

Genotipizacija bakterije *Paenibacillus larvae*, povzročitelja hude gnilobe čebelje zalege

Biologija

Raziskovalna naloga

Avtorica: Klara Papić,

3. letnik

Mentor: dr. Andrej Gregorčič, univ. dipl. biol.

Somentorici: asist. Majda Golob, dr. vet. med. in

znan. sod. dr. Darja Kušar, univ. dipl. biol.

2020

Gimnazija Bežigrad



KAZALO

1	POVZETEK	3
2	UVOD	4
3	TEORETIČNI DEL	6
	3.1 BAKTERIJA <i>P. larvae</i>	6
	3.2 FLUOROMETRIČNE IN SPEKTROFOTOMETRIČNE METODE	7
	3.2.1 Spektrofotometrične metode	7
	3.2.2 Fluorometrične metode	7
	3.2 GENOTIPIZACIJA BAKTERIJE <i>P. larvae</i>	8
	3.2.1 Metoda PCR	8
	3.2.2 Metoda ERIC-PCR	9
	3.2.3 Povezava med tipom ERIC in morfotipom	11
	3.3 APLIKACIJA GERK.....	13
4	RAZISKOVALNI DEL	14
	4.1 KEMIKALIJE IN REAGENTI.....	14
	4.2 APARATURE	14
	4.3 METODA ERIC-PCR.....	15
	4.4 ROČNA IZOLACIJA DNA (komplet »DNeasy Blood & Tissue kit«).....	15
	4.5 AVTOMATSKA IZOLACIJA DNA (komplet »MagMax Core kit«).....	16
	4.6 FLUOROMETRIČNO MERJENJE KONCENTRACIJE DNA.....	17
	4.7 SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE ČISTOSTI DNA	17
5	REZULTATI	18
	5.1 IZOLACIJA DNA	18
	5.1.1 Merjenje čistosti in koncentracije DNA	18
	5.2 ZASTOPANOST TIPOV ERIC.....	20
	5.3 POVEZAVA MED TIPOM ERIC IN MORFOTIPOM	22
6	RAZPRAVA	22
	6.1 ZASTOPANOST TIPOV ERIC.....	22
	6.2 POVEZAVA MED TIPOM ERIC IN MORFOTIPOM	23
	6.3 IZOLACIJA DNA	23
7	ZAKLJUČEK	25
8	LITERATURA	26
	ZAHVALA	30

SEZNAM KRATIC

DNA – deoksiribonukleinska kislina (angl. *deoxyribonucleic acid*)

GERK – pregled podatkov o zemljiščih v uporabi kmetijskih gospodarstev

MKGP – Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano

mRNA – informacijska ribonukleinska kislina (angl. *messenger RNA*)

P. larvae – *Paenibacillus larvae*

PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*)

Zaporedja ERIC – enterobakterijska ponavljajoča se medgenska ohranjena zaporedja
(angl. *enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences*)

1 POVZETEK

Bakterija *Paenibacillus larvae* je po Gramu pozitivna bakterija, ki povzroča hudo gnilobo čebelje zalege. Bolezen povzroči smrt čebeljih ličink in vodi v velike izgube v čebelarški industriji. V prvem sklopu naloge smo genotipizali 51 izolatov bakterije *P. larvae*, ki so izvirali iz slovenskih čebelnjakov. Za ta namen smo izolate bakterije genotipizirali z verižno reakcijo s polimerazo, s katero smo pomnoževali enterobakterijska ponavljajoča se medgenska ohranjena zaporedja (ERIC-PCR). Ugotovili smo dva tipa ERIC: 42 od 51 (82,4 %) izolatov je pripadalo tipu ERIC II, medtem ko je 9 od 51 (17,6 %) izolatov pripadalo tipu ERIC I. Ker smo ugotovili le dva tipa ERIC, se je metoda ERIC-PCR izkazala kot delno informativna, zato bi bila potrebna uporaba tipizacijske metode z večjo močjo razlikovanja. V drugem sklopu naloge smo primerjali avtomatsko (komplet »MagMax Core kit«, Thermo Fisher Scientific) in ročno (komplet »DNeasy Blood & Tissue kit«, Qiagen) izolacijo DNA glede čistosti in koncentracije izolirane DNA. Čeprav sta imela oba kompleta dober izplen DNA, se je komplet »DNeasy Blood & Tissue kit« izkazal kot primernejši za pridobitev visoko kakovostne in čiste DNA za nadaljnje molekularne analize.

2 UVOD

Čebelarstvo ima v Sloveniji dolgoletno tradicijo in predstavlja pomembno kmetijsko panogo z naravno in kulturno dediščino. V Sloveniji je dovoljeno čebelariti le s kranjsko sivko *Apis mellifera carnica*, avtohtono čebeljo pasmo, ki je podvržena številnim boleznim. Huda gniloba čebelje zalege je ena od najnevarnejših bolezní čebelje družine, ki je patogena za čebelje ličinke. Povzročitelj je po gramu pozitivna bakterija *Paenibacillus larvae*, ki je v sporulirani obliki izredno odporna proti številnim dejavnikom okolja. Bolne čebelje družine oslabijo in popolnoma propadejo, bolezní se ne zdravi. V skladu s pravilnikom o zatiranju hude gnilobe čebelje zalege je treba okužene čebelje družine, satje in opremo uničiti (zažgati), le v redkih primerih je možno pretresanje čebel. Gre za metodo, kjer se čebele iz panja pretrese v lesene zabožčke, ki se jih shrani za 24–72 ur v hladen prostor; sledi naselitev v nove ali v razkužene panje na nove satnice. Okrog žarišča bolezní se v trikilometrskem pasu uvede zapora čebelnjaka (prepoved premikov čebel), dokler se žarišče ne sanira in pregledajo vse čebelje družine znotraj zapore (Poppinga in Genersch, 2015; MKGP, 2019).

Za uspešno zatiranje hude gnilobe je najučinkovitejši ukrep preprečevanje širjenja bolezní, zato je pomembno poznavanje poti širjenja, ki ga lahko ugotovljamo z ustreznimi laboratorijskimi postopki. Sum na bolezen se postavi na podlagi značilnih kliničnih znakov v panju. Diagnostika bolezní temelji na mikroskopski preiskavi vzorcev čebelje zalege, klasični mikrobiološki metodi z izolacijo povzročitelja na trdnih gojiščih in na tipizaciji sevov z molekularnimi metodami (genotipizaciji). Bakterijo *P. larvae* lahko dokazujemo tudi v drobirju, medu in drugih čebeljih izdelkih (Genersch, 2010).

Za razumevanje poti širjenja hude gnilobe je potrebna genotipizacija povzročitelja *P. larvae*. Od teh je najbolj razširjena metoda ERIC-PCR, pri kateri gre za tipizacijo na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR), v kateri pomnožujemo enterobakterijska ponavaljajoča se medgenska ohranjena zaporedja (zaporedja ERIC) (Genersch in sod., 2006). V zadnjih letih se kot metoda izbora uveljavlja tudi določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje) celotnih bakterijskih genomov (angl. *whole-genome sequencing*, WGS) (Ågren in sod., 2017).

Glavni namen naloge je bil določitev zastopanosti tipov ERIC-PCR v Sloveniji, ki do danes ni poznana. Specifični cilji raziskovalnega dela so bili:

- dobiti vpogled v laboratorijsko in raziskovalno delo, v katerega so vključeni zaposleni na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo;
- seznaniti se s problematiko hude gnilobe in njenim povzročiteljem (bakterijo *P. larvae*);
- spoznati se z osnovnimi mikrobiološkimi in molekularnimi tehnikami s poudarkom na identifikaciji in tipizaciji bakterije *P. larvae* z metodo ERIC-PCR
- primerjati kakovost DNA, izolirane na dva načina (ročna in avtomatska izolacija DNA).

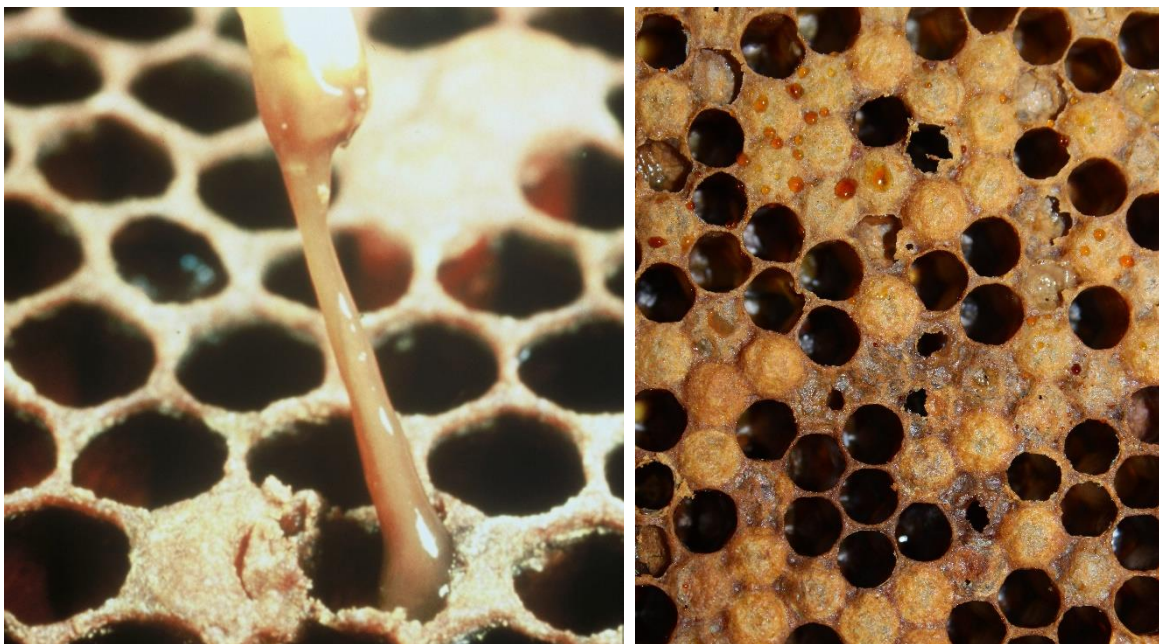
Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani, pod mentorstvom Majde Golob in Darje Kušar. Naloga je bila opravljena v okviru projekta »Ugotavljanje poti širjenja hude gnilobe čebelje zalege z genetsko tipizacijo sevov povzročitelja bolezni, V4-1804«.

3 TEORETIČNI DEL

3.1 BAKTERIJA *P. larvae*

Bakterija *Paenibacillus larvae* je povzročitelj hude gnilobe čebelje zalege (angl. American foulbrood), ene od najnevarnejših bolezni čebelje zalege. Sporulirana oblika bakterije *P. larvae* je zelo odporna proti številnim skrajnim razmeram v okolju in po podatkih iz literature lahko ostaja infektivna več kot 35 let (ARRS, 2020). Huda gniloba je močno nalezljiva bolezen, ki se širi s prenašanjem spor; te okužijo ličinke čebel, nadaljnji razvoj bolezni pa povzroči oslabitev in popoln propad čebelje družine (ARRS, 2020; Genersch, 2010).

Bolezen se v okuženem panju kaže kot presledkasta zalega: med zaleženimi celicami se pojavijo prazne celice, kar je posledica čistilnega nagona čebel negovalk, ki odstranjujejo odmrle ličinke iz nepokritih ali pokritih celic (slika 1). Pokrovci satnih celic so temnejše barve, mastnega izgleda in velikokrat ugreznjeni. Na njih opazimo luknjice z neravnimi robovi. Glavni klinični znak je vlečljiva kremasta ali rjava vsebina v satnih celicah. Če je bolezen že napredovala, lahko na dnu satnih celic opazimo samo suhe luske, tj. ostanke ličinke, ki se je posušila in vsebuje veliko število invazivnih spor. Glede na genotip povzročitelja in stanje bolezni v panju opazimo veliko število spremenjenih satnih celic, lahko pa so spremenjene le posamezne celice, ki jih pogosto tudi spregledamo (Genersch, 2010).



Slika 1: Presledkasta zalega. Vir: Texas Apiary Inspection Service (2020).

3.2 FLUOROMETRIČNE IN SPEKTROFOTOMETRIČNE METODE

3.2.1 Spektrofotometrične metode

Spektrofotometrične metode uporabljamo za določitev koncentracije in čistosti nukleinskih kislin; te imajo absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 260 nm. Količina absorbirane svetlobe je sorazmerna s količino nukleinskih kislin v vzorcu. Pri valovni dolžini 280 nm imajo absorpcijski maksimum aminokislina, predvsem stranske verige aromatskih aminokislin tirozina, fenilalanina in triptofana. Prisotnost beljakovin v raztopini izolirane DNA lahko preverimo z merjenjem absorbance pri 260 nm (A_{260}) in 280 nm (A_{280}). Razmerje A_{260}/A_{280} med 1,8 in 2,0 pomeni, da raztopina DNA ne vsebuje večje količine beljakovin ali drugih nečistoč, medtem ko razmerje $A_{260}/A_{280} < 1,8$ nakazuje na kontaminacijo z beljakovinami. Vsebnost fenolov in ostalih organskih snovi, ki absorbirajo pri 230 nm, lahko določimo z merjenjem absorbance pri 230 nm. Razmerje A_{260}/A_{230} pri čistih vzorcih je običajno višje od 1,8 (Koetsier in Cantor, 2019).

3.2.2 Fluorometrične metode

Fluorometrične meritve koncentracije nukleinskih kislin s fluorometrom temeljijo na uporabi fluorescenčnih barvil, ki se vežejo na nukleinske kisline, in veljajo za bolj natančne in občutljive kot spektrofotometrične metode. Fluorometer oddaja svetlobo določene valovne dolžine, kjer ima uporabljeni fluorokrom absorpcijski maksimum. Fluorokromi zaradi prejete energije in bližine dušikovih spojin fluorescirajo oziroma oddajajo svetlobo pri valovni dolžini v vidnem delu spektra (Dell'Anno in sod., 1998). Fluorimeter izmeri jakost fluorescence, ki je sorazmerna s količino nukleinskih kislin. Metoda merjenja s fluorometrom je bolj natančna za kvantifikacijo DNA kot spektrofotometrične metode, saj se v primeru uporabe kompleta »Qubit dsDNA assay kit« reagent veže le na dvoverižno DNA. S tem se izognemo napakam v merjenju koncentracije DNA zaradi preostalih nukleinskih kislin in nečistoč.



Slika 6: Fluorometer Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Vir: News Medical Life Science (2020).

3.2 GENOTIPIZACIJA BAKTERIJE *P. larvae*

3.2.1 Metoda PCR

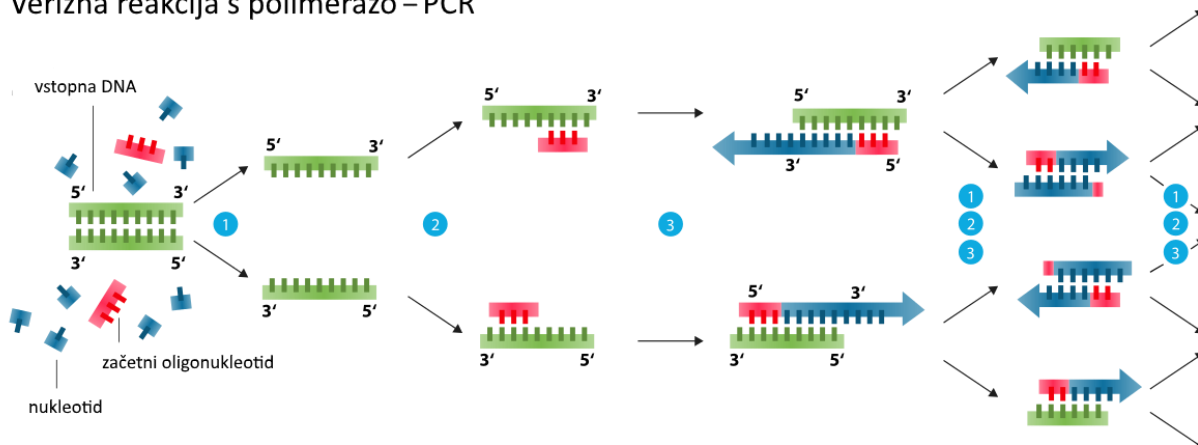
Metoda PCR je verižna reakcija pomnoževanja DNA z encimom DNA-polimeraza. Princip metode PCR je ciklično pomnoževanje tarčnih odsekov DNA. Cikel praviloma sestavljajo tri faze (slika 2) (Žgur Bertok in Starčič Erjavec, 2009):

1. denaturacija dvoverižne DNA,
2. prileganje para začetnih oligonukleotidov na tarčni odsek DNA,
3. sinteza komplementarne verige DNA (elongacija).

Mešanica PCR vsebuje (Brown, 2010):

- matrično DNA,
- mešanico vseh dNTP-jev (deoksinukleotidov),
- termostabilno DNA-polimerazo (polimerazo Taq),
- pufer,
- Mg^{2+} ione,
- vodilni in povratni začetni oligonukleotid (angl. *forward and reverse primer*)
- sterilno destilirano vodo

Verižna reakcija s polimerazo – PCR



Slika 2: Faze verižne reakcije s polimerazo (PCR). (1) Denaturacija DNA; (2) prileganje začetnih oligonukleotidov; (3) sinteza komplementarne verige DNA (elongacija). Vir: Wikipedia (2020).

V reakcijski mešanici PCR pufer zagotavlja optimalne pogoje delovanja DNA-polimeraze. Mg^{2+} ioni stabilizirajo kompleks med polimerazo, začetnima oligonukleotidoma, dNTP in matrično DNA. Vsi štirje dNTP (dATP, dGTP, dCTP in dTTP), zastopani v enaki koncentraciji, predstavljajo zalogo gradbenih elementov potrebnih za sintezo nove verige DNA (Thermo Fisher Scientific, 2020).

3.2.2 Metoda ERIC-PCR

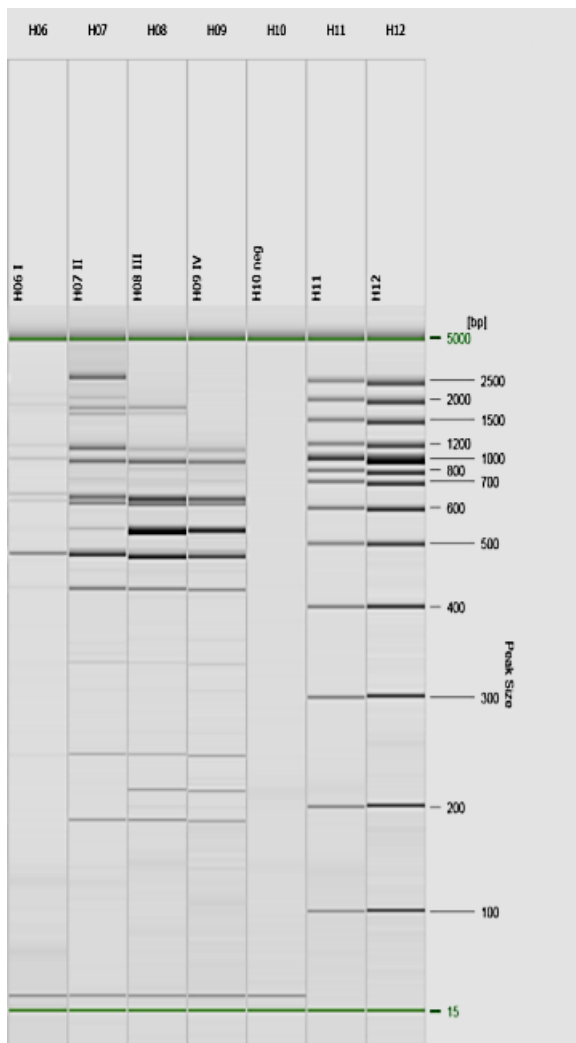
Genom bakterij je večinoma sestavljen iz kodirajoče DNA, vendar vsebuje tudi manjši delež nekodirajoče ponavljajoče se DNA. Družine kratkih medgenskih ponavljajočih se zaporedij so sprva opisali pri enterobakterijah. Malo je znanega o izvoru, evoluciji in funkciji teh zaporedij; večina jih je značilnih le za določeno vrsto, kar nakazuje, da so jih mikroorganizmi pridobili nedavno nazaj in nimajo ključne vloge pri njihovem preživetju. Večina kratkih ponavljajočih se zaporedij (elementi REP) pri bakterijah so nepopolni palindromi (zaporedje, ki se v obe smeri bere enako), ki lahko tvorijo sekundarne strukture; te lahko povečajo stabilnost informacijske RNA (mRNA) oz. nimajo znane funkcije. Elementom REP so sprva pripisali regulatorno vlogo in naj bi se nahajali znotraj operonov (niz genov pod enotnim uravnavanjem izražanja), ker naj bi zaradi svoje palindromske narave tvorili stabilne strukture. Pripisali so jim še druge vloge, kot so terminacija transkripcije, regulacija stabilnosti mRNA in vpliv na strukturo kromosoma.

Z metodo ERIC-PCR pomnožujemo enterobakterijska ponavljajoča se medgenska ohranjena zaporedja (ERIC) (Wilson in Sharp, 2006). Gre za visoko ohranjene obrnjene ponovitve, ki se

nahajajo v medgenskih regijah. Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi ERIC je uspešno pri številnih po Gramu negativnih bakterijskih vrstah, pri katerih je tudi kompleksnost pomnožkov večja (Versalovic in sod., 1991). Ti elementi naj bi bili zelo ohranjeni pri bakterijskih vrstah *Escherichia coli* in *Salmonella enterica*, kar kaže, da so se vstavili v genom mnogo pred pojavom enterobakterij. Metodo ERIC-PCR so uporabili tudi pri vrsti *Bacillus subtilis* in ostalih po Gramu pozitivnih bakterijah, pri katerih je raznolikost fragmentov manjša. Fragmenti so prisotni tudi pri filogenetsko oddaljenih vrstah in tudi pri arhejah. S pomnožki, ki jih dobimo z začetnimi oligonukleotidi ERIC, lahko med seboj ločimo različne vrste in izolate iste vrste, saj so profili dovolj raznoliki oz. imajo zadostno moč razlikovanja, da to omogočijo (Wilson in Sharp, 2006).

Pomnoževanje zaporedij ERIC se v bakteriologiji pogosto uporablja kot genotipizacijska metoda. Začetni oligonukleotidi so zasnovani tako, da se pomnožijo vse kopije ponavljajočih se zaporedij ERIC. Če se lokacija teh kopij spreminja med vrstami oziroma sevi, dobimo profil pomnožkov (prstni odtis DNA), ki je značilen za posamezen sev.

Čeprav bakterija *P. larvae* ni enterobakterija in je po Gramu pozitivna, se je metoda ERIC-PCR pokazala kot primerna za njeno genotipizacijo (Genersch in Otten, 2003). Z omenjeno metodo izolate bakterije *P. larvae* razvrščamo v štiri genotipe, označene kot ERIC I–IV. Nedavno so na novo opisali tudi tip ERIC V, ki so ga ugotovili pri izolatu *P. larvae* iz vzorca španskega medu (Beims in sod., 2020). Tipa ERIC I in ERIC II sta najpogostejša tipa v vzorcih čebelje zalege in medu, medtem ko sta tipa ERIC III in IV redka (Hirai in sod., 2016). Tipi ERIC I–IV se po elektroforezni ločitvi pomnožkov jasno razlikujejo (slika 3).



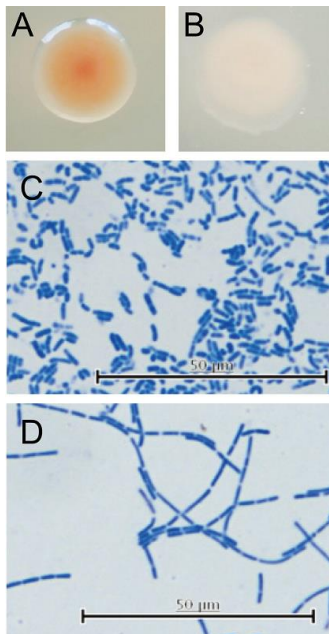
Slika 3: Genotipizacija izolatov bakterije *P. larvae* z metodo ERIC-PCR. Referenčni sevi tipo ERIC I–IV. Stolpec H06, tip ERIC I; stolpec H07, tip ERIC II; stolpec H08, tip ERIC III; stolpec H09, tip ERIC IV; stolpec H10, negativna kontrola; stolpca H11 in H12, označevalec velikosti DNA »QX Size Marker 100–2500 bp (Qiagen)«. Z zeleno je predstavljen poravnalni označevalec »QX DNA Alignment Marker 15 bp/5 kb (Qiagen)«.

3.2.3 Povezava med tipom ERIC in morfotipom

Tipi ERIC se med seboj razlikujejo v virulenci, obarvanosti (pigmentaciji) kolonij, morfologiji spor, rasti v tekočem gojišču in sposobnosti razgradnje manitola in salicina (Hirai in sod., 2016). Od omenjenih značilnosti smo v tem delu ugotavljali pigmentacijo in morfologijo kolonij (morfotip).

Ugotavljanje prisotnosti bakterije *P. larvae* izvajamo z bakteriološko preiskavo in gojenjem na gojiščih, ki spodbujajo germinacijo (kalitev) spor in rast bakterije. Literatura navaja, da se kolonije bakterije *P. larvae* na trdnem gojišču večinoma kažejo kot dva morfološka tipa (morfotipa). Tipične kolonije bakterije *P. larvae*, ki so značilne za tip ERIC I, so belkasto sive,

tipične bacilarne kolonije z neravnimi robovi. Drugi morfotip ima kolonije z gladko površino, ravnimi robovi in oranžnim obarvanjem različne intenzitete in pozicije. Obarvani so lahko le robovi, osrednji del ali le deli kolonije, oranžno obarvanje pa se lahko pojavi šele po več pasajah (Bassi in sod., 2015). Obarvane kolonije naj bi bile značilne za tipa ERIC II in III (Genersch in sod., 2006; Bassi in sod., 2015). Tudi na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete so pri klasičnih bakterioloških preiskavah ugotovili, da bakterija *P. larvae* pri rasti na gojišču BHIA (Brain Heart Infusion agar z dodatkom nalidiksinske kisline) tvori različne morfotipe. Poleg tipičnih sivih, dokaj velikih bacilarnih kolonij, ima lahko povzročitelj hude gnilobe tudi drobne, gladke in sive kolonije. Po njihovih dosedanjih izkušnjah se v Sloveniji pojavljajo tudi rdečkasto-oranžne kolonije.



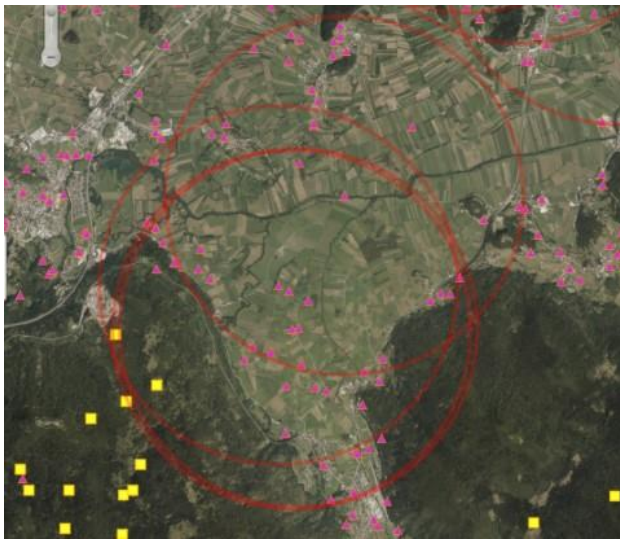
Slika 4: Morfološke značilnosti bakterije *P. larvae*. (A) in (C), tip ERIC II; (B) in (D), tip ERIC I. Vir: Hirai in sod. (2016).

V japonski raziskavi so rezultati pokazali oranžno obarvane kolonije pri tipu ERIC II in bele, nekoliko prozorne kolonije pri tipu ERIC I (slika 4) (Hirai in sod., 2016). Tudi mikroskopska slika razlikuje med tipoma ERIC: pigmentiran tip ERIC II vsebuje kratke, paličasto oblikovane celice, medtem ko tip ERIC I tvori daljše paličice, ki se pojavljajo v verigah (slika 4).

3.3 APLIKACIJA GERK

Aplikacija GERK (pregled podatkov o zemljiščih v uporabi kmetijskih gospodarstev) – Javni pregledovalnik grafičnih podatkov Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP) je spletna aplikacija, ki omogoča dostop do podatkov o katastru čebelje paše (Javni pregledovalnik grafičnih podatkov MKGP, 2020).

Vsebuje tudi podatke o lokaciji in številu stojišč (čebelnjakov) ter o stanju na terenu in vrstah rastlinskih združb. Aplikacija je uporabna tudi za informativni pregled prisotnosti kužnih krogov zaradi hude gnilobe na posameznem območju. Trikilometrski pasovi, ki predstavljajo kužni krog okoli okuženega čebelnjaka, so na zemljevidu prikazani kot rdeče obrobljeni krogi (slika 5). Znotraj kužnega kroga velja prepoved premika čebeljih družin vse do njegove ukinitve (ČZS, 2019).



Slika 5: Aplikacija GERK. Z rdečo so obkroženi kužni krogi. Vir: ČZS (2020).

4 RAZISKOVALNI DEL

4.1 KEMIKALIJE IN REAGENTI

agaroza »Agarose LE (low electroendosmosis)«	Sigma Aldrich
etidijev bromid (10 mg/mL)	Invitrogen
nanašalni pufer »6× DNA loading dye«	Termo Fisher Scientific
pufer Tris	Lonza
pufer EDTA	Lonza
Triton X-100	Sigma Aldrich
10× pufer TBE	Lonza
RNaza A (100 mg/mL)	Qiagen
komplet »DNeasy Blood & Tissue kit«	Qiagen
komplet »Qubit 1× dsDNA Assay kit«	Invitrogen
komplet »QIAxcel DNA High Resolution kit«	Qiagen
destilirana voda (dH ₂ O)	Integrated DNA Technologies
označevalec velikosti DNA »λ/Hind III Fragments« (0,1 μm/mL)	Invitrogen
označevalec velikosti DNA »QX Size Marker 100–2500 bp«	Qiagen
komplet za avtomatsko izolacijo DNA »MagMAX Core kit«	Termo Fisher Scientific
komplet za fluorometrično merjenje koncentracije DNA »Qubit 1× dsDNA HS assay kit«	Termo Fisher Scientific

4.2 APARATURE

centrifuga »Centrifuge 5430«	Eppendorf
elektroforezna kadička z napajalnikom Powerpac 300	BIO-RAD
UV-preslikovalnik gelov »GeneGenious (Bio Imaging Systems)«	Syngene
robot za avtomatsko izolacijo DNA »King Fisher Flex«	Termo Fisher Scientific
fluorometer »Qubit 3.0«	Invitrogen
vrtnični stresalnik »MS1 Minishaker«	IKA
ciklični pomnoževalnik PCR »ProFlex PCR System«	Termo Fisher Scientific

4.3 METODA ERIC-PCR

Sestavo reakcijske mešanice PCR smo povzeli po Genersch in Otten (2003).

Reakcijska mešanica (25 μ l) je vsebovala:

- 6,5 μ l H₂O;
- 12,5 μ l mešanice Multiplex Master mix (Qiagen);
- 0,5 μ l vodilnega začetnega oligonukleotida ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3');
- 0,5 μ l povratnega začetnega oligonukleotida ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3');
- 5 μ l izolirane DNA.

Pomnoževanje DNA je potekalo v cikličnem pomnoževalniku »ProFlex PCR System« (Thermo Fisher Scientific) pri naslednjih razmerah:

- začetna aktivacija DNA-polimeraze in denaturacija DNA: 15 min, 95 °C;
- pomnoževanje (35 ciklov): denaturacija (1 min, 94 °C), prileganje začetnih oligonukleotidov (1 min, 53 °C), elongacija (2,5 min, 72 °C);
- zaključna elongacija: 10 min, 72 °C.

Pomnožke ERIC-PCR smo ločili s kapilarno elektroforezo QIAxcel (Qiagen) in kompletom »QIAxcel DNA High Resolution kit« (Qiagen).

4.4 ROČNA IZOLACIJA DNA (komplet »DNeasy Blood & Tissue kit«)

Genomsko DNA iz izolatov bakterije *P. larvae* smo ročno izolirali s kompletom »DNeasy Blood & Tissue kit« (Qiagen; Hilden, Nemčija) po protokolu za po Gramu pozitivne bakterije, ki smo ga povzeli po proizvajalčevih navodilih (Qiagen). Komplet temelji na izolaciji DNA s kolonami, ki imajo silikatno membrano, na katero se veže DNA. Tri dni pred izolacijo DNA smo izolate *P. larvae* namnožili tako, da smo čisto kulturo presadili na krvni agar in inkubirali 72 h pri 37 °C. Za lizo bakterij smo v 2-ml mikrocentrifugirko odpipetirali 180 μ l pufra »Enzymatic lysis buffer« (ELB) z dodatnim lizocimom, in v njem suspendirali polno 10- μ l cepilno zanko tridnevne kulture iz trdnega gojišča (krvni agar). Lizat smo inkubirali 30 min pri 37 °C in 300 vrt./min v termobloku. Za razgradnjo beljakovin smo vzorcu dodali 25 μ l proteinaze K in 200 μ l pufra AL. Vzorec smo nato inkubirali v termobloku 30 min pri 56 °C in

300 vrt./min. Za razgradnjo RNA smo vzorcu dodali 4 μ l RNaze (100 mg/ml), nato 5 s mešali na vrtničnem mešalniku. Sledila je 15-minutna inkubacija vzorca pri sobni temperaturi. Za vezavo DNA na silikatno membrano smo dodali 200 μ l etanola (96–100 %) in za 5 s premešali na vrtničnem stresalniku. Vzorec smo prenesli na kolono »DNeasy Mini spin column« v zbiralni epruveti. Po enominutnem centrifugiranju pri 6000 g smo kolono prenesli v novo zbiralno epruveto. Sledili sta dve spiranji za odstranitev nečistoč. Za prvo spiranje smo v kolono odpipetirali 500 μ l pufra AW1, centrifugirali 1 min pri 6000 g in kolono ponovno prenesli v novo zbiralno epruveto. Za drugo spiranje smo v kolono odpipetirali 500 μ l pufra AW2 in centrifugirali 3 min pri 16000 g. Kolono smo nato prenesli v novo zbiralno epruveto, centrifugirali 1 min pri 16000 g in kolono prenesli v 1,5-ml mikrocentrifugirko. Za elucijo DNA (izpiranje DNA s kolone) smo na silikatno membrano kolone z vezano DNA odpipetirali 200 μ l elucijskega pufra AE, inkubirali 3 min pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 min pri 16000 g.

4.5 AVTOMATSKA IZOLACIJA DNA (komplet »MagMax Core kit«)

Genomsko DNA smo izolirali tudi s kompletom »MagMax Core kit« (avtomatska izolacija) po protokolu za razgradnjo beljakovin (»Digestion workflow«), povzetem po proizvajalčevih navodilih (Thermo Fisher Scientific). Suspenzijo bakterij smo pripravili, kot je opisano v odstavku 2.3.1. Predhodno smo pripravili raztopino pufra za lizo in vezavo DNA (Lysis/Binding solution) ter raztopine proteinaze K in raztopine PK. Za razgradnjo beljakovin smo suspenziji bakterij dodali 100 μ l raztopine PK in vzorec inkubirali v termobloku 30 min pri 55 °C in 300 vrt./min. Po inkubaciji smo k magnetnim kroglicam za vezavo DNA dodali vzorec in pripravili vse potrebne mikrotitrne plošče za avtomatsko izolacijo DNA z aparaturo »KingFisher Flex System« (Thermo Fisher Scientific), protokol »MagMAX_CORE_Flex.bdz«. Omenjena aparatura omogoča avtomatsko izolacijo DNA do 96 vzorcev hkrati in temelji na vezavi DNA na magnetne kroglice.

4.6 FLUOROMETRIČNO MERJENJE KONCENTRACIJE DNA

Koncentracijo izolirane DNA smo določili s fluorometrom Qubit 3.0 (slika 6) (Thermo Fisher Scientific) in kompletom »Qubit 1× dsDNA HS assay kit« po navodilih proizvajalca. Umeritvene raztopine smo pripravili z mešanjem 190 μ l delovne raztopine in 10 μ l založnih standardnih raztopin DNA 1 in 2 (Quant-iT™ dsDNA HS standard #1 s koncentracijo 0 ng/ μ l in #2 s koncentracijo 10 ng/ μ l). Za merjenje vzorcev smo k 198 μ l delovne raztopine dodali 2 μ l izolirane DNA.

4.7 SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE ČISTOSTI DNA

Za določanje čistosti izolirane DNA smo v kiveto Eppendorf odpipetirali 100 μ L izolirane DNA, ki smo jo predhodno redčili z vodo v razmerju 1 : 2. Vrednosti A_{230} , A_{260} in A_{280} smo izmerili s spektrofotometrom BioPhotometer (Eppendorf).

5 REZULTATI

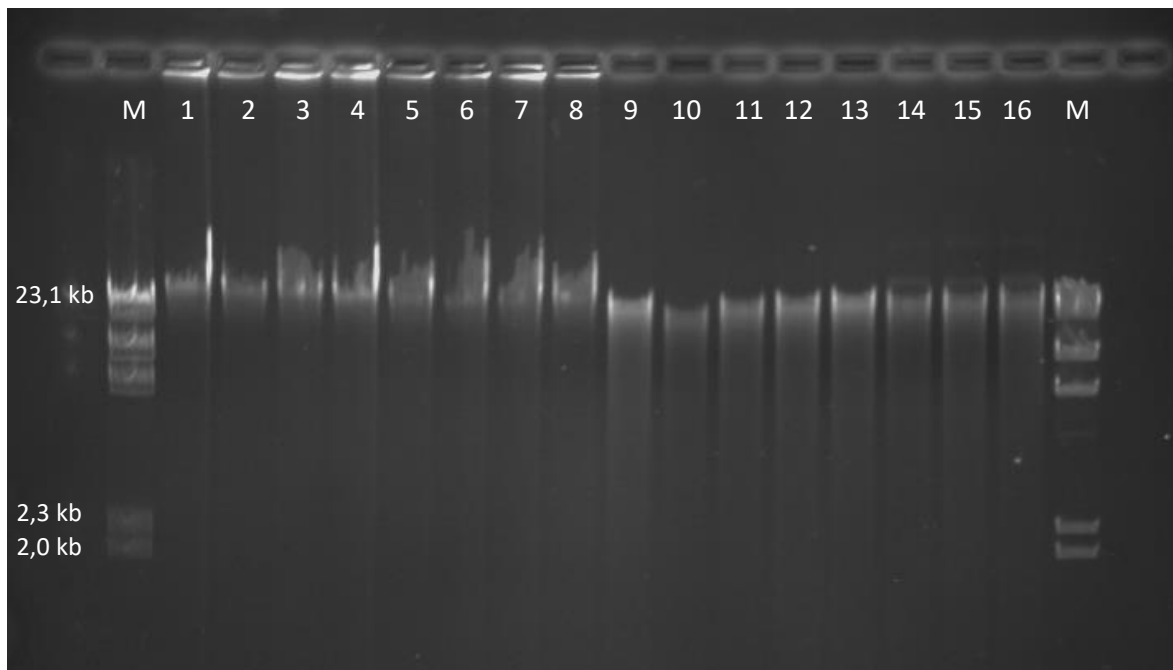
5.1 IZOLACIJA DNA

5.1.1 Merjenje čistosti in koncentracije DNA

Ročno izolirana DNA (z uporabo kompleta »DNeasy Blood & Tissue kit«) je ustrezala vrednostim A_{260}/A_{280} med 1,8 in 2,0, iz česar smo sklepali, da je DNA čista. Slabše rezultate smo dobili pri avtomatsko izolirani DNA (z uporabo kompleta »MagMax Core kit«), ki je presegala optimalne vrednosti A_{260}/A_{280} ; DNA torej ni bila čista (preglednica 2). Nečistost je bila razvidna tudi pri elektroforezni ločitvi genomske DNA izolatov v 0,8-odstotnem agaroznem gelu, kjer je avtomatsko izolirana DNA potovala počasneje (ni oblikovala jasnega pasu). Poleg tega so jamice svetile, kar kaže na prisotnost nečistoč (slika 8). Pri avtomatsko izolirani DNA smo opazili oranžno obarvanje izolirane DNA, ki je prav tako nakazovalo na prisotnost nečistoč oz. barvil (podatki niso prikazani). Izplen DNA pri izolaciji DNA je bil dober ($> 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) pri obeh metodah izolacije (preglednica 2).

Preglednica 2: Čistost in koncentracija DNA pri ročno in avtomatsko izolirani DNA. Čistost smo določili spektrofotometrično (BioSpectrometer), medtem ko smo koncentracijo določili fluorometrično (Qubit 3.0).

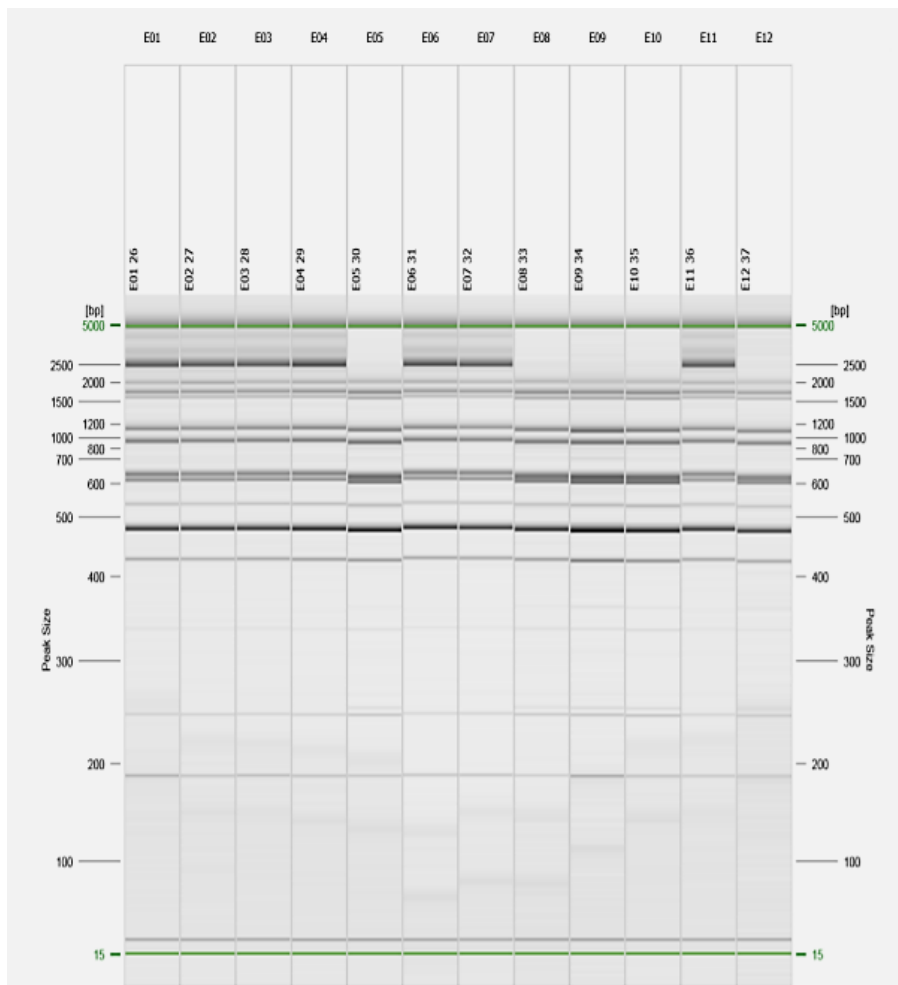
Ime izolata	Komplet za izolacijo DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Koncentracija DNA [ng/ μL]
PL35	Blood & Tissue kit (Qiagen)	1,80	2,17	32,4
PL5	MagMax Core kit (Thermo Fisher Scientific)	1,21	1,21	58,6



Slika 8: Genomska DNA izolatov bakterije *P. larvae* po elektroforezni ločitvi v 0,8-odstotnem agaroznem gelu. Stolpci 1–8: avtomatsko izoliran DNA; stolpci 9–16: ročno izolirana DNA, stolpca M sta označevalca velikosti DNA »Lambda DNA/HindIII Marker«.

5.2 ZASTOPANOST TIPOV ERIC

Preiskovani izolati so pripadali tipoma ERIC I in II, ki sta se jasno ločila v pasu ~2800 bp; ta je bil prisoten pri ERIC II, ne pa pri tipu ERIC I (slika 7). Izmed preiskovanih 51 izolatov je devet (17,6 %) izolatov pripadalo tipu ERIC I in 42 (82,4 %) izolatov tipu ERIC II (preglednica 1). Iz rezultatov je torej razvidno, da je med preučevanimi izolati močno prevladoval tip ERIC II.



Slika 7: Pomnožki ERIC-PCR, ločeni s kapilarno elektroforezo Qiaxcel (Qiagen). Stolpci E05, E08, E09, E10, E12: tip ERIC I, stolpci E01, E02, E03, E04, E06, E07, E11: tip ERIC II.

Preglednica 1: Seznam izolatov in njihovih pripadajočih podatkov.

Ime izolata	Leto	Matriks	Lastnik	ERIC	Morfotip	Oznaka čebelnjaka
PL40	2017	med	A	II	oranžne	1
PL41	2017	med	A	I	sive hrapave	1
PL1	2017	med	B	II	sive gladke	2
PL2	2017	med	B	II	sive gladke	2
PL42	2018	zalega	A	II	NP	3
PL43	2018	zalega	A	II	NP	3
PL44	2018	zalega	A	II	NP	1
PL45	2018	zalega	A	II	NP	1
PL46	2018	zalega	A	II	NP	4
PL7	2018	med	C	II	NP	5
PL8	2018	zalega	C	II	NP	5
PL3	2018	zalega	C	II	NP	5
PL4	2018	zalega	C	II	NP	5
PL5	2018	zalega	C	II	NP	5
PL6	2018	med	C	II	NP	5
PL9	2019	zalega	C	II	NP	5
PL10	2019	zalega	D	II	oranžne	6
PL11	2019	zalega	D	II	oranžne	6
PL12	2019	zalega	E	II	oranžne	7
PL13	2019	zalega	E	II	oranžne	8
PL14	2019	zalega	F	II	oranžne	9
PL15	2019	zalega	F	II	sive gladke	9
PL16	2019	zalega	E	II	sive gladke	10
PL17	2019	zalega	E	II	sive gladke	10
PL18	2019	zalega	K	II	sive gladke	11
PL19	2019	zalega	K	II	prosojne bele hrapave	11
PL20	2019	zalega	B	II	prosojne bele hrapave	2
PL21	2019	zalega	B	II	prosojne bele hrapave	2
PL25	2019	med	G	II	sive gladke	12
PL22	2019	med	D	II	sive gladke	6
PL47	2019	med	A	II	NP	1
PL48	2019	med	A	II	NP	4
PL49	2019	med	A	II	NP	1
PL50	2019	med	A	II	NP	4
PL51	2019	zalega	A	II	sive gladke	4
PL23	2019	med	E	II	sive gladke z oranžnim robom	10
PL24	2019	med	E	II	prosojen bel z oranžnim robom	10
PL26	2019	zalega	H	II	sive hrapave	13
PL27	2019	zalega	H	I	sive hrapave	13
PL28	2019	zalega	G	II	NP	14
PL29	2019	zalega	G	II	NP	14
PL30	2019	zalega	I	I	NP	15
PL31	2019	zalega	I	I	NP	15
PL32	2019	zalega	I	I	NP	16
PL33	2019	zalega	I	II	NP	16
PL34	2019	zalega	J	I	NP	17
PL35	2019	zalega	J	I	NP	17
PL36	2019	zalega	I	I	NP	16
PL37	2019	zalega	I	I	NP	16
PL38	2019	zalega	G	II	NP	18
PL39	2019	zalega	G	II	NP	18

NP, ni podatka.

5.3 POVEZAVA MED TIPOM ERIC IN MORFOTIPOM

Od 51 izolatov smo 23 izolatov določili morfotip. Med 21 izolati tipa ERIC II je šest izolatov tvorilo oranžne kolonije, devet izolatov sive gladke kolonije, trije izolati prosojno bele hrapave kolonije, en izolat sive hrapave kolonije, en izolat prosojno bele kolonije z oranžnim robom in en izolat sive gladke kolonije z oranžnim robom. Oba izolata tipa ERIC I sta tvorila hrapave sive kolonije (preglednica 1).

6 RAZPRAVA

6.1 ZASTOPANOST TIPOV ERIC

Povzročitelj hude gnilobe, bakterija *P. larvae*, je razširjen po vseh kontinentih. Do danes je za omenjenega povzročitelja opisanih pet tipov ERIC (ERIC I–V). Ta raziskava je prva na področju ugotavljanja zastopanosti tipov ERIC v Sloveniji. Med izolati iz Slovenije smo ugotovili prisotnost tipov ERIC I in II, pri čemer je tip ERIC II močno prevladoval (82,4 %).

Čeprav sta tipa ERIC I in II splošno razširjena po vseh evropskih državah, naše ugotovitve kažejo, da je njuna zastopanost drugačna kot zastopanost v sosednjih državah, npr. v severni Italiji, kjer prevladuje tip ERIC I (Bassi in sod., 2014).

Sprva so domnevali, da je tip ERIC II omejen na Evropo; najprej so ga opisali v Nemčiji in Avstriji (Genersch, 2010). Naknadno so ugotovili, da je ERIC II veliko bolj razširjen, saj je prisoten tudi v Aziji, Severni Ameriki in Avstraliji. Tipa ERIC I in II so ugotovili tudi na Japonskem (Hirai in sod., 2016). V evropskih državah zahodno od Nemčije niso ugotovili tipa ERIC II, za kar bi lahko bilo odgovorno majhno število preiskanih izolatov. Ugotovili so tudi, da je tip ERIC II prisoten v Nemčiji na območjih, ki mejijo na Francijo in Belgijo, kar bi lahko nakazovalo na njegovo prisotnost v sosednjih državah (Morrissey in sod., 2015).

Zastopanost tipov ERIC so raziskovali tudi v Italiji, kjer so ugotovili tipa ERIC I in ERIC II. Ob pregledu podatkov severne in srednje Italije so ugotovili, da je v severni Italiji največ izbruhov povzročil tip ERIC I (78,6 %), sledil mu je tip ERIC II (18,6 %), ostali so bili istočasno okuženi z obema tipoma (ERIC I in II) (2,6 %) (Bassi in sod., 2014). V srednji Italiji so ugotovili le izbruhe, ki jih je povzročil tip ERIC I. Tip ERIC II so ugotovili le v severni Italiji (Bassi in

sod., 2014). Tipa ERIC III in IV v zadnjih letih nista bila izolirana; gre namreč za tipa, ki se zaradi svoje visoke virulence verjetno nista uspela obdržati v čebelji populaciji (Hirai in sod., 2016; Rauch in sod., 2009).

Pomanjkljivost opisane raziskave je, da smo zastopanost določali le pri izolatih iz dveh slovenskih regij (osrednjeslovenske in pomurske), in to v omejenem časovnem obdobju dveh let. Rezultati zastopanosti tipov ERIC so lahko zavajajoči tudi, če je zastopanost določena na podlagi izbruhov bolezni, kar lahko poveča zastopanost določenega tipa na račun enega seva, ki je povzročil izbruh. Za potrditev izbruhov bi bila potrebna tipizacija izolatov z metodo z večjo močjo razlikovanja, npr. metodo sekvenciranja celotnih genomov (WGS).

6.2 POVEZAVA MED TIPOM ERIC IN MORFOTIPOM

Znana je povezava tipa ERIC z morfotipom kolonij bakterije *P. larvae*. Tip ERIC I tvori belkasto-sive kolonije neravnih robov, medtem ko tip ERIC II tvori kolonije z gladko površino, ravnim robom in oranžnim obarvanjem (pigmentacijo); ta se lahko pojavi bodisi le na robovih, v centru ali delu kolonij (Genersch in sod., 2006; Bassi in sod., 2015).

Naši rezultati (preglednica 1) se po večini ujemajo z zgoraj omenjeno literaturo, saj smo med izolati tipa ERIC II ugotovili naslednje morfotipe: sive gladke, sive gladke z oranžnim robom, prosojne bele z oranžnim robom, oranžne, prosojne bele hrapave. Nepigmentirane kolonije tipa ERIC II so lahko posledica majhnega števila presajanj (pasaž) kolonij; znano je namreč, da se lahko kolonije tipa ERIC II obarvajo šele po več pasažah (Bassi in sod., 2015). V nasprotju z opisi iz literature je prosojen bel hrapav morfotip, ki smo ga ugotovili pri enem izolatu ERIC II, in siv hrapav morfotip, ki smo ga ugotovili pri treh izolatih ERIC II; hrapav morfotip je namreč značilen za tip ERIC I (Hirai in sod., 2016). Opisan morfotip za tip ERIC I je ustrezen, saj je hrapav siv.

6.3 IZOLACIJA DNA

V tej raziskavi smo primerjali uspešnost izolacije DNA z dvema metodama, in sicer ročno izolacijo DNA (komplet »DNeasy Blood & Tissue kit«) in avtomatsko izolacijo DNA (komplet »MagMax Core kit«). Metodi sta bili različno uspešni: DNA pri ročni izolaciji je bila bolj čista in je ustrezala optimalni vrednosti A_{260}/A_{280} (1,8–2,0), za razliko od mehanske izolacije, ki je

vodila do manj čiste DNA. Nečistost DNA pri mehanski izolaciji je bila jasno vidna tudi po oranžnem obarvanju DNA in potovanju DNA v agaroznem gelu, na katerem je bilo razvidno, da je DNA potovala počasneje in ni oblikovala jasnega pasu (je zastajala v gelu). Hkrati so jamice gela svetile, kar kaže na prisotnost nečistoč. DNA, ki ne vsebuje nečistoč, je ključnega pomena za nadaljnje molekularne preiskave; zlasti občutljivo za nečistoče je sekvenciranje celotnih genomov (WGS). Avtomatsko izolacijo DNA bi bilo za tipizacijo z metodo WGS potrebno dodatno optimizirati, da bi pridobili DNA primerne kakovosti. Po drugi strani metoda ERIC-PCR ni zelo občutljiva za nečistoče (inhibitorje PCR), kar smo dokazali z uspešnim pomnoževanjem z metodo ERIC-PCR, pri kateri smo kot vhodno DNA uporabili avtomatsko izolirano DNA.

7 ZAKLJUČEK

Zastopanost tipov ERIC bakterije *P. larvae* v Evropi in v svetu je slabo poznana. Poleg tega zastopanost tipov ERIC v Sloveniji do danes še ni bila opisana. V tej raziskavi smo ugotovili dva tipa ERIC (I in II), med katerima je tip ERIC II močno prevladoval (82,4 %). Naše ugotovitve predstavljajo pomembno osnovo za prihodnje raziskave o zastopanosti tipov ERIC v Sloveniji. Da bi izboljšali razlikovanje med izolati bakterije *P. larvae* znotraj istega tipa ERIC in opredelili morebitne izbruhe, bi morale prihodnje raziskave vključevati tipizacijsko metodo z večjo močjo razlikovanja, npr. sekvenciranje celotnih genomov. Za slednjo je bila primernejša ročno izolirana DNA, ki je izkazovala večjo kakovost v primerjavi z avtomatsko izolirano DNA.

8 LITERATURA

Ågren J, Schäfer MO, Forsgren E. Using whole genome sequencing to study American foulbrood epidemiology in honeybees. *PLoS One* 2017; 12: e0187924, DOI: 10.1371/journal.pone.0187924.

ARRS. Ugotavljanje poti širjenja hude gnilobe čebelje zalege z genetsko tipizacijo sevov povzročitelja bolezni. V4-1804. 2020. <https://www.vf.uni-lj.si/podrocje/ugotavljanje-poti-sirjenja-hude-gnilobe-cebelje-zalege-z-genetsko-tipizacijo-sevov>

Bassi S, Formato G, Milito M, Trevisiol K, Salogni C, Carra E. Phenotypic characterization and ERIC-PCR based genotyping of *Paenibacillus larvae* isolates recovered from American foulbrood outbreaks in honey bees from Italy. *Vet. Q.* 2015; 35: 27–32.

Beims H, Bunk B, Erler S, Mohr KI, Spröer C, Pradella S, Günther G, Rohde M, von der Ohe W, Steinert M. Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *Int. J. Med. Microbiol.* 2020: 151394. 11 str.

ČZS (Čebelarska zveza Slovenije). Kataster čebelje paše in aplikacija GERK. Čebelarska zveza Slovenije. URL: http://www.czs.si/objave_podrobno_czs/10525. 2019. Datum dostopa: 26. 2. 2020.

ČZS (Čebelarska zveza Slovenije). Kataster čebelje paše in aplikacija GERK. Čebelarska zveza Slovenije. [http://www.czs.si/Upload/5%20\(11\).jpg](http://www.czs.si/Upload/5%20(11).jpg). 2020. Datum dostopa: 29. 2. 2020.

Dell'Anno A, Fabiano M, Duineveld GCA, Kok A, Danovaro R. Nucleic acid (DNA, RNA) quantification and RNA/DNA ratio determination in marine sediments: comparison of spectrophotometric, fluorometric, and high-performance liquid chromatography methods and estimation of detrital DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 3238–3245.

Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56: 501–511.

Genersch E, Otten C. The use of repetitive element PCR finger-printing (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie. Int. J. Med. Microbiol.* 2003; 34: 195–206.

Genersch E. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2010; 103 (suppl. 1): S10–S19.

Hirai Y, Suzuki T, Inaba N, Minoguchi N, Takamatsu D. Existence of *Paenibacillus larvae* genotypes ERIC I-ST2, ERIC I-ST15 and ERIC II-ST10 in the western region of Aichi prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2016; 78(7): 1195–1199.

Hirai Y, Suzuki T, Inaba N, Minoguchi N, Takamatsu D. Existence of *Paenibacillus larvae* genotypes ERIC I-ST2, ERIC I-ST15 and ERIC II-ST10 in the western region of Aichi prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2016; 78(7): 1195–1199.

Javni pregledovalnik grafičnih podatkov MKGP. <http://rkg.gov.si/GERK/WebView/>. 2020. Datum dostopa: 29. 2. 2020.

Koetsier G, Cantor E. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. New England Biolabs. 2019. https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?la=en&rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc. Datum dostopa: 4. 3. 2020.

Morrissey BJ, Helgason T, Poppinga L, Fünfhaus A, Genersch E, Budge GE. Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environ. Microbiol. Rep.* 2015; 17: 1414–1424.

News Medical Life Science. Qubit™ 3.0 Fluorometer from Thermo Scientific. <https://www.news-medical.net/image.axd?picture=2017%2f1%2fsho-qubit-instrument.jpg>. 2020. Datum dostopa: 29. 2. 2020.

Poppinga L, Genersch E. Molecular pathogenesis of American foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae. *Curr Opin Insect Sci.* 2015; 10: 29–36.

MKGP (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano). Pravilnik o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege (*Pestis apium*). Ur List RS, št. 10/20 (<http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV13788>). Datum dostopa: 4. 3. 2020.

Rauch S, Ashiralieva A, Hedtke K, Genersch E. Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological Agent of American Foulbrood of Honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(10): 3344–3347.

Thermo Fisher Scientific. Components of the reaction mixture. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html>. 2020. Datum dostopa: 4. 3. 2020.

Texas Apiary Inspection Service. <https://txbeeinspection.tamu.edu/american-foulbrood/>. 2020. Datum dostopa: 4. 3. 2020.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 1991; 19(24): 6823–6831.

Wikipedia. PCR – verižna reakcija s polimerazo. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/96/Polymerase_chain_reaction.svg. 2020. Datum dostopa: 29. 2. 2020.

Wilson AL, Sharp PM. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. *Mol. Biol. Evol.* 2006; 23(6): 1156–1168.

Žgur Bertok D, Starčič Erjavec M. 2009. Teoretične osnove in navodila za vaje pri predmetu mikrobna genetika. 146 str.

ZAHVALA

Hvala mentorju Andreju Gregorčiču za pregled in popravke raziskovalne naloge ter mentorstvo. Velika zahvala gre somentoricama Majdi Golob in Darji Kušar, ki sta mi omogočili opravljanje raziskovalnega dela na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo VF. Posebna zahvala gre mojemu bratu, Bojanu Papiću, za pomoč, nasvete, smernice in razlage. Zelo sem srečna, ker mu ni bilo nikoli odveč odgovoriti na moja vprašanja ali priskočiti na pomoč. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na omenjenem inštitutu, ki so mi kakor koli pomagali pri izvedbi laboratorijskega dela.