, humorální imunity a buněčné imunity. U včel se ale podobně jako u vos, mravenců či termitů vyvinula navíc sociální imunita. Včely mají stejné signální dráhy jako například octomilky nebo rod *Anopheles*. Mnoho znalostí imunitního systému včel tak bylo odvozeno od imunitního systému dvoukřídlého hmyzu, přičemž včela patří mezi blanokřídlé (Larsen *et al.*, 2019).

2.2.1 Fyzikální bariéry

Fyzikální bariéry brání vstupu patogenu do organismu a řadí se mezi ně kutikula, stěna zažívacího traktu a stěna tracheí. Proniknout skrz tyto bariéry jsou často schopny viry, a to za pomoci vektoru, například roztoče *V. destructor*, který fyzikální bariéry narušuje (Larsen *et al.*, 2019).

Kutikula hmyzu se dělí na epikutikulu, exokutikulu, mezokutikulu a endokutikulu. Endokutikula je složena z chitinu a proteinů, které se zesítují a formují pevnou strukturu. Kromě této vnější bariéry mají včely také česlo, což je aparát sloužící jako chlopeň pro průchod potravy z medného včáčku do žaludku. Zároveň slouží jako filtr pro zachycení patogenních spor. Další vnitřní mechanickou ochranou je peritrofická membrána, která slouží jako fyzikální bariéra vůči patogenům, které již byly stráveny (Caputo, 2017).

2.2.2 Buněčná imunita

Buněčná imunita je zprostředkována hemocyty, což jsou buňky transportované hemolymfou, které zajišťují procesy jako je fagocytóza, nodulace a enkapsulace následovaná melanizací. Buněčná imunita je zároveň úzce spojena s humorální imunitou, jelikož důležitou rolí hemocytů je také syntéza látek účastnících se humorální imunitní odpovědi, jako jsou antimikrobiální peptidy (Larsen *et al.*, 2019).

Fagocytóza znamená pohlcení cizorodé částice jedním hemocytem a nastává, pokud má daná částice malou velikost. V případě patogenů, které jsou moc velké na to, aby byly fagocytovány, nastává proces enkapsulace, při kterém dochází ke kooperaci několika hemocytů. Hemocyty separují patogen od hostitelských buněk, čímž jej omezují v přístupu kyslíku a živin. Může také nastat nodulace, při které dochází k formulaci nodul, což jsou velké akumulace hemocytů, tvořící extracelulární matrix zachycující bakterie (Sideri *et al.*, 2008; Caputo, 2017).

Další složkou imunity je tzv. melanizace, což je kombinace humorální a buněčné imunity a nastává během enkapsulace, nodulace a hojení. Dochází během ní k oxidaci fenolů na chinony, které poté polymerují a tvoří melanin. Melanin je následně přenášen do okolí cizích mikroorganismů jako pomoc pro jejich oddělení již u místa rány. Během melanizace vznikají chinonové látky a další reaktivní kyslíkaté meziprodukty, u kterých se předpokládá jejich přímá toxicita na mikroorganismy. Zároveň melanizace funguje

jako pomocná síla při koagulaci, hojení ran, fagocytóze a hraje roli při expresi antimikrobiálních peptidů (Tang, 2009; Larsen *et al.*, 2019).

2.2.3 Humorální imunita

Humorální imunita je zprostředkována různými chemickými látkami a antimikrobiálními peptidy (AmP). Tyto látky mohou být produkovány hemocyty, epiteliálními buňkami a slinnými žlázami. Nejvíce jsou ale humorální efekторы produkovány v tukovém tělisku. Produkce AmP je poměrně rychlá, udávají se 2–4 hodiny po rozpoznání nákazy (Caputo, 2017; Larsen *et al.*, 2019).

Včely mají geneticky zakódovány čtyři AmP, které mají antimikrobiální aktivitu v hemolymfě a jsou sekretovány jako odpověď na mikrobiální infekce nebo hnisavá zranění. Těmito AmP jsou apidaeciny, abaecin, hymenoptaecin a defensiny. Většina AmP jsou kationtové nebo amfipatické peptidy, což jim umožňuje interagovat s negativně nabitou lipidovou membránou obsahující lipopolysacharidy a narušovat ji. Tato interakce peptidů s membránou většinou vyústí ve formaci kanálků, které umožní únik malých iontů a esenciálních metabolitů, popřípadě i penetraci proteinů, což má pro bakterie fatální následky (Daníhlík *et al.*, 2015; Larsen *et al.*, 2019).

2.2.4 Sociální imunita

Sociální imunita je kolektivní obrana vůči patogenům a parazitům, která vychází z behaviorální spolupráce mezi jednotlivci ve včelstvu. Mechanismů sociální imunity je několik. Prvním mechanismem je například hygienické chování včel, kdy jsou včely schopny rozpoznat a odstranit nemocné jedince. Včelí dělnice odstraňují včely, které zemřely v úlu, a také odstraňují larvy, které jsou buď nemocné, nebo parazitované. Nemocné včely navíc instinktivně opouštějí včelstvo a umírají dále od úlu (DeGrandi-Hoffman a Chen, 2015; Larsen *et al.*, 2019).

Další částí sociální imunity je tzv. grooming, kdy včely odstraňují vnější parazity ze svých těl nebo těl jiných včel pomocí noh a mandibul. Toto chování hraje významnou roli v rezistenci vůči roztoči *V. destructor* a je ovlivněno genetickými faktory, které se liší u různých druhů včel (Larsen *et al.*, 2019). Termoregulační chování je také důležitou součástí sociální imunity, zvláště tzv. sociální horečka, která působí proti patogenům

citlivým na teplo. Zvýšení teploty je účinné například proti houbě *A. apis* (DeGrandi-Hoffman a Chen, 2015).

Včely, kromě skupinového chování v úlu, navíc sbírají propolis. Propolis je rostlinná pryskyřice s antimikrobiálními účinky, kterou včely používají k vytvoření vzduchotěsné a voděodolné vrstvy uvnitř hnízda. Krom toho mohou propolis použít k mumifikaci malých obratlovců, např. myší, které vniknou do úlu. Některé látky v propolisu jako kyselina *p*-kumarová mohou podporovat expresi genů imunitního systému (DeGrandi-Hoffman a Chen, 2015; Larsen *et al.*, 2019).

2.3 Mikrobiom včel

Střevní mikrobiom má obecně u zvířat velký význam, napomáhá například při trávení potravy a detoxikaci škodlivých látek, poskytuje esenciální živiny, ale také chrání vůči patogenům a parazitům a ovlivňuje imunitu. Složení střevního mikrobiomu se u různých druhů organismů značně liší a může obsahovat stovky různých bakteriálních druhů. Mikrobiom u dospělých včel je ale dominován pouze devíti bakteriálními druhy (Kwong a Moran, 2016).

Mezi hlavní bakterie mikrobiomu patří gramnegativní bakterie *Snodgrassella alvi* a *Gilliamella apicola* a grampozitivní bakterie *Bifidobacterium asteroides* a skupiny *Lactobacillus* Firm-4 a *Lactobacillus* Firm-5. Dalšími méně početnými bakteriemi jsou *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Parasaccharibacter apium* a linie bakterií z čeledi *Acetobacteraceae*, příbuzná rodu *Gluconobacter*, nazývaná Alpha2.1 (Kwong a Moran, 2016).

Bakterie včelího mikrobiomu jsou v rámci trávicí soustavy včel různě rozmístěny. Nejméně bakterií se nachází v medněm volátku a jedná se především o bakterie *Lactobacillus kunkeei* a *P. apium*, které se nachází v nektaru a v materiálu pro stavbu úlu. V žaludku se také nachází poměrně malé množství bakterií, jelikož žaludek neposkytuje vhodné podmínky pro bakteriální kolonizaci kvůli přítomnosti peritrofitické membrány. Naproti tomu v tenkém střevě a rektu se již nacházejí početné mikrobiální komunity, a to v počtu mezi 10^8 až 10^9 buněk, což je více jak 99 % z celkového počtu bakterií v těle dělnic. V tenkém střevě se nacházejí hlavně gramnegativní bakterie a v rektu poté grampozitivní fermentativní bakterie rodu *Lactobacillus* a také *B. asteroides*. Přesná kompozice mikrobiomu včel se ale liší v závislosti na věku a kastě dané včely. Včelí

matky například často postrádají některé bakteriální druhy přítomné u včelích dělnic a obecně jsou u nich dominantní *P. apium* a bakterie z linie Alpha2.1, což je zapříčiněno jejich odlišnou fyziologií a stravou (Kwong a Moran, 2016).

Kromě výše zmíněných bakterií se v trávicí soustavě včel také vyskytují i jiné, vzácnější druhy, které často patří mezi oportunní patogeny. Jedná se především o bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, do které patří bakterie *Hafnia alvi* a druhy *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella* a *Serratia* (Kwong a Moran, 2016; Raymann a Moran, 2018).

2.3.1 Faktory ovlivňující včelí mikrobiom

Složení mikrobiomu je ovlivněno mnoha faktory jako jsou strava, stres, imunitní odpověď, stárnutí a vystavení antibiotikům či pesticidům. Narušení mikrobiomu může mít přitom vážné následky a má velký vliv na vývoj dělnic. Například narušení v raném stádiu vývoje ovlivňuje expresi genů důležitých pro vývoj a pravděpodobně také ovlivňuje fungování imunitního systému. U dospělých včel pak narušení mikrobiomu může způsobit zvýšenou citlivost vůči některým patogenům jako jsou například parazité z řádu *Trypanosomatida* (Raymann a Moran, 2018).

V České republice je používání antibiotik na včelstva zakázáno, nicméně v některých oblastech (např. USA) je jejich používání rutinou a slouží především pro prevenci moru a hniloby včelího plodu. Jedním z běžně používaných antibiotik je tetracyklin. Používání tetracyklinu má velký vliv na složení mikrobiomu včel a také zvyšuje jejich úmrtnost, například právě díky zvýšené citlivosti na oportunní patogeny (Raymann a Moran, 2018).

Negativní vliv na včely mají také mikroplasty, konkrétně polystyrenové mikroplasty, které byly nalezeny na květech některých rostlinných druhů. Tyto mikroplasty ovlivňují strukturu a diverzitu včelího mikrobiomu a případné narušení mikrobiomu antibiotiky pak zvyšuje úmrtnost včel vystavených mikroplastům (Wang *et al.*, 2021).

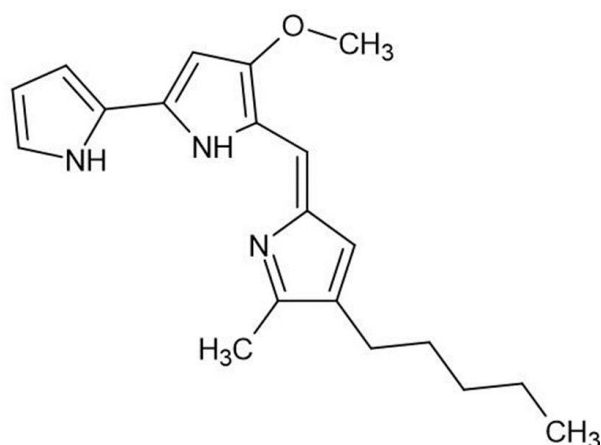
2.4 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je gramnegativní tyčinkovitá bakterie, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o fakultativně anaerobní organismus, který v roce 1819 objevil italský lékárník Bartolomeo Bizio. Pojmenována poté byla na počest fyzika Serafina Serratiho (Yu, 1979).

S. marcescens, stejně jako další zástupci rodu *Serratia*, tvoří typicky červené kolonie. Toto zbarvení je způsobeno pigmentem prodigiosinem, který je nejvíce produkován ve stacionární fázi růstu jako sekundární metabolit. Obsahuje ve své struktuře tři pyrrolová jádra, podobně jako porfyriny, chlorofyl či fykobiliny (Madigan *et al.*, 2012). Během lag fáze je produkce prodigiosinu spojována se zvýšenou produkcí ATP, přičemž pigmentované buňky jsou schopny rychlejší akumulace ATP a dělení než buňky nepigmentovaných kmenů, čímž je zvýšena produkce jejich biomasy (Haddix a Shanks, 2018). U prodigiosinu byly také objeveny zajímavé účinky na lidský organismus, jako například jeho proapoptotická aktivita vůči rakovinným buňkám nebo imunosupresivní účinky pozorované např. jako zpožděná autoimunitní reakce u diabetu. Vzhledem k tomu, že nevykazuje toxické, mutagenní a jiné škodlivé vlivy, by mohl také sloužit jako náhrada syntetických barviv v potravinovém průmyslu (Darshan a Manonmani, 2015).

Prodigiosin (2-methyl-3-amyl-methoxyprodigiosen, obr. 1) v buňce vzniká enzymově katalyzovanou kondenzací stabilního 2-methyl-3-pentylpyrrolu (MPP) a nestabilního 4-methoxy-2-2'-bipyrrol-5-karbaldehydu (MBC). Biosyntéza MPP a MBC je několikakrokový proces katalyzovaný skupinou tzv. Pig enzymů, a jejími prekurzory jsou acetát/malonát, serin, methionin a prolin. Prodigiosin je u *S. marcescens* tvořen pouze v aerobním prostředí a přesná barva kolonií závisí na kultivačních podmínkách (Brenner *et al.*, 2005; Darshan a Manonmani, 2015).

S. marcescens se obecně nachází ve vodě a v půdě, ale také v trávicím traktu hmyzu a obratlovců (Madigan *et al.*, 2012). U včel se vyskytuje v malém množství v trávicím traktu, je součástí střevní mikroflóry a řadí se mezi oportunní patogeny (Raymann a Moran, 2018). Bakterie *S. marcescens* je známo několik kmenů, v trávicím traktu se například vyskytují kmeny kz2, kz11 a kz19 (Raymann *et al.*, 2018). U kmenu kz11 bylo dokázáno, že po vystavení včel antibiotikům či pesticidům způsobuje jejich zvýšenou úmrtnost (Raymann *et al.*, 2017).

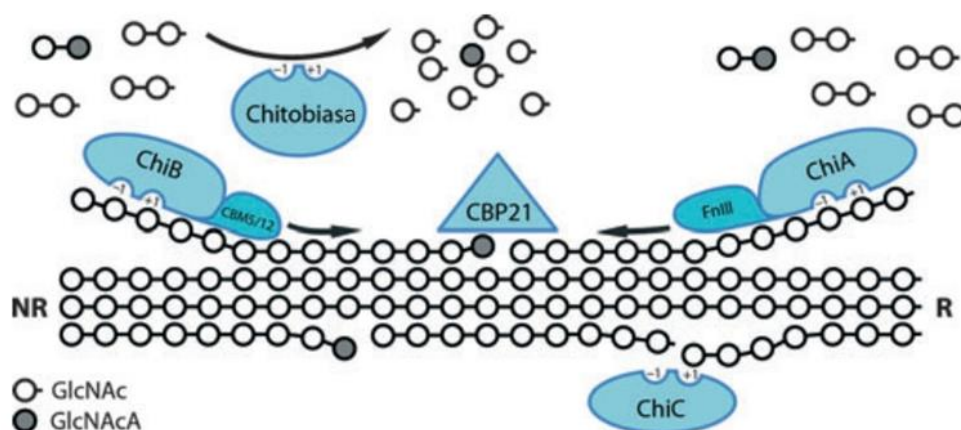


Obr. 1 Strukturní vzorec prodigiosinu (vytvořeno v aplikaci Chemscketch podle databáze PubChem).

2.4.1 Patogenita *S. marcescens* u včel

S. marcescens se u včel stává patogenní v případě, že se dostane do hemolymfy. Tento průchod je umožněný díky enzymu CBP21, což je chitin vázající a degradující enzym, exprimovaný bakterií *S. marcescens*. Podobný enzym, PICBP49, je klíčovým virulentním faktorem bakterie *P. larvae* zodpovědný za degradaci peritrofitické membrány larev (Fünfhaus *et al.*, 2018).

CBP21 patří mezi lytické polysacharidové monooxygenasy (EC 1.14.99.53) a je schopen depolymerizovat řetězce chitinu skrz oxidativní mechanismus, při kterém vzniká aldonová kyselina (GlcNAcA, obr.2). Zároveň má CBP21 stimulační efekt na aktivitu chitinas (EC 3.2.1.14), které štěpí glykosidové vazby chitinu. CBP21 působí na místech těžko přístupných pro chitinasy, díky tomu jsou po naštěpení řetězce vytvořena místa, na která se chitinasy mohou snadněji vázat. *S. marcescens* produkuje tři izoformy těchto chitinas, a to chitinasu A, B a C (ChiA, ChiB, ChiC). ChiA a ChiB degradují řetězce chitinu na opačných stranách a produkují chitobiosu. ChiC je endoaktivní chitinas, náhodně štěpící řetězce chitinu na amorfních místech, čímž otevírá regiony pro atak ChiA a ChiB. Dále pak bakterie produkuje chitobiasu (EC 3.2.1.52), která konvertuje chitobiosu na *N*-acetylglukosamin (GlcNAc, obr. 2; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013). Jelikož je výstelka trávicího traktu složena z chitinu, způsobují enzymy proděravění výstelky, a tím umožňují vniknutí bakterie do hemolymfy. V hemolymfě pak *S. marcescens* způsobuje sepsi, která se projevuje ztrátou schopnosti včel létat či pohybovat se. V zimě se takto oslabené včely odpojují od zimního klastru a oslabují tak celé včelstvo (Fünfhaus *et al.*, 2018).

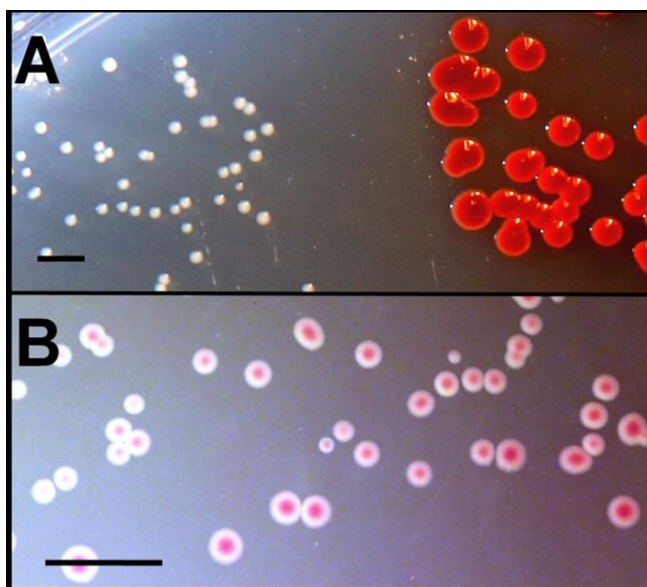


Obr. 2 Schématické znázornění působení chitinolytických enzymů bakterie *S. marcescens* na řetězce chitinu; NR – neredukující konce, R – redukující konce (převzato z Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013).

2.4.2 *S. marcescens* kmen Sicaria

V hemolymfě včely byl v roce 2016 také nalezen nový kmen *S. marcescens*, a to kmen Sicaria (Ss1), pojmenovaný podle latinského výrazu pro zabijáka. Do těla včel se dostává přenosem z roztoče *Varroa destructor*. Tento parazit se živí hemolymfou a tukovou tkání včely a je zároveň přenašečem různých infekcí či patogenů. Bakterie samotného roztoče nepoškozuje a po přenosu na zdravou včelu se po infikování mohou na včele živit další roztoči, čímž se bakterie šíří dál (Burritt *et al.*, 2016; Ramsey *et al.*, 2019).

Ss1 vykazuje fenotypické a biochemické odlišnosti od ostatních kmenů *S. marcescens*. Netvoří typické velké červené kolonie, ale menší bílé kolonie s vínově červeným středem, viditelným po podsvícení kolonie umělým osvětlením (obr. 3). Pro *S. marcescens* jsou navíc typické některé biochemické reakce. Je například schopná využívat lysin jako zdroj uhlíku a energie pro růst, nicméně lysin dekarboxylasový test na Ss1 je negativní. Stejně tak i test na aktivitu gelatinasy (EC 3.4.24.24), produkci acetoinu, hydrolýzu eskulinu, využití citrátu a další. Společnou vlastností Ss1 s ostatními kmeny je například aktivita DNasy (EC 3.1.11.4) při 22 °C (Burritt *et al.*, 2016).



Obr. 3 a) Kolonie Ss1 na levé straně, napravo kontrolní kolonie *S. marcescens* #361 na LB agaru, b) kolonie Ss1 na McConkeyho agaru podsvícené lampou; měřítko 5 µm (převzato a upraveno dle Burritt *et al.*, 2016).

2.5 Hmyzomorka včelí (*Nosema apis*)

Hmyzomorka včelí (*Nosema apis*), je parazitická houba řadící se mezi mikrosporidie. Jako první byla popsána v roce 1909 německým zoologem a včelařem Enochem Zanderem (Fries, 1993).

Způsobuje nemoc zvanou nosematóza, což je průjmové onemocnění a projevuje se kálením včel na stěnách úlu a na plástech. Silně infikovaná včelstva navíc vykazují sníženou produkci potomstva a jejich pomalý růst (Fries *et al.*, 2013). U *N. apis* byl zároveň pozorován sezónní charakter s nejvyšším dopadem na včelstvo v zimním období (Kamler *et al.*, 2011).

2.5.1 Průběh a šíření infekce *N. apis*

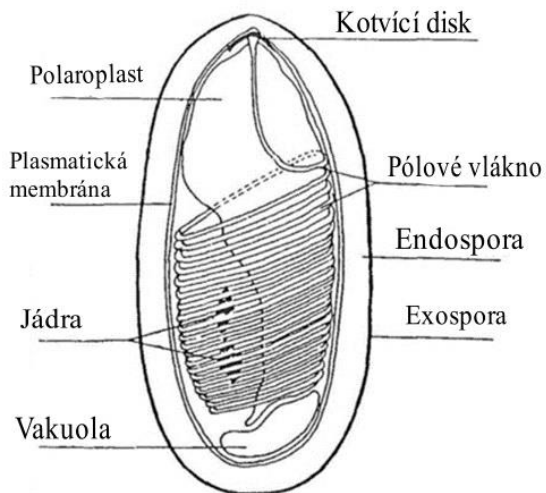
N. apis je intracelulární parazit tvořící spory, díky nimž se šíří mezi hostiteli. Spory mikrosporidií obecně mají tlustou stěnu složenou ze tří vrstev, a to z bílkovinné exospory, z chitinové endospory a z plazmatické membrány uzavírající cytoplazmu, jádro (popřípadě jádra), posteriorní vakuolu, polaroplast a extruzní aparát. Extruzní aparát obsahuje pólové vlákno obtočené kolem jádra a kotvící disk (Franzen a Müller, 1999). Spory *N. apis* mají velikost 4–6 × 2–4 µm (Sulborska *et al.*, 2019) a jejich pólové vlákno

je obtočené kolem jádra často více jak třicetkrát (obr. 4; Fries *et al.*, 2013). Do organismu včely se spory dostávají konzumací kontaminované potravy či vody a následně se také šíří trofalaxí (Higes *et al.*, 2010).

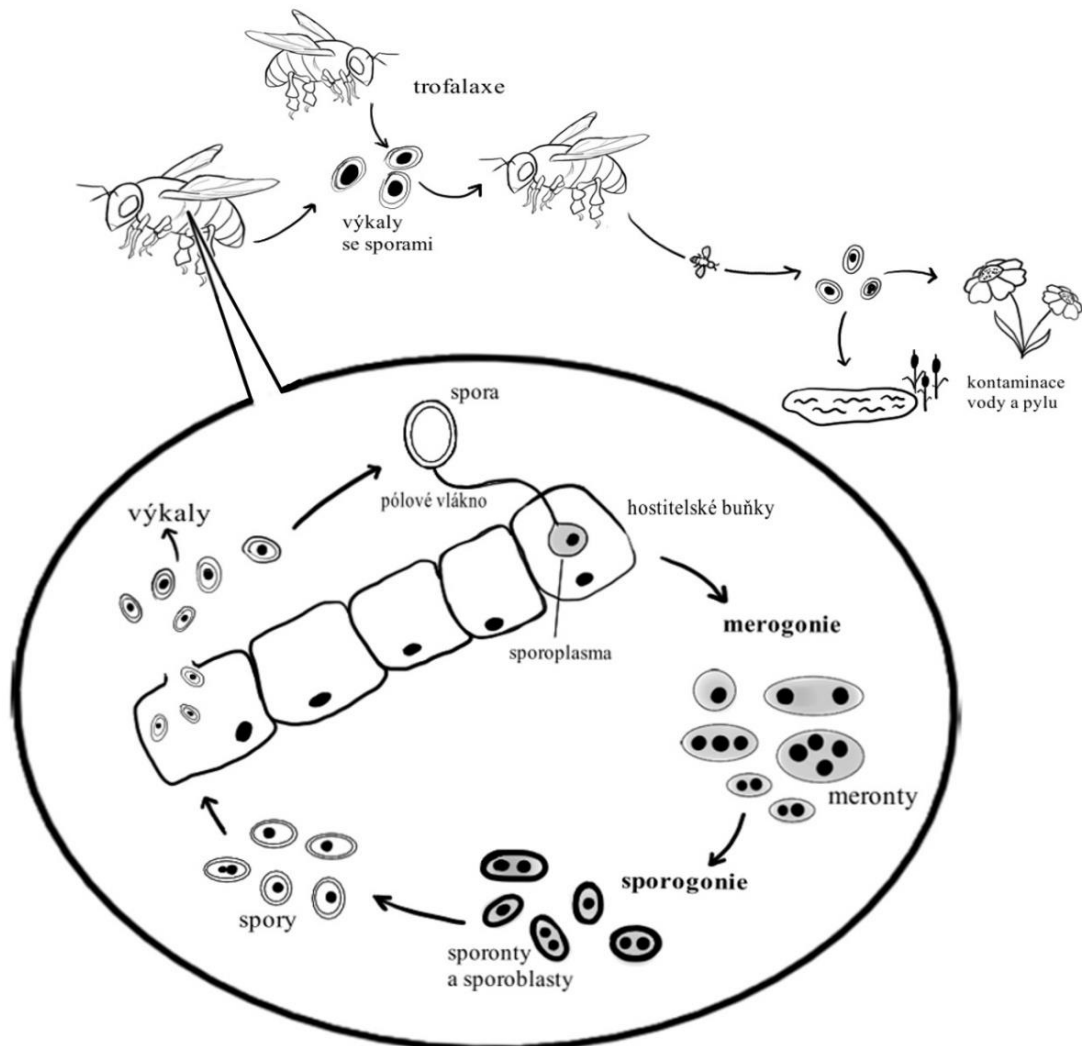
Po konzumaci se spory dostanou do žaludku včely, kde vyklíčí, a poté vytlačí pólové vlákno, díky němuž může infekční sporoplasma proniknout do epitelových buněk (Fries *et al.*, 1992). Pólové vlákno je vytlačeno díky bobtnání polaroplastu a vakuoly během germinace. Zvýšení tlaku uvnitř spory vede k prasknutí kotvícího disku, díky čemuž dojde k vystřelení pólového vlákna, kterým následně projde sporoplasma (Keeling a Fast, 2002). Sporoplasma je uvolněna přímo do cytoplazmy hostitelské buňky, kde nastává nejprve asexuální množení neboli merogonie. Během merogonie se ze sporoplasmy stává tzv. meront, což je forma vegetativní buňky, která má zaoblený, nepravidelný a podlouhlý až vřetenkovitý tvar s málo diferenciovanou cytoplazmou, uzavřenou plazmatickou membránou. Během merogonie poté dochází buď k úplnému buněčnému dělení, nebo může dojít pouze k dělení jadernému, přičemž vznikají mnohojaderné podlouhlé meronty. Po merogonii následuje sporogonie, při které dochází k vyvinutí merontů ve sporonty, pro které je charakteristický tuhý povrchový plášť, který se dále vyvíjí v exosporu. Sporonty se dále dělí na sporoblasty, ze kterých se vyvíjí spory (Fries *et al.*, 1992; Franzen a Müller, 1999; Gisder *et al.*, 2011).

V závislosti na teplotě se hostitelský epitel naplní sporami během jednoho týdne (De Graaf *et al.*, 1994). V této situaci mohou buňky prasknout, a tím uvolnit novou generaci primárních spor, které mohou infikovat další buňky (Huang *et al.*, 2012). Včelí organismus je ale schopen další infekci zabránit. Imunitní systém včel reaguje na infekci zvýšením exprese genů kódujících antimikrobiální peptidy a enzymy spojené s imunitou (Antúnez *et al.*, 2009). V případě, že se infekci dalších buněk podaří zamezit, se primární spory vyvinou ve spory environmentální, které jsou vyloučeny výkaly. V opačném případě primární spory infikují více buněk a dále se množí (obr. 5; Huang *et al.*, 2012).

Včely nakažené nosematózou navíc kálejí po stěnách úlu a jelikož tyto výkaly uklízejí ostatní včely, šíří se spory dál po celém včelstvu. Významný přenos spor je také způsoben trofalaxí včel. Po vylétnutí včel z úlu dochází ke kontaminaci vody a pylu v okolí (obr. 5), čímž hrozí i nákaza dalších včelstev (Kamler *et al.*, 2011).



Obr. 4 Schématické znázornění spory *N. apis* (převzato a upraveno dle Fries, 1993).



Obr. 5 Schéma přenosu infekce *N. apis* a její životní cyklus v těle včely (vytvořeno podle Franzen a Müller, 1999; Kamler *et al.*, 2011).

2.5.2 Vliv infekce *N. apis* na včelstvo

Degenerace epitelové tkáně způsobená infekcí ovlivňuje hladinu mastných kyselin a zásobního proteinu vitellogeninu v hemolymfě, čímž je ovlivněna sekrece enzymů a množství proteinů v hypofaryngeálních žlázách, které částečně slouží k výrobě mateří kašičky (Bahreini a Currie, 2015). Vitellogenin je prekurzorový protein vaječného žloutku a je syntetizován v tukovém tělese včel (Corona *et al.*, 2007). Má pleiotropní efekt na dělbu práce a opatření potravy, čímž napomáhá organizovanosti včelí společnosti. Exprese vitellogeninu bývá také spojována s rezistencí vůči oxidačnímu stresu a její narušení má tedy na včely poměrně velký dopad (Antúnez *et al.*, 2009).

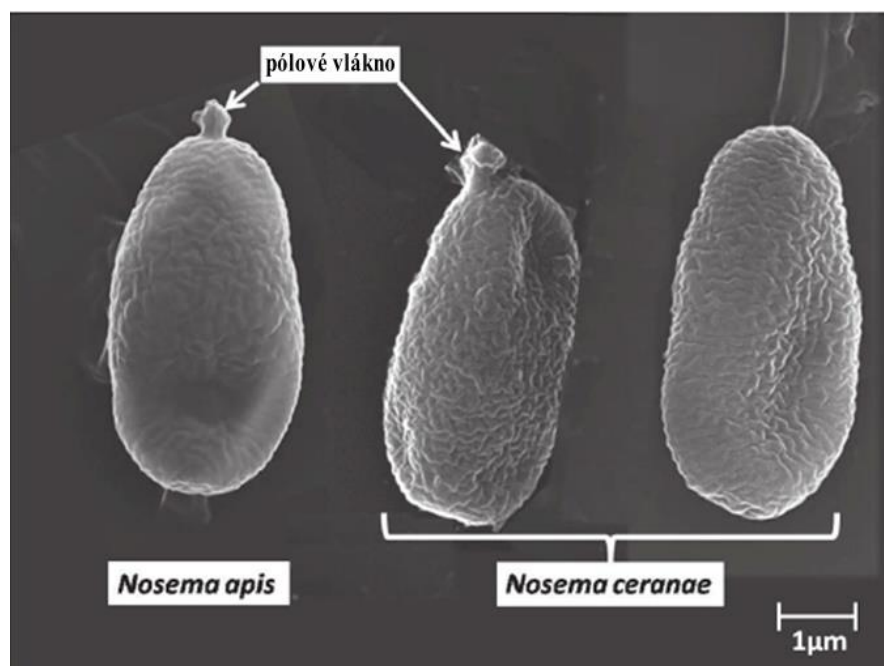
Infekce *N. apis* je také spojována se třemi virovými infekcemi, a to s BQCV, BVY a AmFV. *N. apis* a zmíněné viry na sebe mají synergický účinek. Například kombinace *N. apis* s BQCV je mnohem škodlivější nežli samotné jednotlivé infekce (Fries *et al.*, 2013).

2.6 Hmyzomorka východní (*Nosema ceranae*)

Nosema ceranae je stejně jako *N. apis* intracelulární parazit, způsobující nosematózu včel. Tuto mikrosporidii poprvé popsal v roce 1996 švédský profesor Ingemar Fries a pojmenoval ji podle hostitele *Apis cerana* (Fries *et al.*, 1996).

Ačkoliv byla *N. ceranae* objevena v asijské včele, v posledních letech byla detekována i v evropské včele *A. mellifera*. Některé studie navíc ukazují, že může být více virulentní než *N. apis* (Paşca *et al.*, 2019). Zatímco je *N. apis* spojována se zimní úmrtností, *N. ceranae* má na svědomí úmrtnost včel v teplejších oblastech a obdobích (Fries *et al.*, 2013).

Spory *N. ceranae* (obr. 6) mají velikost $3,3\text{--}5,5 \times 2,3\text{--}3,0 \mu\text{m}$ (Sulborska *et al.*, 2019). Jsou tedy menší než spory *N. apis* a jejich pólové vlákno bývá kolem jádra obtočeno $20 - 23\times$ (Fries *et al.*, 1996).



Obr. 6 Spory *N. apis* a *N. ceranae* pozorované pod skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) s viditelným počátkem vytažení pólového vlákna (převzato a upraveno z Ptasińska *et al.*, 2012).

2.6.1 Vliv infekce *N. ceranae*

Mechanismus infekce *N. ceranae* je stejný jako u *N. apis*, nicméně celkový vliv na hostitele se u těchto parazitů liší. Například imunosuprese byla pozorována pouze u *N. ceranae*. Infekce *N. ceranae* negativně ovlivňuje transkripci některých genů a expresi antimikrobiálních peptidů. Konkrétně exprese abaecinu a hymenoptaecinu je vlivem infekce značně snížena. Tyto peptidy jsou součástí humorální imunity včel a jsou důležité v zabránění infekce gramnegativními a grampozitivními bakteriemi. *N. ceranae* také ovlivňuje expresi glukosadehydrogenasy (EC 1.1.5.9), což je enzym, hrající roli v aktivaci buněčné imunity. Takové narušení imunity navíc usnadňuje replikaci různých nebezpečných virů, jako je DWV, BQCV, CBPV a KBV (Antúnez *et al.*, 2009; Hubert *et al.*, 2017).

Pro zabránění množení a šíření parazita je u infikovaných buněk přirozeně indukována apoptóza. Mikrosporidie jsou schopny manipulace metabolismu hostitelské buňky a ovlivňují expresi apoptotických genů a jiné důležité pochody. Jak infekce *N. ceranae*, tak infekce *N. apis* zvyšuje expresi genů *buffy* a *BIRC5*, které mají velmi důležitou roli pro programovanou smrt. *BIRC5* je inhibitor apoptózy, který produkuje protein, inhibující

aktivaci kaspas. *Buffy* naproti tomu kóduje protein zvaný Bcl-2-like pro-survival protein, který kontroluje integritu vnější mitochondriální membrány. Kromě vlivu na tyto geny mají *Nosema* spp. také vliv na G1 fázi buněčného cyklu, která je rozhodující pro další osud buňky (apoptóza, dělení, diferenciací atd.). G1 fázi a progresi do S fáze ovlivňují oba druhy různými způsoby, ale především se jedná o indukci nadměrné exprese cyklinů, a to konkrétně cyklinu B1 u *N. apis* a cyklinu E u *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2017).

U včelích buněk infikovaných *N. ceranae* bylo také pozorováno jejich celkové zvětšení, přičemž jejich cytoplazma obsahovala zvýšený počet mitochondrií a ribozomů. Některé z mitochondrií pak obklopovaly membránu merontů, což poukazuje na externí přísun energie pro parazita. Zvýšení metabolické aktivity hostitelských buněk pro potřeby parazita potvrzuje fakt, že při infekci *N. ceranae* dochází ke zvýšení exprese genů kódujících proteiny klíčové pro procesy energetického metabolismu. Takovým genem je například gen MRP L16 kódující mitochondriální ribosomální protein L16, který má důležitou roli pro sestavení a strukturu peptidyltransferasového centra ribosomu a je nezbytný pro správnou funkci mitochondriálních ribosomů (Martín-Hernández *et al.*, 2017). Dále je při infekci zvýšena exprese 6A1 podjednotky cytochrom c oxidasy (EC 7.1.1.9) a beta podjednotky ATP synthasy (EC 7.1.2.2), přičemž oba tyto enzymy katalyzují terminální reakci elektronového transportního řetězce. Zvýšená exprese glukosidasy II (EC 3.2.1.84) pak poukazuje na navýšení katabolismu sacharidů (Kurze *et al.*, 2016). *N. ceranae* tak způsobuje nutriční a energetický stres pro včelu, který vyvolá zvýšení příjmu potravy bohaté na glukosu. Pro mikrosporidie je závislost na hostitelově ATP obvyklá vzhledem k jejich značně redukovanému genomu, nicméně u *N. apis* nebyl tento jev pozorován (Martín-Hernández *et al.*, 2017).

2.7 *Crithidia mellifica*

Crithidia mellifica je eukaryotický parazit z řádu *Trypanosomatida*, který byl poprvé popsán v roce 1967 v Austrálii (Langridge a McGhee, 1967). Nicméně jako včelí patogen byla *C. mellifica* popsána až poměrně nedávno, a to v roce 2013, kdy byl zjištěn její negativní impakt na zdraví včel a byla označena jako nový faktor přispívající k zimnímu úhynu včelstev v Belgii. Zároveň byl pozorován synergický efekt infekce *C. mellifica* a *N. ceranae* (Ravoet *et al.*, 2013). *C. mellifica* je také spojována s imunosupresí,

snížením délky života hostitele, fyziologickými a behaviorálními změnami a také negativně ovlivňuje produktivitu včelstev (Arismendi *et al.*, 2020).

Trypanosomatidy obecně mají vlastnost polymorfie a během svého vývoje vytvářejí různá stádia, lišící se morfologicky a fyziologicky. Tyto morfotypy se liší u různých druhů a také během fází životního cyklu. Zároveň slouží k adaptaci trypanosomatid na různá prostředí. Morfotypů se uvádí osm a dělí se na základě pozice kinetoplastu a bičíku a celkového tvaru buňky (Maslov *et al.*, 2013; Wheeler *et al.*, 2013). Kinetoplast je úsek mitochondrie, který obsahuje kinetoplastovou DNA (kDNA). Gen pro cytochrom b, který je zakódovaný v kDNA například slouží pro fylogenetické odlišení různých druhů trypanozóm (Schwarz *et al.*, 2015).

C. mellificae má převážně ovoidní tvar těla s jedním bičíkem v zadní části (Langridge a McGhee, 1967). Nejčastěji se vyskytuje ve formě choanomastigotu, což je morfotyp charakterizovaný buňkami ve tvaru ječmene se širokou bičíkovou kapsou a kinetoplastem přilehlým k jádru (Maslov *et al.*, 2013). Buňky choanomastigotů *C. mellificae* mají průměrnou velikost $6,62 \times 3,32 \mu\text{m}$ a obsahují několik úzkých, hlubokých postranních žlábků (obr. 7; Schwarz *et al.*, 2015). Při lehké infekci napadá *C. mellificae* rektální papily včel, v případě těžší infekce pak celé rektum a zadní část tenkého střeva. V rektu se vyskytuje jak volně, tak přichycená ke stěně (Langridge a McGhee, 1967).



Obr. 7 SEM snímek choanomastigotů *C. mellificae* (převzato a upraveno dle Schwarz *et al.*, 2015).

2.8 *Lotmaria passim*

Lotmaria passim je stejně jako *C. mellifica* eukaryotický parazit z řádu *Trypanosomatida*. Dříve byla považována za jeden z kmenů *C. mellifica*, v roce 2015 bylo ale toto zařazení přehodnoceno, jelikož původní řazení bylo založeno na morfologii, nikoliv na fylogenetice. Nově objevený rod trypanozóm byl poté pojmenován podle mikrobiologa Rutha Lotmara. Pro druhové jméno bylo vybráno latinské slovo *passim*, tedy „všude“, a to z důvodu, že je pravděpodobné, že *L. passim* je zodpovědná za velkou část patologií dosud přisuzovaných *C. mellifica*, a je tak nejčastějším a globálně nejrozšířenějším druhem trypanozóm u včel (Schwarz *et al.*, 2015).

Nejčastěji se *L. passim* vyskytuje ve formě promastigotů, což je morfologický typ buňky, pro který je charakteristický podlouhlý tvar, úzká bičíková kapsa a kinetoplast umístěný před jádrem (Maslov *et al.*, 2013). Buňky promastigotů *L. passim* mají průměrnou velikost $7,44 \times 3,15 \mu\text{m}$ a obsahují široký hluboký postranní žlábek (obr. 8), sféroidní morfotypy jsou pak velké 3 – 4 μm (Schwarz *et al.*, 2015).

Stejně jako *C. mellifica* napadá rektum a koncovou část tenkého střeva. Sféroidní bezbičíkaté morfotypy *L. passim* adherují ke stěně trávicího traktu a vytvářejí hustou, jednotnou vrstvu. Po jejich separaci od stěny zanechávají v epitelu eroze podobné malým dírákům (Gómez-Moracho *et al.*, 2020). Prostředí tenkého střeva včel je ale anaerobní a nutričně chudé. *L. passim* tak v odpovědi na tyto podmínky snižuje expresi genů zapojených do bazálního metabolismu, např. mRNA spojené s translací bílkovin, glykolýzou, antioxidačního stresu a dýchacím řetězcem kinetoplastu (Liu *et al.*, 2020).

Arismendi *et al.* (2020) pozorovali, že včely nakažené *L. passim* a zároveň *N. ceranae* vykazují zvýšenou úmrtnost, což ukazuje na synergický efekt mezi těmito patogeny. Nicméně úmrtnost včel nakažených pouze *L. passim* nebyla výrazně ovlivněna. Byla ale pozorována snížená exprese vitellogeninu a AmP, a to především při silné infekci. Podle Liu *et al.* (2020) akumulace parazita v zadní části střeva včely snižuje životnost včel, ale nevede k rychlé smrti včely, čímž si parazit zajišťuje dokončení svého životního cyklu a další šíření.

Zajímavým objevem byl nález DNA *L. passim* v roztoči *V. destructor*. Vzhledem k tomu, že trypanosomatidy se vyskytují v trávicím traktu a roztoč se živí tukovou tkání, není vysvětlení tohoto nálezu jasné. Možností je, že *L. passim* je schopna přechodu skrz bariéru trávicího traktu do tukového tělíska. Pro tento přechod ale zatím nejsou žádné

důkazy. Bylo ale pozorováno, že včelstva infikovaná *L. passim* vykazovala vysokou úroveň parazitizace roztočem. Je tedy možné, že *V. destructor* je přenašečem *L. passim* (Castelli *et al.*, 2019; Quintana *et al.*, 2021).



Obr. 8 SEM snímek promastigotů *L. passim* (převzato a upraveno dle Schwarz *et al.*, 2015).

2.8.1 Šíření trypanosomatid

Parazité z řádu *Trypanosomatida* nejsou u včely medonosné důkladně prostudováni a znalosti o jejich přenosu a mechanismu patogenity jsou omezené. Větší množství znalostí je ale u příbuzného druhu *Crithidia bombi*, což je parazit, napadající čmeláky rodu *Bombus* (Williams *et al.*, 2019).

C. bombi má u čmeláků velký vliv na celkové zdraví, a to především na přežití matek v období hibernace. Má také vliv na zakládání kolonií a reprodukční zdatnost. Po požití se *C. bombi* dostává do trávicího traktu, kde se přichytí ke střešní stěně. Následně se množí a v určitém stádiu vývoje jsou parazitické buňky vyměšovány ve výkalech, čímž dochází k šíření infekce. Výkaly se mohou dostat na květ či do půdy, tak mohou ulpět na těle jiného hmyzu, který může sloužit jako vektor pro přenos parazita na čmeláka. Takovým vektorem může být i *A. mellifera*, na které se infekce *C. bombi* neprojevuje (Ruiz-González a Brown, 2006; Schlüns *et al.*, 2010).

3 METODY DIAGNOSTIKY VČELÍCH PATOGENŮ

3.1 Kultivační metody

3.1.1 Mikrobiální kultivace *S. marcescens*

Bakterie rodu *Serratia* jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní organismy. Anaerobně redukují dusičnany a chlorečnany. Pro růst nejsou nezbytné sodné ionty, nicméně optimální koncentrace NaCl pro *S. marcescens* je ~ 0,5 % (w/v). Kultura *S. marcescens* obvykle produkuje rybí až močový odér, přisuzovaný trimethylaminu spolu s malým množstvím amoniaku. Pigment prodigiosin produkuje *S. marcescens* pouze v aerobním prostředí, přičemž přesná barva kolonií závisí na kultivačních podmínkách (např. teplota, pH, anorganické ionty, sacharidy, aminokyseliny). Odstín barvy kolonií se může pohybovat od oranžové, přes růžovou, sytě červenou, až po fuchsiovou. Nejlépe je prodigiosin produkován na pepton-glycerolovém agaru při 20-35 °C, přičemž úplné teplotní rozmezí pro jeho produkci je 12-36 °C. Na masopeptonovém agaru rostou nepigmentované druhy *Serratia* jako neprůhledné bílé kolonie nebo mukoidní či průhledné hladké kolonie. Tyto půdy nejsou vhodné pro izolaci *Serratia* spp. od enterobakterií (Brenner *et al.*, 2005; Grimont a Grimont, 2006).

Pro *Serratia* spp. je typická produkce extracelulární gelatinasy, lecithinasy (EC 3.1.1.4) a DNasy. Média, která dokazují přítomnost jednoho z enzymů mohou být použita pro odlišení rodu *Serratia*. Selektivní médium pro *Serratia* spp. je caprylate-thallos agar (CT agar), který je vhodný pro izolaci z polymikrobiálních klinických vzorků jako jsou například výkaly. Pro selekci *S. marcescens* se pak používá speciální DNasové médium (Grimont a Grimont, 2006).

Složení selektivního DNasového média pro izolaci *S. marcescens* je následovné: agar pro DNasový test s methylovou zelení (Difco) 42 g; L-arabiosa 10 g; fenolová červeň 0,05 g; methylová zeleň (1%) 4 ml; destilovaná voda do 1 l. Po autoklávování je k médiu přidán ampicilin (5 µg·ml⁻¹), kollistin (5 µg·ml⁻¹), cefalotin (10 µg·ml⁻¹) a amfotericin B (2,5 µg·ml⁻¹) (Grimont a Grimont, 2006).

Pro identifikaci *Serratia* spp. jsou velmi užitečné testy využití zdroje uhlíku, které jsou upřednostňovány před fermentačními testy, jelikož kmeny schopné využít polyalkohol

často produkují příliš malé množství kyseliny na to, aby reakce byla pozitivní (Grimont a Grimont, 2006).

3.1.2 Mikrobiální kultivace trypanosomatid

Trypanosomatidy obecně lze kultivovat v různých typech zkumavek a médií. Standardně jsou používány skleněné zkumavky s gumovým víčkem obsahující bifázové médium, skládající se z krevního agaru jako základu, převrstveného tekutým médiem. Tento typ média je používán především pro parazity vyžadující pro růst velmi specifické podmínky a výživu. Pro monoxenní, tedy jednohostitelské, parazity, jako jsou *C. mellificae* a *L. passim*, je pro kultivaci postačující monofázové médium méně bohaté na nutrienty. Pro kultivaci těchto trypanosomatid je tedy možné použít například Brain Heart Infusion médium (infuze mozkové a srdeční tkáně; BHI médium), kompletní Schneiderovo médium (Drosophila, Insect), médium M 199 a médium RPMI 1640. Do médií je podle potřeby přidávána také např. králičí/ovčí defibrinovaná plná krev, tepelně inaktivované fetální hovězí sérum, a také různá antibiotika (Lukeš a Votýpka, 2020). Trypanozómy lze kultivovat při pokojové teplotě, buněčný růst pak lze pozorovat počítáním parazitů v Neubauerově komůrce pod světelným mikroskopem (Gómez-Moracho *et al.*, 2020).

U prvoků z řádu *Trypanosomatida* jsou pro kultivaci *in vitro* velmi vhodná proliferativní stádia, nacházející se v trávicím ústrojí bezobratlého hmyzu. Nejčastějším takovým stádiem je stádium promastigotu, což je typická forma pro *L. passim* a zároveň se jedná o morfotyp, který roste nejlépe *in vitro*. *C. mellificae* je ale výjimkou a v trávicím traktu hmyzu se nejčastěji nachází ve formě choanomastigotu (Lopes *et al.*, 2010). *C. mellificae* je také na rozdíl od ostatních druhů parazitických prvoků acidofilním organismem a nejlépe roste při pH 5 až 6 (Langridge a McGhee, 1967).

3.1.3 Mikrobiální kultivace *Nosema* spp.

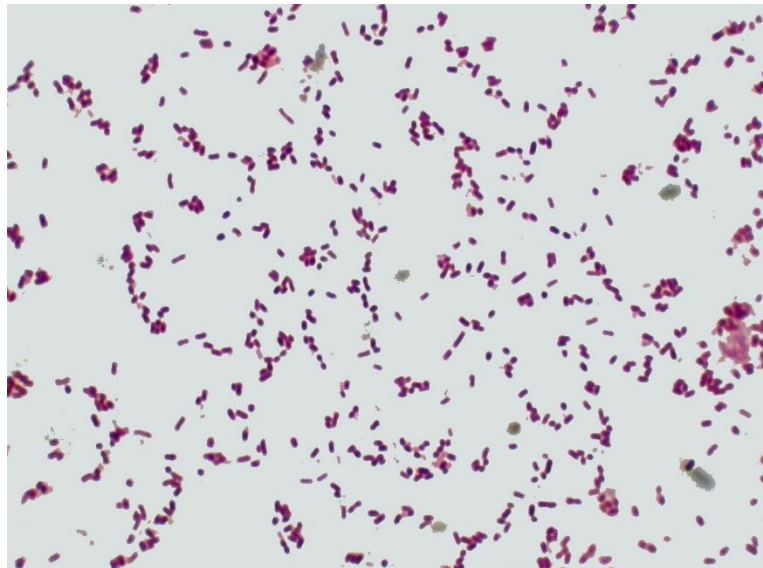
Mikrosporidie *N. apis* a *N. ceranae* jsou obligátně intracelulární patogeny, kteří nejsou schopni růstu a množení mimo hostitelskou buňku. Pro jejich kultivaci je tedy nutné použít vhodné buněčné kultury, přístupné k infekci těmito patogeny. Jako buněčné kultury mohou být použity epitelové buňky izolované přímo ze včelích kulek, nebo komerčně dostupné buněčné kultury získané z některých hmyzích druhů řádu

Lepidoptera, jako například buněčná suspenze IPL-LD-65Y (Bekyně velkohlavá, *Lymantria dispar*) (Gisder *et al.*, 2011; Fries *et al.*, 2013).

3.2 Mikroskopické techniky

3.2.1 Mikroskopie *S. marcescens*

Bakterie *S. marcescens* je gramnegativní tyčinkovitá bakterie. Po Gramově barvení se tedy pod světelným mikroskopem bakterie jeví jako růžové tyčky (obr. 9; Madigan *et al.*, 2012).



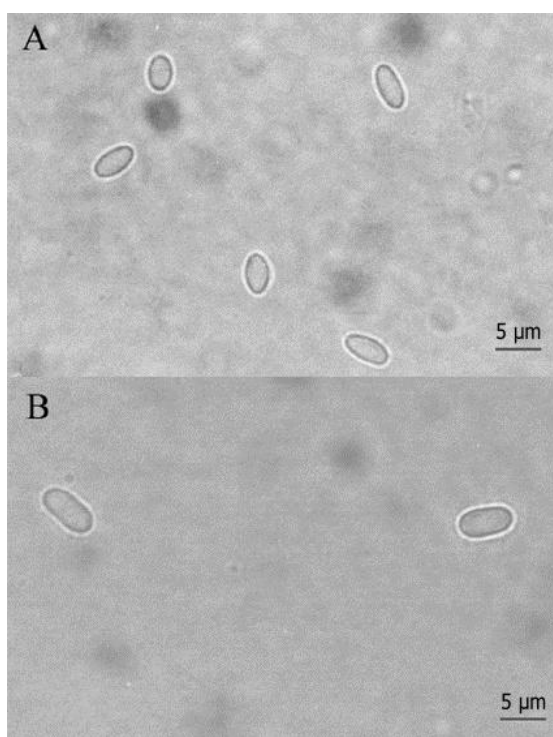
Obr. 9 Bakterie *S. marcescens* barvené dle Grama, zvětšení 1500× (použito se svolením autora: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.).

3.2.2 Mikroskopie *Nosema* spp.

U světelné mikroskopie je pro pozorování spor *Nosema* spp. dostačující zvětšení 200-400×. Dají se pozorovat nebarvené v kapce vody (obr. 10). Je také vhodné použít světelný mikroskop s fázovým kontrastem pro odlišení mikrosporidií od kvasinek a jiných částic. Pro počítání spor se běžně používá hemocytometr a je vhodné pro ně použít pouze žaludek, jelikož se v něm nachází nejvyšší počet spor (Fries *et al.*, 2013).

Spory *N. apis* a *N. ceranae* jsou od sebe rozeznatelné na základě odlišné velikosti a tvaru. Spory *N. ceranae* jsou menší než spory *N. apis* a jsou často lehce ohnuté a nemají zcela uniformní tvar. Pozorování těchto rozdílů je ale často obtížné (Fries *et al.*, 2013).

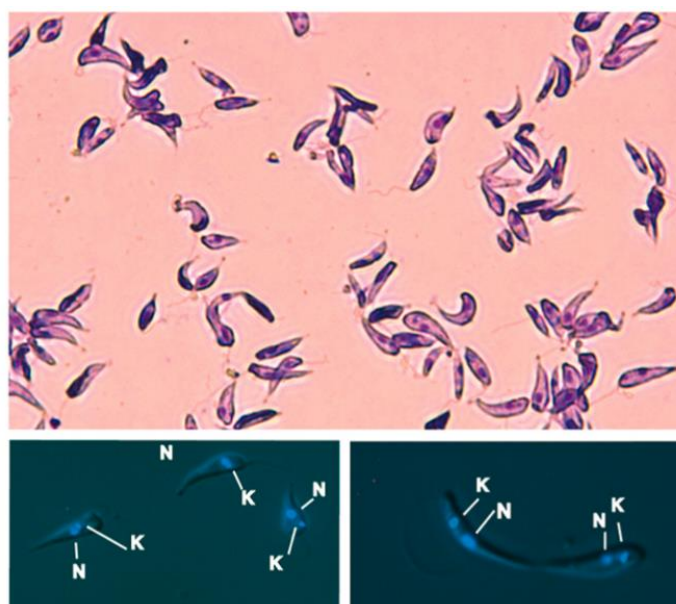
Preparáty těchto mikrosporidií jsou pro světelnou mikroskopii standardně fixovány methanolem a barveny Giemsovým barvivem. Pro elektronovou mikroskopii lze po zalití tkáně epoxydovou pryskyřicí a nařezání na tenké sekce barvit preparáty toluidinovou modří (Fries *et al.*, 2013).



Obr. 10 Spory *N. ceranae* (A) a *N. apis* (B) pod světelným mikroskopem (převzato a upraveno dle Fries *et al.*, 2006).

3.2.3 Mikroskopie *C. mellificae* a *L. passim*

Pro detekci *C. mellificae* a *L. passim* pomocí světelné mikroskopie je pozorován žaludek, tenké střevo a rektum zkoumané včely. Pod světelným mikroskopem by u infikovaných včel měly být vidět buňky parazita přichycené na stěnu rekta. Pro přípravu barveného preparátu je infikované rektum otřeno na podložní sklíčko, popřípadě jsou použity vykultivované trypanosomatidy v tekutých médiích. Při tomto postupu je nejprve preparát fixován methanolem a následně barven Giemsovým barvivem. Pro pozorování kinetoplastu a jádra v živých buňkách lze buňky obarvit fluorescenčním barvivem Hoechst 33442 (obr. 11; Langridge a McGhee, 1967; Buendía-Abad *et al.*, 2021).



Obr. 11 Promastigoti *L. passim* pod mikroskopem a) fixovaný preparát barvený Giemsovým barvivem b) nefixovaný preparát barvený barvivem Hoechst 33442: N – jádro, K – kinetoplast (převzato z Buendía-Abad *et al.*, 2021).

3.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analyzátozem doby letu (anglicky Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), zkráceně MALDI-TOF MS, je metoda pro rychlou a přesnou identifikaci a charakterizaci mikroorganismů. Výsledkem analýzy jsou charakteristická hmotnostní spektra, specifická pro každý mikroorganismus a jsou proto vhodná jak k rodové, tak druhové identifikaci a také pro rozlišení různých kmenů. Výhodou metody je vysoká citlivost a rychlost měření (Croxatto *et al.* 2012).

Použití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci mikroorganismů bylo poprvé navrženo v roce 1975, kdy si Anhalt a Fenselau všimli, že bakteriální extrakty různých druhů produkují specifická hmotnostní spektra. Ionizační techniky se dělí podle přenesené energie na „tvrdé“ a „měkké“. MALDI patří mezi „měkké“ ionizační techniky, tedy produkuje ionty s nízkou vnitřní energií. Tyto techniky byly vyvinuty v druhé polovině 80. let, do té doby byly „tvrdé“ techniky schopny analyzovat pouze bakteriální lipidy, jelikož měly příliš velkou energii na to, aby nedošlo k rozpadu biomolekul s vyšší hmotností. Nástup „měkkých“ ionizačních technik tedy umožnil analýzu biomolekul jako jsou polypeptidy či celé proteiny (Anhalt a Fenselau, 1975; Florio *et al.*, 2018; Perutka a Šebela, 2018).

V roce 1996 pak bylo zjištěno, že pomocí MALDI-TOF MS mohou být spektrální čáry získány z celých bakteriálních buněk a není potřeba předešlé buněčné extrakce a purifikace. MALDI-TOF MS není použitelná pouze k identifikaci bakterií, ale také hub, plísní a kvasinek (Croxatto *et al.*, 2012). Zároveň identifikaci pomocí MALDI-TOF MS neovlivňují různé kultivační podmínky, které ovlivňují mikrobiální fyziologii a buněčnou expresi (Singhal *et al.*, 2015).

3.3.1 Princip MALDI-TOF MS

Pro MALDI-TOF MS je používán hmotnostní spektrometr, který se skládá ze čtyř částí. První částí je iontový zdroj, který ionizuje a přenáší ionty molekul vzorku do plynné fáze. Další částí je hmotnostní analyzátor, který separuje ionty na základě jejich poměru hmotnosti a náboje. Třetí částí je poté detektor, zachycující dopadající ionty a poslední částí je systém na záznam a zpracování dat (Croxatto *et al.*, 2012; Perutka a Šebela, 2018).

Při MALDI-TOF analýze jsou vzorky připraveny smícháním analytu s matricí, díky čemuž dojde ke krystalizaci vzorku v rámci matrice. Smíchání se provádí na vodivé kovové desce, a to buď tak, že je vzorek s matricí smíchán přímo, nebo je mikrobiální kultura nejprve ponechána zaschnout na desce a až poté se přidává matrice. Matricí jsou nejčastěji aromatické kyseliny, které mají silnou optickou absorpci v rozsahu vlnových délek používaného laseru. Různé matrice odlišně krystalizují a ionizují látky a jejich složení se liší v závislosti na analyzované biomolekule a typu používaného laseru. Nejpoužívanějšími matricemi jsou kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová, DHB), α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA) a 4-hydroxy-3-methoxyskořicová (ferulová, FA). DHB je nejvhodnější pro detekci glykopeptidů a glykoproteinů. FA, SA a CHCA jsou vhodné pro detekci proteinových biomarkerů. Obecně pro detekci iontů s nižší hmotností jsou vhodné DHB a CHCA s detekčním limitem do 10 kDa a pro ionty s vyšší hmotností jsou vhodné SA a FA, které detekují ionty nad 15 kDa (Croxatto *et al.*, 2012; Huong *et al.*, 2014).

Důvodem, proč je možné u MALDI-TOF MS použít celé mikroorganismy je to, že většina vegetativních bakteriálních buněk lyzuje po vystavení vodě, organickým rozpouštědlům a silným kyselinám v matrici (např. kyselina trifluoroctová). U některých druhů mikroorganismů je ale často nutné pro lýzu buněk přidat ke vzorku silné organické kyseliny (např. kyselinu mravenčí) či alkoholy již v rámci předpřípravy (Croxatto *et al.*, 2012; Singhal *et al.*, 2015).

Po krystalizaci je vzorek v hmotnostním spektrometru ostřelován krátkými pulzy laseru. Matrice absorbuje energii laseru (většinou dusíkový UV laser s vlnovou délkou 337 nm), což vede k desorpci a ionizaci analytů a jejich převedení do plynné fáze (El-Aneed *et al.*, 2009). Excitované molekuly matrice ionizují vzorek tak, že přenesou svůj proton na molekulu analytu a vznikne pseudomolekulový ion. Ionizované molekuly jsou následně nejprve urychleny elektrickým polem a poté vstupují do vakua v kovové průletové trubici, kde se pohybují rychlostí závislou na jejich hmotnosti a náboji, s tím, že menší ionty jsou rychlejší než ionty větší. Nakonec ionty dosáhnou detektoru. Doba letu, která je nutná, aby ion dosáhl detektoru, je úměrná poměru m/z . Během analýzy jsou tedy bioanalyty ve vzorku s rozdílným m/z rozděleny podle doby letu a vytváří hmotnostní spektrum, které je charakterizováno poměrem m/z a také intenzitou iontů, která značí, kolik iontů o daném m/z dosáhlo detektoru. Jelikož u MALDI jsou ionty

obvykle jednomocné, tak m/z analytu přímo koresponduje s hodnotou hmotnosti (Croxatto *et al.*, 2012; Florio *et al.*, 2018).

Identifikace mikroorganismů se poté provádí buď porovnáním výsledných spekter se spektry v databázi, nebo srovnáním hmotností biomarkerů neznámého organismu s databází proteomu. V případě porovnání spekter je pro mikrobiální identifikaci používán hmotnostní rozsah 2 až 20 kDa, což odpovídá dominantním ribosomálním proteinům. Tento přístup je výhodný pro použití v diagnostických laboratořích, jelikož je jednoduchý a je dostupné velké množství komerčních databází k porovnání (Singhal *et al.*, 2015; Florio *et al.*, 2018).

3.3.2 MALDI Biotyper®

MALDI Biotyper® je systém pro identifikaci mikroorganismů, vyvinutý společností Bruker Daltonics. Funguje tak, že cílí na ribosomální proteiny a biomarkery pro identifikaci bakterií, hub a kvasinek, a to na úrovni rodu, druhu i kmenu. Získaná hmotnostní spektra jsou v programu Biotyper porovnávána s databází, přičemž systém vyhodnotí shodu či neshodu. Shody jsou označeny barevně a to tak, že žádná shoda je červená, částečná shoda je žlutá a plná shoda je zelená (Huong *et al.*, 2014; Houdelet *et al.*, 2020).

3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce, nebo také zkráceně PCR (z anglického Polymerase Chain Reaction), je metoda, při které dochází k rychlému zmnožení určitého úseku DNA. Pro namnožení stačí pouze velmi malé množství původní DNA, a to i DNA z komplexního vzorku jako například vzorku izolovaného z půdy či vody, který může obsahovat miliony odlišných DNA fragmentů různých mikroorganismů. Výhodou PCR je její snadnost, rychlost, přesnost, citlivost a také reprodukovatelnost (Clark *et al.*, 2019).

PCR byla vynalezena Karym Mullisem, který za tento objev spolu s Michaelem Smithem dostal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Objev PCR byl pro biologii revoluční, jelikož dříve byl pro amplifikaci DNA používán zdlouhavý proces, při kterém bylo nutné část DNA nejprve zavést do plasmidu nebo jiného vektoru. Následně byla provedena transformace této kombinované DNA do bakteriální buňky, která při množení zároveň namnožila námi požadovaný úsek DNA. PCR je oproti tomu jednodušší proces,

u kterého není zapotřebí bakteriálních buněk, ale DNA polymerasy (EC 2.7.7.7), tedy enzymu katalyzujícího syntézu nového řetězce DNA. PCR je založena na cyklických reakcích, během kterých je templátová DNA opakovaně denaturována a enzymově replikována. Každá nově vytvořená kopie slouží jako templát pro vytvoření dalších, čímž dochází k řetězové reakci (Tüzmen *et al.*, 2018; Clark *et al.*, 2019).

3.4.1 Složení PCR směsi

Pro proběhnutí PCR je nutná přítomnost několika komponent. Jako první je potřeba templátová DNA, u které je dostačující i její stopové množství v komplexním vzorku, který obsahuje celkovou DNA, obsahující i DNA různých organismů vyskytujících se ve vzorku. Dále je zapotřebí PCR pufr o vhodném pH a koncentraci iontů. Velmi důležité pro průběh reakce jsou Mg^{2+} ionty, které jsou nezbytné pro aktivitu DNA polymerasy, jelikož tvoří s jednotlivými dNTP rozpustný komplex, který je DNA polymerasou rozpoznáván. Pokud je koncentrace Mg^{2+} iontů příliš nízká dochází ke sníženému výťažku reakce, naopak při vysoké koncentraci se mohou tvořit nespecifické produkty kvůli snížené přesnosti DNA polymerasy (Tüzmen *et al.*, 2018).

Nutnou součástí PCR směsi jsou také PCR primery, které slouží k iniciaci syntézy DNA. PCR primery jsou krátké jednovláknové části DNA, komplementární k sekvenci na každém konci cílového segmentu DNA. DNA polymerasa je nutná pro tvorbu kopií a přidává nukleotidy k primerům. Jelikož jsou pro PCR nutné vysoké teploty, je nutné použít termostabilní DNA polymerasu. Termostabilní polymerasy jsou izolovány z bakterií žijících v teplotách vyšších jak 90 °C. Nejčastěji je používána Taq polymerasa, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Nakonec jsou do PCR směsi přidávány nukleotidy ve formě deoxynukleosidtrifosfátů (dATP, dCTP, dTTP a dGTP) (Tüzmen *et al.*, 2018; Clark *et al.*, 2019).

3.4.2 Průběh reakce

Prvním krokem PCR je smíchání reakčních komponent popsaných výše. Následně je reakční směs vložena do termocykléru, který je schopen měnit teplotu PCR velmi rychle a přesně. Každý cyklus PCR sestává ze tří fází, a to z denaturace, nasednutí primerů a syntézy DNA, přičemž každá z fází probíhá při odlišné teplotě. Na konci každého cyklu je množství cílové DNA dvojnásobné (Green a Sambrook, 2019).

První fází PCR je tedy denaturace, při které dochází k separaci dvouvláknové DNA na jednoduchá vlákna v důsledku rozvolnění vodíkových vazeb, které drží vlákna pohromadě (Clark *et al.*, 2019). Dvouvláknová templátová DNA denaturuje při teplotě, která je částečně závislá na obsahu guaninu a cytosinu (G+C). Čím vyšší je podíl G+C, tím vyšší je teplota nutná pro oddělení vláken od sebe. Rychlost denaturace pak závisí na délce DNA, přičemž čím delší je molekula DNA, tím delší je doba potřebná pro denuraci. Pokud je teplota příliš nízká nebo čas je příliš krátký, dojde k denuraci pouze částí DNA bohatých na adenin a thymin (Green a Sambrook, 2019).

Při PCR reakcích katalyzovaných Taq DNA polymerasou probíhá denaturace při 94-95 °C. Při prvním cyklu může denaturace probíhat 5 minut pro zvýšení pravděpodobnosti kompletní denaturace dlouhých molekul DNA, nicméně pro běžnou amplifikaci lineární templátové DNA, jejíž obsah G+C je 55 % a nižší, postačuje doba 45 sekund při 94-95 °C. Pro denuraci DNA s vyšším obsahem G+C jsou často nutné vyšší teploty a pro tyto účely jsou používány DNA polymerasy izolované z Archeí, které jsou více tolerantní vůči vysokým teplotám než Taq (Green a Sambrook, 2019).

Další fází cyklu je nasednutí primerů (hybridizace) na templátovou DNA. Pro tento krok je teplota v termocykléru snížena na přibližně 60 °C, respektive by teplota měla být o 3-5 °C nižší, než je vypočtená teplota, při které se primery odlučují od templátu. Pro správné nasednutí je teplota kritická. Pokud by byla příliš vysoká, primery by dokonale nenedly na templát a výtěžek amplifikované DNA by byl velmi malý. Pokud by naopak byla teplota příliš nízká, mohlo by dojít k nespecifickému navázání primerů a tedy k namnožení nechtěných částí DNA. Daná teplota se v tomto kroku udržuje po dobu 15 až 60 sekund (Clark *et al.*, 2019; Green a Sambrook, 2019).

Fáze syntézy DNA se také označuje jako fáze extenze či elongace. Během tohoto kroku dochází k navázání DNA polymerasy na primery, ke kterým začne postupně přidávat nukleotidy komplementární k původnímu vláknu DNA (Tüzmen *et al.*, 2018). Syntéza DNA probíhá od 5' konce ke 3' konci a je pro ni nastavena teplota okolo 72 °C, což je optimální teplota pro Taq DNA polymerasu. Doba trvání tohoto kroku závisí na délce cílové sekvence. Udává se, že pro každých 1000 párů bazí je postačující 1 minuta (Clark *et al.*, 2019).

Často je nutné PCR optimalizovat přidáním různých sloučenin. Za účelem zvýšení efektivity a amplifikace G+C bohatých templátů se přidávají k PCR různá aditiva a

rozpouštědla. Rozpouštědly mohou být například formamid, dimethylsulfoxid a glycerol. Aditiva mohou být tetramethylammonium chlorid, betain, glutamát draselný, síran amonný nebo neiontové a kationtové detergenty (Green a Sambrook, 2019).

Nejčastěji se pro analýzu produktů PCR používá elektroforéza na agarosovém gelu, při které dochází k separaci DNA podle velikosti a náboje. Pro vizualizaci PCR produktů se běžně používají dva druhy postupů. Prvním je obarvení amplikonů chemickým barvivem (např. ethidium bromid), které se interkaluje mezi jednotlivé báze DNA. Druhou možností je značení primerů či nukleotidů fluorofory před samotnou amplifikací (Garibyan a Avashia, 2013).

3.4.3 Modifikace PCR

Existuje mnoho modifikací PCR pro různé účely, v následujících podkapitolách jsou uvedeny tři příklady nejčastějších modifikací.

3.4.3.1 PCR v reálném čase

Hlavním rozdílem mezi tradiční PCR a PCR v reálném čase (real-time PCR) je ten, že u real-time PCR není potřeba detekce amplikonů pomocí elektroforézy, ale detekce probíhá současně s amplifikací. Jedná se o velmi citlivou metodu, která poskytuje přesnější a rychlejší výsledky než tradiční PCR (Valones *et al.*, 2009).

Pro real-time PCR je nutné použití termocykléru se zabudovaným optickým systémem pro zachycení fluorescence, a také je potřeba počítačový software, schopný zachytit data a provést finální analýzu reakce. Fluorescence, emitovaná během reakce vytváří signál, který je během každého cyklu zaznamenán a je přímo úměrný množství amplifikovaných produktů (Valones *et al.*, 2009).

Fluorescenční signál může být vytvořen dvěma způsoby. První možností je přidání fluorescenčního barviva jako je například SYBR Green I, emitující fluorescenci při 520 nm. Barvivo se interkaluje do dvouvláknové DNA a neemituje záření, pokud je pouze v roztoku a není navázáno. Během reakce se zvyšuje množství dvouvláknové DNA, což umožní navázání fluoroforu. Čím více amplikonů je tedy vytvořeno, tím více záření je emitováno. Druhou možností měření množství produktů je přidání oligonukleotidových sond, například TaqMan sondy. Sonda je krátká jednovláknová DNA, komplementární k cílové DNA, která má na svém 5' konci přichycený fluorofor a na 3' konci má

tzv. zhášec. Pokud je fluorofor a zhášec v těsné blízkosti, tak zhášec pohlcuje fluorescenci emitovanou fluoroforem. Pokud je zhášec daleko, nedochází k pohlcení a termocyklér může zaznamenat intenzitu fluorescence. Během PCR se sonda musí navázat na komplementární DNA a následně Taq polymerasa odštípne 5' konec sondy, čímž dojde k separaci fluoroforu od zhášeče a dojde k fluorescenci. Výhodou využití sond oproti SYBR Green I je, že sondy jsou sekvenčně specifické a nedochází tedy k detekci nespecifických PCR produktů (Valones *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2019).

3.4.3.2 PCR s reverzní transkripcí

PCR s reverzní transkripcí, zkráceně RT-PCR z anglického Reverse-Transcription PCR, je varianta PCR umožňující detekci a kvantifikaci RNA pomocí reverzní transkripce do struktury DNA. Konverze RNA na DNA je umožněna díky enzymu reverzní transkriptase (EC 2.7.7.49), který vytváří komplementární vlákno DNA (cDNA) podle sekvence RNA. Vzniklá cDNA poté slouží jako templát pro amplifikaci (Green a Sambrook, 2018).

3.4.3.3 Multiplexní PCR

Multiplexní PCR (MPCR) je varianta PCR, která umožňuje rychlou detekci několika mikroorganismů během jediné reakce a je pro ni nutné použití několika specifických sad primerů. MPCR může být také spojena s real-time PCR, čímž se dosáhne nejen rychlé detekce mnoha různých mikrobů, ale také jejich kvantifikace (Settanni a Corsetti, 2007).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této práce je zpracována v podobě návrhu postupu pro detekci patogenů v terénních vzorcích včel.

4.1 Zpracování vzorků

Pro detekci patogenů se udává, že pro přípravu vzorků je vhodné použít minimálně 11 včel z každého včelstva (Pirk *et al.*, 2013). Zmražené vzorky včel jsou pro izolaci DNA nejprve homogenizovány. Homogenizace může být provedena pomocí různých typů homogenizátorů, popřípadě pomocí třecí misky s tloučkem (Evans *et al.*, 2013).

Podle Fries *et al.* (2013) a Dostálková *et al.* (2021) by se dala homogenizace a extrakce DNA provést takto:

1. Včely zmrazit tekutým dusíkem.
2. Včely vložit do homogenizačního sáčku, přidat 0,2 ml GITC pufru na včelu a rozdrtit tloučkem.
3. 300 μ l homogenátu napipetovat do mikrocentrifugační zkumavky a centrifugovat 3 min na $16\ 100 \times g$, supernatant odlít.
4. Izolovat DNA z homogenátu pomocí DNeasy® Plant Mini kitu (Qiagen).

Příprava 200 ml GITC pufru pro extrakci:

1. $5,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ guanidin isothiokyanát, Mr 118,12, navážka 124,16 g.
2. $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-Cl (pH 6,4), Mr 121,14 – připravit $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris, tj. 4,84 g na 400 ml, upravit pH pomocí koncentrované HCl na pH 6,4; do GITC pufru ředit 2 \times .
3. $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA, Mr 292,24, navážka 1,169 g.
4. 2,6 ml 1,3% Triton X-100.
5. 2 ml 1% β -merkaptoethanol přidat po autoklávování.

Nebo podle Evans *et al.* (2013) za použití CTAB pufru ($100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,0; $1,4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA; 2% (w/v) hexadecyl-trimethyl-ammonium bromid) by se dala homogenizace a extrakce DNA provést následovně:

1. Vzorky dát do mikrocentrifugační zkumavky, přidat 500 μl CTAB pufru a 2 μl 2-merkaptoethanolu (0,2%) na včelu.
2. Homogenizovat v kulovém mlýnku.
3. Přidat směs 50 μg proteinasy K a 25 μl RNasy.
4. Zvortexovat.
5. Inkubovat při 55-65 $^{\circ}\text{C}$ několik hodin až přes noc, občas překlápět.
6. Centrifugovat 1 min při maximální rychlosti (14 000 rpm).
7. Supernatant použít k izolaci DNA pomocí DNeasy® Plant Mini kitu (Qiagen).

4.2 Izolace DNA

Izolace DNA pomocí DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) funguje na principu adsorpce nukleové kyseliny na silikátovou membránu v přítomnosti chaotropních solí. V kitu jsou 2 typy kolonek, a to QIAshredder a DNeasy Mini Spin. QIAshredder kolonka je určena pro filtraci vzorku, dochází v ní k odstranění precipitátů solí a buněčných zbytků, díky čemuž získáme čistý lyzát, který je nezbytný pro zabránění ucpání membrány v DNeasy Mini Spin kolonkách, které váží DNA. Přečištěná DNA je z kolonky eluována pufrům AE nebo vodou, a to ideálně dvakrát.

Maximální množství počátečního materiálu pro kit je 100 mg hmotnosti nevysušeného biologického materiálu a 20 mg suché váhy. Vazebná kapacita kolonek je 50 μg . Maximální objem kolonek je 700 μl , eluční objem je 50–400 μl . Výtěžek je 3–30 μg .

Obsah kitu je následovný: kolonky DNeasy Mini Spin a QIAshredder Mini Spin; sběrné zkumavky; pufrů AP1, P3, AW1, AW2, AE (10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-Cl; 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; pH 9,0); RNasa A (100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Postup izolace DNA podle výrobce:

1. Přidat 400 μl pufru AP1 a 4 μl roztoku RNasy A k maximálně 100 mg (nevysušený biologický materiál) nebo 20 mg (vysušený biologický materiál) homogenátu a zvortexovat.
2. Inkubovat 10 min při 65 $^{\circ}\text{C}$, během inkubace 2–3 \times promíchat přetočením zkumavky \rightarrow lýze.

3. Přidat k lyzátu 130 μ l pufru P3, promíchat a inkubovat 5 min na ledu.
4. Centrifugovat lyzát 5 min při $20\,000 \times g$ (14 000 rpm).
5. Napipetovat lyzát do QIAshredder kolonky vložené do 2ml sběrné zkumavky, zcentrifugovat 2 min při $20\,000 \times g$ (14 000 rpm).
6. Přečištěný lyzát přemístit do čisté zkumavky.
7. Přidat pufr AW1 (1,5 \times objem lyzátu) a okamžitě promíchat pipetováním.
8. Napipetovat 650 μ l této směsi včetně případného precipitátu do DNeasy Mini Spin kolonky vložené do 2ml sběrné zkumavky. Centrifugovat 1 min při $6000 \times g$ a odstranit průtokovou frakci.
9. Zopakovat krok 8 se stejnou kolonkou, vyhodit průtokovou frakci a sběrnou zkumavku.
10. Vložit DNeasy Mini Spin kolonku do nové sběrné zkumavky, přidat 500 μ l pufru AW2 a centrifugovat 1 min při $6000 \times g$, odstranit průtokovou frakci.
11. Přidat 500 μ l pufru AW2 do kolonky, centrifugovat 2 min při $20\,000 \times g$ pro vysušení membrány. Odstranit průtokovou frakci a sběrnou zkumavku, vyjmout kolonku ze zkumavky (opatrně, aby se nedotkla frakce s ethanolem).
12. Kolonku vložit do 1,5 nebo 2ml mikrocentrifugační zkumavky a napipetovat 100 μ l pufru AE přímo na membránu, inkubovat 5 min při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 min při $6000 \times g$ pro eluci.
13. Zopakovat krok 12.

4.3 PCR

Pro PCR by byl použit kit FastStart Taq DNA Polymerase (Roche, Basel, Switzerland). Primery, používané pro detekci vybraných patogenů a pro referenční gen jsou uvedeny v tabulce 1. Teploty a časy pro jednotlivé kroky PCR doporučené výrobcem jsou uvedeny v tabulce 2.

Obsah kitu je následovný: PCR pufr bez MgCl_2 (10 \times koncentrovaný); PCR pufr s $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ MgCl}_2$ (10 \times koncentrovaný); $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ MgCl}_2$; GC-bohatý roztok (5 \times koncentrovaný); směs dNTP; 5 U/ μ l FastStart Taq DNA Polymerasa.

Tab. 1 Sekvence oligonukleotidů používaných pro identifikaci vybraných patogenů.

Protein/ patogen	Zdroj	Název primeru	Primer 5' → 3'		Velikost amplikonu (bp)
			Forward	Reverse	
Actin- related protein	(Lourenço <i>et al.</i> , 2008)	<i>Arp1</i>	TGCCAACAC TGTCCTTTCT G	AGAATTGAC CCACCAATC CA	155 (156 v referenci)
<i>S. marcescens</i>	(Bussalleu a Althouse, 2018)		GGTGAGCTT AATACGTTT ATCAA	AATTCCGATT AACGCTTGC AC	107
<i>N. apis</i>	(Martín- Hernández <i>et al.</i> , 2007)	321APIS	GGGGGCATG TCTTTGACGT ACTATGTA	GGGGGGCGT TTAAAATGT GAAACAAC T	321
<i>N. ceranae</i>	(Martín- Hernández <i>et al.</i> , 2007)	218MITOC	CGGCGACGA TGATGATG AAAATATTA A	CCCGGTCATT CTCAAACAA AAAACCG	218–219
<i>L. passim</i>	(Schwarz <i>et al.</i> , 2015)	Tryp-cytb	TGTGGWGTK TGTTTAGC	RTCWGAAC CATAAAATA ATG	490
<i>C. melliferae</i>	(Stevanovic <i>et al.</i> , 2016)	CmCytb	AGTTTGAGCT GTTGGATTTG TT	AACCTATTAC AGGCACAGT TGC	140
<i>L. passim</i>	(Stevanovic <i>et al.</i> , 2016)	LpCytb	CGAAGTGCA CATATATGCT TTAC	GCCAAACAC CAATAACTG GTACT	247

Tab. 2 Parametry pro průběh PCR podle protokolu výrobce FastStart Taq DNA polymerase (Roche).

	Počet cyklů	Čas	Teplota
První denaturace	1	2–6 min	95 °C
Denaturace		30 s	95 °C
Hybridizace	30–40	30 s	45–65 °C
Elongace		45 s – 3 min	72 °C
Finální elongace	1	7 min	72 °C
Ochlazení		bez limitu	4 °C

Podle Evans *et al.* (2013) je pro FastStart Taq DNA polymerase (Roche) vhodný následující cyklus: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 5 min; následně 40 cyklů, skládajících se z denaturace 15 s při 94 °C, 15 s při teplotě optimální pro daný primer a 60 s elongace při 72 °C; nakonec 5 min při 72 °C.

Pro referenční gen *Arp1* provedli Lourenço *et al.* (2008) PCR takto: 2 min při 94 °C, 25 cyklů 30 s při 94 °C, 30 s při 60 °C, 30 s při 72 °C a 7 min při 72 °C. Podle Stevanovic *et al.* (2016) by byly parametry pro PCR *L. passim* LpCytb následovné: denaturace 2 min při 95 °C následovaná 40 cykly 30 s při 95 °C, 30 s při 55 °C pro nasednutí primerů, 20 s při 72 °C pro elongaci a nakonec 2 min při 72 °C. Schwarz *et al.* (2015) pro *L. passim* Tryp-cytb použili teplotu pro nasednutí primerů 50 °C a pro *C. mellificae* 59 °C. Teplota pro nasednutí primerů pro *N. ceranae* a *N. apis* podle Martín-Hernández *et al.* (2007) je 61,8 °C. Pro *S. marcescens* podle Bussalleu a Althouse (2018) jsou optimální podmínky PCR 1 min při 95 °C, 40 cyklů 15 s při 95 °C, 15 s 59,5 °C, 10 s při 72 °C a 7 min při 72 °C.

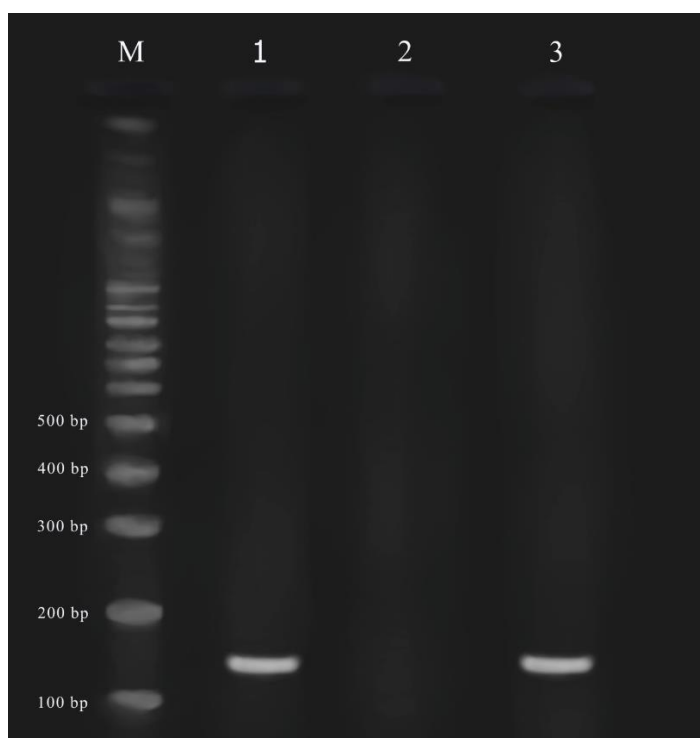
Podle výrobce FastStart Taq DNA Polymerase (Roche) by byla PCR reakce pro 100 až 250 ng templátové DNA provedena v objemu 50 µl s následujícími komponenty:

1. PCR voda.
2. 5 µl 10× koncentrovaného PCR pufru s MgCl₂, finální koncentrace 2 mmol·l⁻¹ MgCl₂. Popřípadě použit 5 µl 10× koncentrovaného PCR pufru bez MgCl₂ a přidat 25 mmol·l⁻¹ roztok MgCl₂ v potřebném objemu ve finální koncentraci 1,5 až 4 mmol·l⁻¹.
3. 1 µl dNTP směsi, finální koncentrace 200 µmol·l⁻¹ pro každý dNTP.

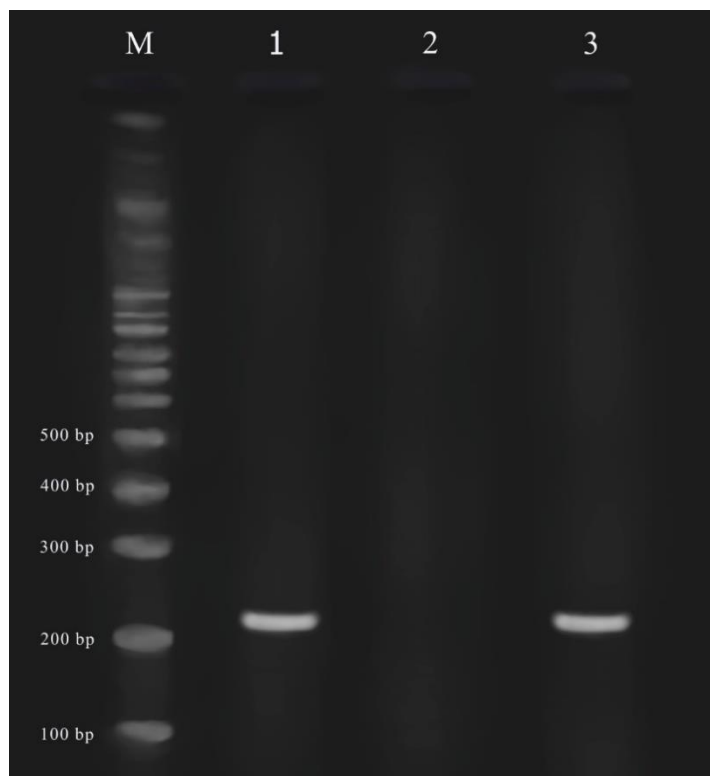
4. 5 μl forward a reverse primeru, finální koncentrace 0,2 až 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.
5. 0,4 μl FastStart Taq DNA polymerasy ve finální koncentraci 2 U.

4.4 Elektroforéza v agarosovém gelu

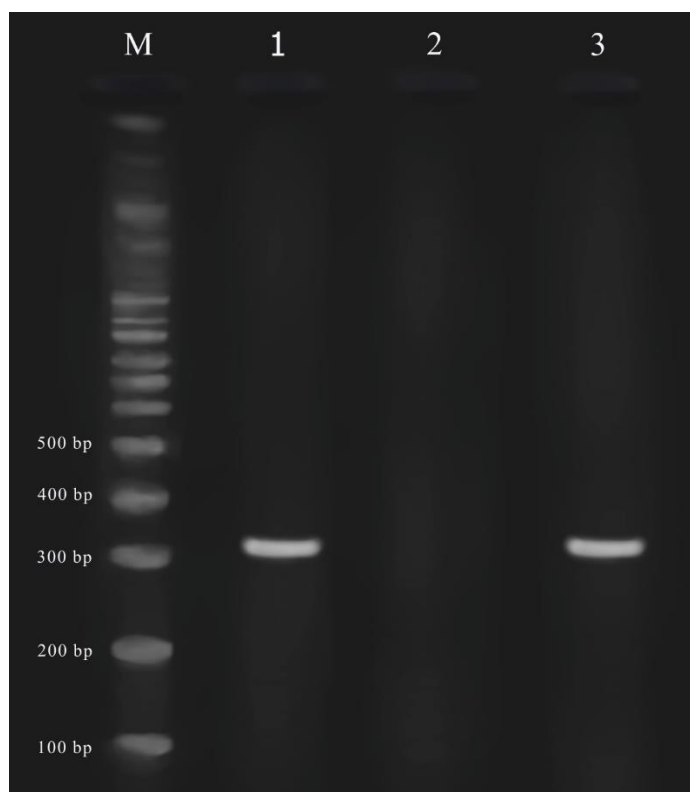
Produkty PCR by byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy v 2% (w/v) agarosovém gelu s barvivem GelRed, v TAE pufru. Jako negativní kontrola by byla použita PCR voda v objemu přidávané DNA se všemi PCR komponenty. Pro pozitivní kontrolu by byla použita DNA izolovaná z referenčních mikroorganismů. Ilustrativní elektroferogramy pro každý detekovaný patogen jsou vyobrazeny na obrázcích 12–17.



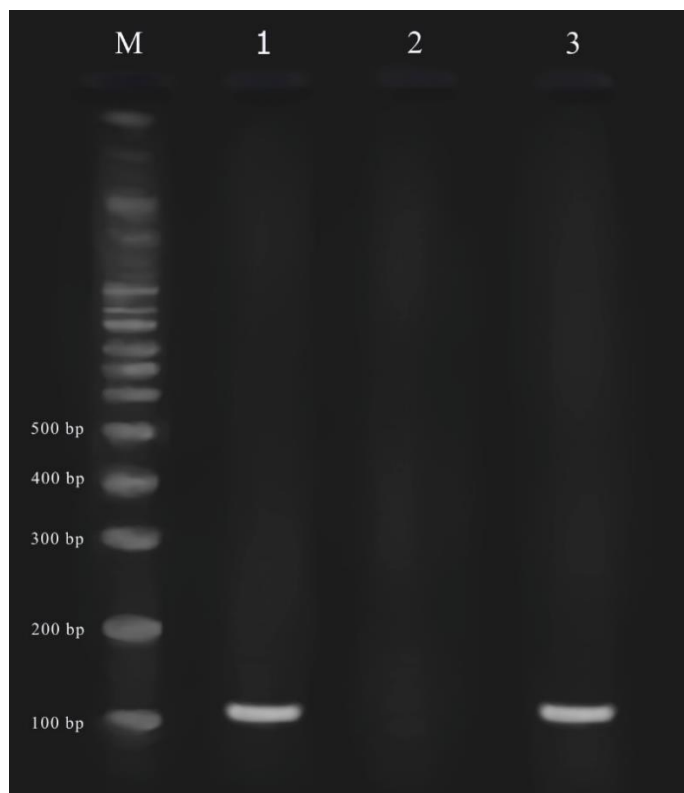
Obr. 12 Ilustrativní elektroferogram pro *C. mellificae* CmCytb. M: marker, 1: pozitivní kontrola *C. mellificae*, 2: negativní kontrola, 3: 140 bp amplicon izolátu (vytvořeno v programu Krita).



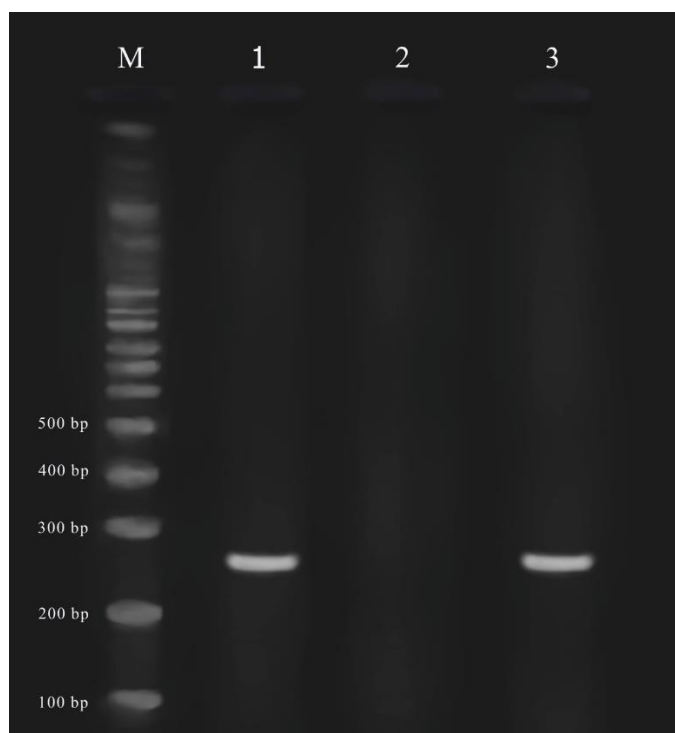
Obr. 13 Ilustrativní elektroferogram pro *N. ceranae* 218MITOC. M: marker, 1: pozitivní kontrola *N. ceranae*, 2: negativní kontrola, 3: 218–219 bp amplicon izolátu (vytvořeno v programu Krita).



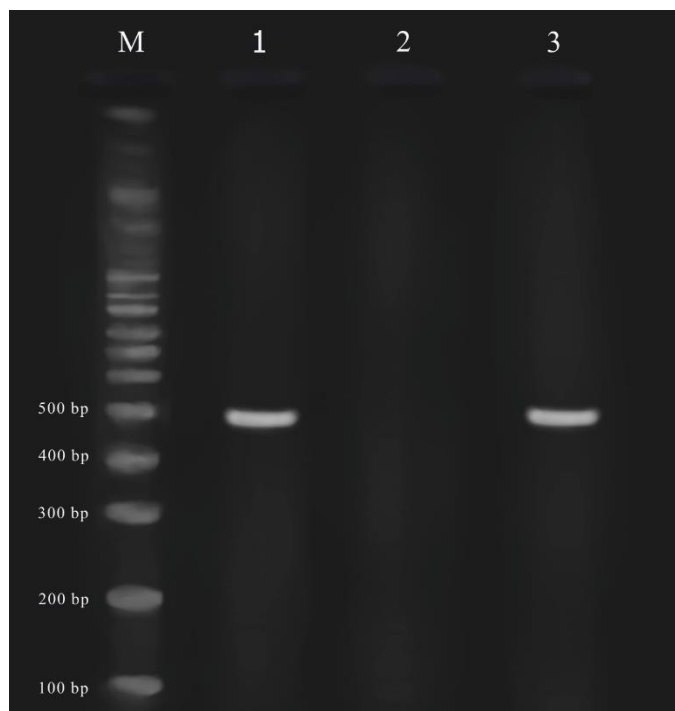
Obr. 14 Ilustrativní elektroferogram pro *N. apis* 321APIS. M: marker, 1: pozitivní kontrola *N. apis*, 2: negativní kontrola, 3: 321 bp amplicon izolátu (vytvořeno v programu Krita).



Obr. 15 Ilustrativní elektroferogram pro *S. marcescens*. M: marker, 1: pozitivní kontrola *S. marcescens*, 2: negativní kontrola, 3: 107 bp amplicon izolátu (vytvořeno v programu Krita).



Obr. 16 Ilustrativní elektroferogram pro *L. passim* LpCytb. M: marker, 1: pozitivní kontrola *L. passim*, 2: negativní kontrola, 3: 247 bp amplicon izolátu (vytvořeno v programu Krita).



Obr. 17 Ilustrativní elektroferogram pro *L. passim* Tryp-cytb. M: marker, 1: pozitivní kontrola *L. passim*, 2: negativní kontrola, 3: 490 bp amplicon izolátu (vytvořeno v programu Krita).

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na patogenní mikroorganismy včely medonosné, konkrétně na pět vybraných patogenů *N. apis*, *N. ceranae*, *S. marcescens*, *C. mellificae* a *L. passim* a jejich detekci vhodnou laboratorní metodou.

Úvod teoretické části práce byl věnován obecné charakterizaci včelích patogenů a imunitnímu systému včel. Následně byly popsány vybrané včelí patogeny se zaměřením na mechanismy jejich infekčnosti pro včely.

Dále byly popsány možnosti laboratorní diagnostiky těchto patogenů. Jako první byla popsána mikrobiální kultivace, která se pro účely detekce dá nejlépe použít k identifikaci *S. marcescens*, jelikož produkuje typicky červené kolonie a lze ji kultivovat na selektivním médiu. Byla popsána také mikroskopická identifikace patogenů, což ale není velmi spolehlivý způsob detekce, jelikož například spory *N. apis* a *N. ceranae* jsou si velmi podobné a nejsou tak vždy dokonale rozlišitelné. Z tohoto důvodu se využívá molekulárně-biologických metod jako MALDI-TOF MS a PCR, kterým byly věnovány poslední kapitoly teoretické části.

V experimentální části byl popsán návrh postupu pro detekci patogenů pomocí PCR. Byly sepsány možné postupy zpracování vzorků včel a izolace DNA z těchto vzorků. Dále byly popsány možné podmínky PCR reakce a následné detekce patogenů pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. Také byly nakresleny ilustrativní elektroferogramy, které zobrazují, jak by mohl vypadat pozitivní nález vybraných patogenů.

6 LITERATURA

- Anhalt J., Fenselau C. (1975): Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **47**, 219-225.
- Antúnez K., Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P., Higes M. (2009): Immune suppression in the honeybee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* **11**, 2284-2290.
- Arismendi N., Caro S., Castro M., Vargas M., Riveros G., Venegas T. (2020): Impact of Mixed Infections of Gut Parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae* on the Lifespan and Immune-related Biomarkers in *Apis mellifera*. *Insects* **11**, 420. <https://www.mdpi.com/2075-4450/11/7/420>
- Bahreini R., Currie R. (2015): The influence of *Nosema* (Microspora: Nosematidae) infection on honey bee (Hymenoptera: Apidae) defense against *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **132**, 57-65.
- Beaurepaire A., Piot N., Doublet V., Antunez K., Campbell E., Chantawannakul P., Chejanovsky N., Gajda A., Heerman M., Panziera D., Smaghe G., Yañez O., de Miranda J., Dalmon A. (2020): Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects*, **11**, 239. <https://www.mdpi.com/2075-4450/11/4/239>
- Brenner D.J., Farmer III J.J. (2005): Genus XXXIV. *Serratia*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, *The Proteobacteria*, Part B *The Gammaproteobacteria* (Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., eds.), Springer, New York, U.S.A., 799-811.
- Buendía-Abad M., Higes M., Martín-Hernández R., Barrios L., Meana A., Fernández Fernández A., Osuna A., De Pablos L. (2021): Workflow of *Lotmaria passim* isolation: Experimental infection with a low-passage strain causes higher honeybee mortality rates than the PRA-403 reference strain. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **14**, 68-74.
- Burritt N., Foss N., Neeno-Eckwall E., Church J., Hilger A., Hildebrand J., Warshauer D., Perna N., Burritt J. (2016): Sepsis and Hemocyte Loss in Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with *Serratia marcescens* Strain Sicaria. *PLoS ONE* **11**, p.e0167752. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0167752>
- Bussalleu E., Althouse G. (2018): A PCR detection method for discerning *Serratia marcescens* in extended boar semen. *Journal of Microbiological Methods* **151**, 106-110.
- Caputo J. (2017): *A Guidebook On Honey Bee Health: Honey Bee Immunity — Pesticides — Pests and Diseases*. Lincoln: UNL Digital Commons Repository, 2-18. <https://digitalcommons.unl.edu/entodistmasters/24/> (22. 1. 2021).
- Castelli L., Branchiccela B., Invernizzi C., Tomasco I., Basualdo M., Rodriguez M., Zunino P., Antúnez K. (2019): Detection of *Lotmaria passim* in Africanized and European honey bees from Uruguay, Argentina and Chile. *Journal of Invertebrate Pathology* **160**, 95-97.
- Clark D., Pazdernik N., McGehee M. (2019): Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular biology*, Elsevier, 168-198.
- Corona M., Velarde R., Remolina S., Moran-Lauter A., Wang Y., Hughes K., Robinson G. (2007): Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7128-7133.
- Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. (2012): Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* **36**, 380-407.
- Danihlík J., Aronstein K., Petřivalský M. (2015): Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research* **54**, 123-136.
- Darshan N., Manonmani H. (2015): Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology* **52**, 5393-5407.
- De Graaf D., Raes H., Sabbe G., De Rycke P., Jacobs F. (1994): Early Development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the Midgut Epithelium of the Honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **63**, 74-81.
- DeGrandi-Hoffman G., Chen Y. (2015): Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 170-176.

- Dostálková S., Dobeš, P., Kunc M., Hurychová J., Škrabišová M., Petřivalský M., Titěra D., Havlík J., Hyršl P., Danihlík J. (2021): Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune responses than summer populations after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology* **224**, jeb232595. <https://journals.biologists.com/jeb/article/224/3/jeb232595/223431/Winter-honeybee-Apis-mellifera-populations-show>
- El-Aneed A., Cohen A., Banoub J. (2009): Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews* **44**, 210-230.
- Evans J., Schwarz R., Chen Y., Budge G., Cornman R., De la Rua P., de Miranda J., Foret S., Foster L., Gauthier L., Genersch E., Gisder S., Jarosch A., Kucharski R., Lopez D., Lun C., Moritz R., Maleszka R., Muñoz I., Pinto M. (2013): Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* **52**, 1-54.
- Florio W., Tavanti A., Barnini S., Ghelardi E., Lupetti A. (2018): Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Frontiers in Microbiology* **9**, 1097. www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01097
- Franzen C., Müller A. (1999): Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation, and Phylogenetic Analysis of Microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 243-285.
- Fries I., Granados R., Morse R. (1992): Intracellular germination of spores of *Nosema apis*. *Z. Apidologie* **23**, 61-70.
- Fries I., Martín R., Meana A., García-Palencia P., Higes M. (2006): Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research* **47**, 230-233.
- Fries I. (1993): *Nosema apis*—A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World* **74**, 5-19.
- Fries I., Chauzat M., Chen Y., Doublet V., Genersch E., Gisder S., Higes M., McMahon D., Martín-Hernández R., Natsopoulou M., Paxton R., Tanner G., Webster T., Williams G. (2013): Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* **52**, 1-28.
- Fries I., Feng F., da Silva A., Slemenda S., Pieniazek N. (1996): *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* **32**, 356-365.
- Fünfhaus A., Ebeling J. and Genersch E. (2018): Bacterial pathogens of bees. *Current Opinion in Insect Science* **26**, 89-96.
- Garibyan L., Avashia N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* **133**, 1-4.
- Gisder S., Möckel N., Linde A., Genersch E. (2011). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honeybee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology* **13**, 404-413.
- Gómez-Moracho T., Buendía-Abad M., Benito M., García-Palencia P., Barrios L., Bartolomé C., Maside X., Meana A., Jiménez-Antón M., Olías-Molero A., Alunda J., Martín-Hernández R. and Higes M. (2020): Experimental evidence of harmful effects of *Crithidia mellifica* and *Lotmaria passim* on honey bees. *International Journal for Parasitology* **50**, 1117-1124.
- Green M., Sambrook J. (2018): The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, **2018**, 338-345.
- Green M., Sambrook J. (2019): Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2019**, 436-456.
- Grimont F., Grimont P. A. D. (2006): The Genus *Serratia*. *Prokaryotes* **6**, 197–214.
- Haddix P., Shanks R. (2018): Prodigiosin pigment of *Serratia marcescens* is associated with increased biomass production. *Archives of Microbiology* **200**, 989-999.
- Higes M., Martín-Hernández R., Meana A. (2010): *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* **41**, 375-392.
- Houdelet C., Bocquet M., Bulet P. (2020): Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry biotyping, an approach for deciphering and assessing the identity of the

- honeybee pathogen *Nosema*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **35**.
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rcm.8980>
- Huang Q., Kryger P., Le Conte Y., Moritz R. F. A. (2012): Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 297-302.
- Hubert J., Bicianova M., Ledvinka O., Kamler M., Lester P. J., Nesvorna M., Kopecky J., Erban T. (2017): Changes in the Bacteriome of Honey Bees Associated with the Parasite *Varroa destructor*, and Pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microbial Ecology* **73**, 685-698.
- Huong T. T., Kopel P., Komínková M., Gurán R., Ruttkay-Nedecký B., Trnková L., Zítka O., Adam V., Kizek R. (2014): Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* **1**, 64-66.
- Kamler F., Titěra D., Kamler M. (2011): Rozšíření, patogeneze a návrh opatření v chovech včel ohrožených mikrosporidii *Nosema ceranae*. Závěrečná zpráva za rok 2011. 20 str.
- Keeling P. J., Fast N. M. (2002): Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* **56**, 93-116.
- Kurze C., Dosselli R., Grassl J., Le Conte Y., Kryger P., Baer B., Moritz R. F. A. (2016): Differential proteomics reveals novel insights into *Nosema*–honey bee interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **79**, 42-49.
- Kwong W., Moran N. (2016): Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 374-384.
- Langridge D. F., McGhee R. B. (1967): *Crithidia mellificae* n. sp. an Acidophilic Trypanosomatid of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Journal of Protozoology* **14**, 485-487.
- Larsen A., Reynaldi F. J., Guzmán-Novoa E. (2019): Fundamentals of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* **10**, 705-728.
- Liu Q., Lei J., Darby A. C., Kadowaki T. (2020): Trypanosomatid parasite dynamically changes the transcriptome during infection and modifies honey bee physiology. *Communications Biology* **3**, 1-8.
- Lopes A. H., Souto-Pradón T., Dias F. A., Gomes M. T., Rodrigues G. C., Zimmermann L. T., Alves e Silva T. L., Vermelho A. B. (2010): Trypanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. *Open Parasitology Journal* **4**, 30-59.
- Lourenço A. P., Mackert A., Cristino A. D. S., Simões Z. L. P. (2008): Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* **39**, 372-385.
- Lukeš J., Votýpka J. (2020): Field Isolation and Cultivation of Trypanosomatids from Insects. In *Trypanosomatids* (Michels P. A. M., Ginger M. L., Zilberstein D.), Humana Press, New York, 3-21.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D. P. (2012): *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. Pearson, San Francisco, USA, 1041 stran.
- Martín-Hernández R., Higes M., Sagastume S., Juarranz Á., Dias-Almeida J., Budge G. E., Meana A., Boonham N. (2017): Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS ONE* **12**, e0170183.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0170183>.
- Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A. M., Garrido-Bailón E., Higes M. (2007): Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6331-6338.
- Maslov D. A., Votýpka J., Yurchenko V., Lukeš J. (2013): Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: All that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology* **29**, 43-52.
- Matthijs S., de Waele V., Vandenberghe V., Verhoeven B., Evers J., Brunain M., Saegerman C., de Winter P. J. J., Roels S., de Graaf D. C., de Regge N. (2020): Nationwide screening for bee viruses and parasites in belgian honey bees. *Viruses* **12**, 890.
<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/8/890>.
- Pașca C., Mărghitaș L., Șonea C., Bobiș O., Buzura-matei I., Dezmirean D. (2019): A Review of *Nosema ceranae* and *Nosema apis*: Characterization and Impact for Beekeeping. *Bulletin of*

University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Animal Science and Biotechnologies* **76**, 77.

- Perutka Z., Šebela M. (2018): Basis of Mass Spectrometry: Technical Variants. In: *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology* (Cobo F.), Academic Press, 19-45.
- Pirk C. W. W., de Miranda J. R., Kramer M., Murray T. E., Nazzi F., Shutler D., M van der Steen J. J., van Dooremalen C. (2013): Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. *Apis mellifera research. Journal of Apicultural Research* **52**, 1-24.
- Ptaszyńska A. A., Borsuk G., Mułenko W., & Olszewski K. (2012): Monitoring of nosemosis in the lublin region and preliminary morphometric studies of *Nosema* spp. spores. *Medycyna Weterynaryjna* **68**, 622-625.
- Quintana S., Plischuk S., Brasesco C., Revainera P., Genchi García M. L., Bravi M. E., Reynaldi F., Eguaras M., Maggi M. (2021): *Lotmaria passim* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in honey bees from Argentina. *Parasitology International* **81**, 102244, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S138357692030194X?via%3Dihub>.
- Ramsey S. D., Ochoa R., Bauchan G., Gulbranson C., Mowery J. D., Cohen A., Lim D., Joklik J., Cicero J. M., Ellis J. D., Hawthorne D., Van Engelsdorp D. (2019): Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 1792-1801.
- Ravoet J., Maharramov J., Meeus I., De Smet L., Wenseleers T., Smagghe G., de Graaf D. C. (2013): Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality. *PLoS ONE* **8**, e72443. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072443>
- Raymann K., Coon K., Shaffer Z., Salisbury S., Moran N. (2018): Pathogenicity of *Serratia marcescens* Strains in Honey Bees, *mBio* **9**, e01649-18. <https://mbio.asm.org/content/9/5/e01649-18.short>
- Raymann K., Moran N. A. (2018): The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. In *Current Opinion in Insect Science* **26**, 97-104.
- Raymann K., Shaffer Z., Moran N. A. (2017): Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLOS Biology* **15**, e2001861. <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2001861>.
- Ruiz-González M. X., Brown M. J. F. (2006): Honey bee and bumblebee trypanosomatids: Specificity and potential for transmission. *Ecological Entomology* **31**, 616-622.
- Sarwar M. (2016): Fungal diseases of honey bees (Hymenoptera : Apidae) that induce considerable losses to colonies and protocol for treatment. *International Journal of Zoology Studies* **1**, 8-13.
- Schlüns H., Sadd B. M., Schmid-Hempel P., Crozier R. H. (2010): Infection with the trypanosome *Crithidia bombi* and expression of immune-related genes in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Developmental and Comparative Immunology* **34**, 705-709.
- Schwarz R. S., Bauchan G. R., Murphy C. A., Ravoet J., De Graaf D. C., Evans J. D. (2015): Characterization of two species of trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **62**, 567-583.
- Settanni L., Corsetti A. (2007): The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. *Journal of Microbiological Methods* **69**, 1-22.
- Sideri M., Tsakas S., Markoutsia E., Lampropoulou M., Marmaras V. J. (2008): Innate immunity in insects: Surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology* **123**, 528-537.
- Singhal N., Kumar M., Kanaujia P., Viridi J. (2015): MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**, 791. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00791>.
- Stevanovic J., Schwarz R. S., Vejnovic B., Evans J. D., Irwin R. E., Glavinic U., Stanimirovic Z. (2016): Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey

- (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **139**, 6-11.
- Sulborska A., Horecka B., Cebrat M., Kowalczyk M., Skrzypek T. H., Kazimierczak W., Trytek M., Borsuk G. (2019): Microsporidia *Nosema* spp. – obligate bee parasites are transmitted by air. *Scientific Reports* **9**, 14376.
- Tang H. (2009): Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly* **3**, 105-111.
- Tüzmen Ş., Baskın Y., Feyda Nursal A., Eraslan S., Esemen Y., Çalıbaşı G., Banu Demir A., Abbasoğlu D., Hızıl C. (2018): Techniques for Nucleic Acid Engineering. *Omic Technologies and Bio-Engineering* **1**, 247-315.
- Vaaje-Kolstad G., Horn S. J., Sørli M., Eijsink V. G. H. (2013): The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - A model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal* **280**, 3028-3049.
- Valones M. A. A., Guimarães R. L., Brandão L. A. C., De Souza P. R. E., De Albuquerque Tavares Carvalho A., Crovela S. (2009): Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**, 1-11.
- Wang K., Li J., Zhao L., Mu X., Wang C., Wang M., Xue X., Qi S., Wu L. (2021): Gut microbiota protects honey bees (*Apis mellifera* L.) against polystyrene microplastics exposure risks. *Journal of Hazardous Materials* **402**, 123828. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123828>
- Wheeler R. J., Gluenz E., Gull K. (2013): The limits on trypanosomatid morphological diversity. *PLoS ONE* **8**, e79581. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079581>
- Williams M. K. F., Tripodi A. D., Szalanski A. L. (2019): Molecular survey for the honey bee (*Apis mellifera* L.) trypanosome parasites *Crithidia mellifica* and *Lotmaria passim*. *Journal of Apicultural Research* **58**, 553-558.
- Yu V. L. (1979). *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. *New England Journal of Medicine* **300**, 887-893.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABPV	virus akutní paralýzy včel
ALPV	virus smrtelné paralýzy mšic
AmFV	vláknitý virus
AmP	antimikrobiální peptidy
BSRV	virus velké řeky Sioux
BQCV	virus černání matečnicku
BVY	včelí virus Y
CBPV	virus chronické paralýzy včel
CHCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
ChiA	chitinasa A
ChiB	chitinasa B
ChiC	chitinasa C
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, gentisová
DWV	virus deformovaných křídel
FA	kyselina 4-hydroxy-3-methoxyskořicová, ferulová
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
KBV	kašmírský virus
kDNA	kinetoplastová DNA
LSV	virus jezera Sinai
MALDI-TOF MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analyzátozem doby letu
MBC	4-methoxy-2-2'-bipyrrol-5-karbaldehyd
MPCR	multiplexní polymerázová řetězová reakce
MPP	2-methyl-3-pentylpyrrol
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
SA	kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová, sinapová
SBV	virus pytlíčkovitého plodu
SEM	skenovací elektronový mikroskop
Ss1	<i>Serratia marcescens</i> kmen Sicaria