

Univerza v Ljubljani  
*Veterinarska* fakulteta



Alenka Žugelj

**EPIDEMIOLOŠKE IN KLINIČNE ZNAČILNOSTI  
HUDE GNILOBE ČEBELJE ZALEGE V POVEZAVI Z  
GENOTIPOM *Paenibacillus larvae***

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2022

Univerza v Ljubljani  
*Veterinarska* fakulteta



UDK 638.154:579.852:57.083.1:57.088.7:577.21:575.22(043.3)

Alenka Žugelj, dr. vet. med.

**EPIDEMIOLOŠKE IN KLINIČNE ZNAČILNOSTI HUDE  
GNILOBE ČEBELJE ZALEGE V POVEZAVI Z GENOTIPOM  
*Paenibacillus larvae***

Doktorska disertacija

**EPIDEMIOLOGICAL AND CLINICAL CHARACTERISTICS  
OF AMERICAN FOULBROOD IN CONNECTION WITH  
*Paenibacillus larvae* GENOTYPE**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2022

Alenka Žugelj

Epidemiološke in klinične značilnosti hude gnilobe čebelje zalege v povezavi z genotipom  
*Paenibacillus larvae*

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete,  
Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana in na Nacionalnem veterinarskem inštitutu Enota Maribor – Ptuj,  
Šentiljska cesta 109, 2000 Maribor

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentorica: izr. prof. dr. Irena Zdovc

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. V času raziskave sem bila članica projektne skupine v raziskovalnem projektu V4-1804, v okviru katerega je potekal del naših raziskav. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Vlasta Jenčič

Član: zn. svetnik dr. Matjaž Ocepek

Član: prof. dr. Aleš Gregorc

## IZVLEČEK

Ključne besede: Bolezni živali; čebele – mikrobiologija; *Paenibacillus larvae* – diagnostika – izolacija in čiščenje – genetika; genotipizacija; sekvenciranje celotnega genoma – metode; verižna reakcija s polimerazo – metode; masna spektrometrija; ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem časa preleta ionov – metode.

*Paenibacillus larvae* je po Gramu pozitivna sporogena bakterija, ki povzroča hudo gnilobo čebelje zalege (HGČZ). Poznanih je pet genotipov ERIC, ki se med seboj razlikujejo tudi fenotipsko. Izolate *P. larvae* smo izolirali ob izbruhih bolezni v Sloveniji v letih 2017 – 2019. Skupaj z izolati smo pridobili tudi pripadajoče epidemiološke podatke. Za identifikacijo izolatov *P. larvae* smo validirali metodo masne spektrometrije MALDI TOF in s tem pohitrili in pocenili bakteriološko preiskavo. Kolonije *P. larvae* so na gojiščih rasle v obliki dveh osnovnih morfotipov. Ugotovili smo, da genotip ERIC I fenotipsko večinoma izraža morfotip I – sive hrapave kolonije, genotip ERIC II pa izraža morfotip II – gladke sive ali pigmentirane kolonije. Z metodo ERIC-PCR smo prvič tipizirali in ugotovili pojavnost genotipov ERIC v Sloveniji. Prevladoval je genotip ERIC II (70,2 %). Pri nekaterih izolatih genotipa ERIC I smo ugotovili nekoliko spremenjen profil pomnožkov ERIC, zato smo 59 izbranim izolatom genotipa ERIC I sekvencirali tudi celotne genome (WGS). Kljub odstopanju od klasičnega profila ERIC I, smo po tipizaciji z metodo WGS *in silico* MLST pri vseh izolatih ugotovili isti sekvenčni tip ST2. Ko smo z metodo wgMLST primerjali zaporedja lokusov v celotnih genomih z zaporedji, dostopnimi v javnih podatkovnih zbirkah, so se vsi naši izolati filogenetsko razvrstili v klad ERIC I in gručo ERIC I-ST2. Z molekularnimi in fenotipskimi metodami smo potrdili prisotnost različnih morfotipov in genotipov *P. larvae* v enem kužnem krogu, celo v istem čebelnjaku. Rezultati anketnega vprašalnika so statistično potrdili značilne klinične znake za genotipa ERIC I in II, kljub številnim drugim naključnim dejavnikom, ki lahko vplivajo na izražanje klinične slike HGČZ, in jih v naši raziskavi nismo spremljali. V celotnih genomih izolatov *P. larvae* smo ugotovili prisotnost gruč genov za sintezo inhibitornih substanc. Z disk difuzijsko metodo smo ugotovili, da posamezni sevi genotipa ERIC I izločajo protimikrobne snovi, ki inhibirajo rast nekaterih po Gramu pozitivnih bakterij in kvasovke *Malassezia pachydermatis*. Vpeljane diagnostične metode in rezultati raziskave predstavljajo pomemben doprinos k razumevanju genetske raznolikosti povzročitelja *P. larvae* in proučevanju načinov širjenja HGČZ.

**ABSTRACT**

**Keywords:** Animal diseases; bees – microbiology; *Paenibacillus larvae* – diagnosis – isolation and purification – genetics; genotyping; whole genome sequencing – methods; polymerase chain reaction – methods; spectrometry, mass; matrix-assisted laser desorption ionization – methods.

*Paenibacillus larvae* is a Gram-positive sporogenic bacterium that causes American Foulbrood (AFB). Five ERIC genotypes are described, which also differ phenotypically. In 2017–2019, *P. larvae* isolates were obtained during AFB outbreaks in Slovenia. Together with the isolates, we also obtained the corresponding epidemiological data. For the determination of *P. larvae* by bacteriological examination, we validated the MALDI TOF mass spectrometry method, thus speeding up and reducing the cost of the investigation. Two morphotypes of *P. larvae* colonies were observed. We found that the ERIC I genotype phenotypically mostly shows one morphotype – gray rough colonies, and the ERIC II genotype another – gray smooth or pigmented colonies. For the first time, ERIC-PCR was used for *P. larvae* typing in Slovenia and the frequency of ERIC genotypes could be determined. ERIC II was the predominant genotype (70,2 %). Some ERIC I isolates exhibited a slightly altered ERIC I banding pattern, thus 59 isolates were selected for the whole-genome sequencing (WGS). Despite showing non-classical ERIC I pattern, WGS-typing using the *in silico* MLST revealed that all of the investigated isolates belonged to the sequence type ST2. When comparing the whole-genome loci using the wgMLST analysis of the investigated isolates supplemented with all the publicly available *P. larvae* genomes, all Slovenian isolates fell within the ERIC I clade and phylogenetically clustered with the remaining ERIC I-ST2 genomes. Using molecular and phenotypic methods, we confirmed the presence of different morphotypes and genotypes of *P. larvae* in the same AFB zone or even in the same apiary. Results of the questionnaire statistically confirmed the presence of clinical signs characteristic for genotypes ERIC I and II, despite many other random factors that may affect the expression of AFB clinical picture and were not monitored in the scope of our study. In the genomes of *P. larvae* isolates, we identified the presence of gene clusters for the synthesis of inhibitory substances. Using the diffusion method, the ability to inhibit the growth of some Gram-positive bacteria and the yeast *Malassezia pachydermatis* was identified for individual ERIC I strains. The implemented diagnostic methods and study results represent an important contribution to the understanding of *P. larvae* genetic characteristics and AFB transmission routes.

**KAZALO VSEBINE**

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| IZVLEČEK.....                                                    | 4         |
| ABSTRACT .....                                                   | 5         |
| KAZALO SLIK.....                                                 | 10        |
| KAZALO TABEL.....                                                | 13        |
| SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV .....                                | 14        |
| 1 UVOD.....                                                      | 15        |
| <b>1.1 Namen dela .....</b>                                      | <b>16</b> |
| <b>1.2 Hipoteze .....</b>                                        | <b>17</b> |
| 2 PREGLED LITERATURE .....                                       | 18        |
| <b>2.1 Zgodovina bolezni in povzročitelja .....</b>              | <b>18</b> |
| <b>2.2 Lastnosti bakterije <i>Paenibacillus larvae</i> .....</b> | <b>18</b> |
| 2.2.1 Genotipi .....                                             | 18        |
| 2.2.1.1 Rast na gojiščih in morfologija kolonij .....            | 19        |
| 2.2.1.2 Biokemijske značilnosti .....                            | 20        |
| 2.2.1.3 Morfologija spor.....                                    | 20        |
| 2.2.1.4 Virulenca .....                                          | 20        |
| 2.2.2 Virulenčni dejavniki .....                                 | 21        |
| 2.2.2.1 Vloga PICBP49, encima za razgradnjo hitina.....          | 21        |
| 2.2.2.2 Vloga sekundarnih presnovkov .....                       | 21        |
| 2.2.2.3 Sevadicin .....                                          | 22        |
| 2.2.5.4. Penilarvini.....                                        | 23        |
| 2.2.5.5. Penilamicini .....                                      | 23        |
| 2.2.5.6. Bacilibaktin.....                                       | 23        |
| 2.2.5.7. Vloga citotoksinov.....                                 | 24        |
| 2.2.5.8. Vloga površinskega proteina SplA .....                  | 25        |

|            |                                                                                                                  |           |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.3      | Patogeneza .....                                                                                                 | 26        |
| <b>2.3</b> | <b>Klinična slika HGČZ .....</b>                                                                                 | <b>28</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Prenos in širjenje HGČZ .....</b>                                                                             | <b>30</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Epidemiologija .....</b>                                                                                      | <b>30</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Diagnostika in nadzor HGČZ .....</b>                                                                          | <b>31</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIALI IN METODE .....</b>                                                                                 | <b>33</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Vzorčenje in zbiranje izolatov <i>P. larvae</i> z epidemiološkimi podatki.....</b>                            | <b>33</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Priprava anketnega vprašalnika in obdelava podatkov.....</b>                                                  | <b>34</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Statistična obdelava podatkov .....</b>                                                                       | <b>34</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Bakteriološka preiskava spremenjene zalege in medu na <i>P. larvae</i> .....</b>                              | <b>35</b> |
| 3.4.1      | Bakteriološka preiskava spremenjene zalege .....                                                                 | 35        |
| 3.4.2      | Bakteriološka preiskava medu.....                                                                                | 35        |
| <b>3.5</b> | <b>Identifikacija izolatov <i>P. larvae</i> .....</b>                                                            | <b>35</b> |
| 3.5.1      | Identifikacije izolatov <i>P. larvae</i> s Plagemannovim testom .....                                            | 36        |
| 3.5.2      | Identifikacija izolatov <i>P. larvae</i> z masno spektrometrijo MALDI-TOF.....                                   | 36        |
| <b>3.6</b> | <b>Shranjevanje izolatov <i>P. larvae</i> po identifikaciji.....</b>                                             | <b>37</b> |
| <b>3.7</b> | <b>Tipizacija izolatov <i>P. larvae</i> z metodo ERIC .....</b>                                                  | <b>37</b> |
| 3.7.1      | Izbor izolatov za tipizacijo ERIC .....                                                                          | 37        |
| 3.7.2      | Izolacija DNA iz bakterijskih kultur <i>P. larvae</i> za tipizacijo z metodo ERIC ....                           | 37        |
| 3.7.3      | Tipizacija izolatov <i>P. larvae</i> z metodo ERIC-PCR.....                                                      | 38        |
| <b>3.8</b> | <b>Tipizacija izolatov <i>P. larvae</i> z metodo WGS.....</b>                                                    | <b>38</b> |
| 3.8.1      | Nabor izolatov <i>P. larvae</i> za WGS .....                                                                     | 38        |
| 3.8.2      | Izolacija DNA iz bakterijskih kultur <i>P. larvae</i> za tipizacijo WGS in izvedba WGS                           | 38        |
| <b>3.9</b> | <b>Ugotavljanje inhibitornih snovi <i>P. larvae</i> z neposrednim nasajanjem dveh kultur na krvni agar .....</b> | <b>38</b> |

|             |                                                                                                                                 |           |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.10</b> | <b>Izolacija inhibitornih snovi <i>P. larvae</i>.....</b>                                                                       | <b>39</b> |
| 3.10.1      | Kultivacija <i>P. larvae</i> za izolacijo inhibitornih snovi.....                                                               | 39        |
| 3.10.2      | Pregled filtrata <i>P. larvae</i> .....                                                                                         | 40        |
| <b>3.11</b> | <b>Testiranje inhibitorne učinkovitosti <i>P. larvae</i> .....</b>                                                              | <b>40</b> |
| 3.11.1      | Difuzijska metoda s papirnatimi diski .....                                                                                     | 41        |
| 3.11.2      | Difuzijska metoda z luknjicami .....                                                                                            | 41        |
| <b>4</b>    | <b>REZULTATI .....</b>                                                                                                          | <b>42</b> |
| <b>4.1</b>  | <b>Tipizacija z metodo ERIC .....</b>                                                                                           | <b>42</b> |
| <b>4.2</b>  | <b>Tipizacija izolatov <i>P. larvae</i> z metodo WGS.....</b>                                                                   | <b>44</b> |
| <b>4.3</b>  | <b>Morfotipi kolonij <i>P. larvae</i> .....</b>                                                                                 | <b>49</b> |
| <b>4.4</b>  | <b>Primerjava morfotipov kolonij in pripadajočih genotipov ERIC.....</b>                                                        | <b>49</b> |
| <b>4.5</b>  | <b>Razlike pri izolaciji <i>P. larvae</i> iz spremenjene zalege in iz medu.....</b>                                             | <b>53</b> |
| 4.5.1       | Ugotavljanje akutnosti procesa v panju na podlagi mikroskopskega pregleda brisa zalege pred nasajanjem in rast na gojiščih..... | 53        |
| 4.5.2       | Izolacija <i>P. larvae</i> iz medu .....                                                                                        | 55        |
| <b>4.6</b>  | <b>Rezultati anketnega vprašalnika .....</b>                                                                                    | <b>55</b> |
| 4.6.1       | Odgovori čebelarjev v anketnem vprašalniku .....                                                                                | 55        |
| 4.6.2       | Odgovori veterinarjev ZVČ glede ugotavljanja kliničnih znakov in razmer na čebelarstvu.....                                     | 57        |
| <b>4.7</b>  | <b>Ugotavljanje con inhibicije rasti pri izolaciji <i>P. larvae</i> iz medu .....</b>                                           | <b>61</b> |
| <b>4.8</b>  | <b>Ugotavljanje inhibitornih snovi <i>P. larvae</i> z neposrednim nasajanjem dveh kultur na krvni agar .....</b>                | <b>63</b> |
| <b>4.9</b>  | <b>Difuzijska metoda ugotavljanja protimikrobnih snovi iz supernatanta <i>P. larvae</i> .....</b>                               | <b>64</b> |
| <b>4.10</b> | <b>Ugotavljanje genov za sintezo inhibitornih snovi .....</b>                                                                   | <b>68</b> |
| <b>5</b>    | <b>RAZPRAVA.....</b>                                                                                                            | <b>70</b> |
| <b>5.1</b>  | <b>Potrjevanje <i>P. larvae</i> z metodo MALDI TOF .....</b>                                                                    | <b>70</b> |



---

|            |                                                                 |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.2</b> | <b>Genotipi bakterije <i>P. larvae</i> v Sloveniji .....</b>    | <b>71</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Sekvenciranje celotnih genomov <i>P. larvae</i>.....</b>     | <b>72</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Primerjava fenotipov in genotipov <i>P. larvae</i> .....</b> | <b>73</b> |
| <b>5.5</b> | <b>Pomen epidemioloških podatkov .....</b>                      | <b>75</b> |
| <b>5.6</b> | <b>Povezava klinične slike z genotipom ERIC .....</b>           | <b>75</b> |
| <b>5.7</b> | <b>Protimikrobna aktivnost <i>P. larvae</i> .....</b>           | <b>77</b> |
| <b>6</b>   | <b>ZAKLJUČKI .....</b>                                          | <b>80</b> |
| <b>7</b>   | <b>POVZETEK .....</b>                                           | <b>82</b> |
| <b>8</b>   | <b>SUMMARY .....</b>                                            | <b>84</b> |
| <b>9</b>   | <b>ZAHVALE .....</b>                                            | <b>86</b> |
| <b>10</b>  | <b>LITERATURA .....</b>                                         | <b>87</b> |
| <b>11</b>  | <b>PRILOGE .....</b>                                            | <b>93</b> |

**KAZALO SLIK**

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 1:</b> Patogeneza okužb z bakterijo <i>P. larvae</i> genotipov ERIC I in II-----                                   | 28 |
| <b>Figure 1:</b> Pathogenesis of <i>P. larvae</i> ERIC I and II infections-----                                             | 28 |
| <b>Slika 2:</b> Presledkasta zalega in naluknjani pokrovci satnih celic-----                                                | 29 |
| <b>Figure 2:</b> Mottled brood and punctured capping of the cells-----                                                      | 29 |
| <b>Slika 3:</b> Štrleči jeziček-----                                                                                        | 29 |
| <b>Figure 3:</b> Protruded tongue-----                                                                                      | 29 |
| <b>Slika 4:</b> Ugotavljanje inhibitornih snovi <i>P. larvae</i> z neposrednim nasajanjem dveh kultur na krvni agar-----    | 39 |
| <b>Figure 4:</b> Detecting inhibitory substances of <i>P. larvae</i> by direct culturing of two bacteria on blood agar----- | 39 |
| <b>Slika 5:</b> Shematski prikaz izolacije inhibitornih snovi <i>P. larvae</i> -----                                        | 40 |
| <b>Figure 5:</b> Schematic view of <i>P. larvae</i> inhibitory substances isolation-----                                    | 40 |
| <b>Slika 6:</b> Testiranje inhibitorne učinkovitosti <i>P. larvae</i> z difuzijsko metodo-----                              | 41 |
| <b>Figure 6:</b> Testing of inhibitory effectiveness of <i>P. larvae</i> with diffusion method-----                         | 41 |
| <b>Slika 7:</b> Pojavljanje genotipov ERIC v izolatih <i>P. larvae</i> v Sloveniji v letih 2017 – 2019----                  | 42 |
| <b>Figure 7:</b> Occurrence of ERIC genotypes among Slovenian <i>P. larvae</i> isolates in 2017 – 2019-----                 | 42 |
| <b>Slika 8:</b> Pojavljanje genotipov ERIC v vzorcih zalege in medu-----                                                    | 42 |
| <b>Figure 8:</b> Occurrence of ERIC genotypes in brood and honey samples-----                                               | 42 |
| <b>Slika 9:</b> Ugotovljeni genotipi ERIC I v Sloveniji-----                                                                | 43 |
| <b>Figure 9:</b> Detected ERIC I genotypes in Slovenia-----                                                                 | 43 |
| <b>Slika 10:</b> ERIC profili, pridobljeni z ločevanjem pomnožkov DNA s kapilarno elektroforezo--                           | 43 |
| <b>Figure 10:</b> ERIC profiles from capillary electrophoresis-----                                                         | 43 |
| <b>Slika 11:</b> Prevalenca genotipov ERIC v Sloveniji po letih-----                                                        | 44 |
| <b>Figure 11:</b> Annual prevalence of ERIC genotypes in Slovenia-----                                                      | 44 |
| <b>Slika 12:</b> Filogenetsko drevo-----                                                                                    | 45 |
| <b>Figure 12:</b> Phylogenetic tree-----                                                                                    | 45 |
| <b>Slika 13:</b> Minimalno vpeto drevo-----                                                                                 | 46 |
| <b>Figure 13:</b> wgMLST minimum spanning tree-----                                                                         | 46 |
| <b>Slika 14:</b> UPGMA wgMLST drevo-----                                                                                    | 47 |
| <b>Figure 14:</b> UPGMA wgMLST tree-----                                                                                    | 47 |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 15:</b> Geografski (A) in časovni (B) prikaz preiskanih izbruhov HGČZ z <i>P. larvae</i> genotipom ERIC I-ST2 v letih 2017 – 2019----- | 48 |
| <b>Figure 15:</b> Spatial (A) and temporal (B) distribution of investigated outbreak-related ERIC I-ST2 isolates in years 2017 to 2019-----     | 48 |
| <b>Slika 16:</b> Morfotipi <i>P. larvae</i> -----                                                                                               | 49 |
| <b>Figure 16:</b> <i>P. larvae</i> morphotypes-----                                                                                             | 49 |
| <b>Slika 17:</b> Podobne sive hrapave kolonije <i>P. larvae</i> , značilne za genotip ERIC I-----                                               | 50 |
| <b>Figure 17:</b> Similar grey rough colonies of <i>P. larvae</i> , characteristic for ERIC I genotype-----                                     | 50 |
| <b>Slika 18:</b> Ugotovljeni morfolitipi kolonij pri genotipih ERIC I <i>P. larvae</i> -----                                                    | 50 |
| <b>Figure 18:</b> Detected ERIC I morphotypes of <i>P. larvae</i> -----                                                                         | 50 |
| <b>Slika 19:</b> Različne kolonije <i>P. larvae</i> značilne za genotip ERIC II -----                                                           | 51 |
| <b>Figure 19:</b> Various colonies of <i>P. larvae</i> characteristic for ERIC II genotype-----                                                 | 51 |
| <b>Slika 20:</b> Ugotovljeni morfolitipi kolonij pri genotipih ERIC II <i>P. larvae</i> -----                                                   | 51 |
| <b>Figure 20:</b> Detected ERIC II morphotypes of <i>P. larvae</i> -----                                                                        | 51 |
| <b>Slika 21:</b> Primerjava genotipov ERIC z morfolitipi <i>P. larvae</i> -----                                                                 | 52 |
| <b>Figure 21:</b> Comparison of ERIC genotypes and morphotypes <i>P. larvae</i> -----                                                           | 52 |
| <b>Slika 22:</b> Morfolitipi <i>P. larvae</i> po vzorcih iz zalege in medu-----                                                                 | 53 |
| <b>Figure 22:</b> <i>P. larvae</i> morphotypes by samples from brood and honey-----                                                             | 53 |
| <b>Slika 23:</b> Tipična rast <i>P. larvae</i> v čisti kulturi iz vzorcev spremenjene zalege-----                                               | 53 |
| <b>Figure 23:</b> Typical growth of <i>P. larvae</i> from infected brood in pure culture-----                                                   | 53 |
| <b>Slika 24:</b> Izolacija <i>P. larvae</i> iz zalege – akutna okužba-----                                                                      | 54 |
| <b>Figure 24:</b> Isolation of <i>P. larvae</i> from brood – acute infection-----                                                               | 54 |
| <b>Slika 25:</b> Izolacija <i>P. larvae</i> iz zalege – kroničen proces-----                                                                    | 54 |
| <b>Figure 25:</b> Isolation of <i>P. larvae</i> from brood – chronical process-----                                                             | 54 |
| <b>Slika 26:</b> Izolacija <i>P. larvae</i> iz medu-----                                                                                        | 55 |
| <b>Figure 26:</b> Isolation of <i>P. larvae</i> from honey -----                                                                                | 55 |
| <b>Slika 27:</b> Prisotnost tipičnih kliničnih znakov HGČZ v pozitivnih čebelnjakih-----                                                        | 59 |
| <b>Figure 27:</b> Presence of typical clinical signs of AFB in positive apiaries-----                                                           | 59 |
| <b>Slika 28:</b> Vpliv HGČZ na jakost čebelje družine-----                                                                                      | 60 |
| <b>Figure 28:</b> AFB influence on strength of bee colony-----                                                                                  | 60 |
| <b>Slika 29:</b> Vpliv HGČZ na sate-----                                                                                                        | 60 |
| <b>Figure 29:</b> AFB influence on combs-----                                                                                                   | 60 |
| <b>Slika 30:</b> Različne cone inhibicije rasti kontaminantov okrog kolonije <i>P. larvae</i> -----                                             | 61 |

---

**Figure 30:** Different inhibition zones of contaminants growth around the colony *P. larvae* --61

**Slika 31:** Inhibicija rasti bakterije *Paenibacillus lactis*-----62

**Figure 31:** *Paenibacillus lactis* growth inhibition-----62

**Slika 32:** Kontaminanti vzorcev medu-----62

**Figure 32:** Contaminants of honey samples-----62

**Slika 33:** Različne cone inhibicije rasti bakterije *B. subtilis*-----63

**Figure 33:** Different inhibition zones of *B. subtilis*-----63

**Slika 34:** Različne cone inhibicije rasti na širokem pasu *B. subtilis*-----64

**Figure 34:** Different inhibition zones on wide stripe of *B. subtilis*-----64

**Slika 35:** Vpliv metabolita *P. larvae* na bakterijo *S. pseudintermedius*-----66

**Figure 35:** Impact of *P. larvae* supernatant on *S. pseudintermedius*-----66

**Slika 36:** Vpliv metabolita *P. larvae* na proti meticilinu odporen *S. pseudintermedius* (MRSP)-  
-----66

**Figure 36:** Impact of *P. larvae* metabolite on methicillin resistant *S. pseudintermedius* (MRSP)-  
-----66

**Slika 37:** Vpliv metabolita *P. larvae* na kvasovko *M. pachydermatis*-----67

**Figure 37:** Impact of *P. larvae* metabolite on *M. pachydermatis*-----67

**Slika 38:** Vpliv metabolita *P. larvae* na bakterijo *B. subtilis*-----67

**Figure 38:** Impact of *P. larvae* metabolite on *B. subtilis*-----67

**Slika 39:** Vpliv metabolita *P. larvae* na bakterijo *S. aureus*-----68

**Figure 39:** Impact of *P. larvae* metabolite on *S. aureus*-----68

**Slika 40:** Vpliv metabolita *P. larvae* na bakterijo *E. coli*-----68

**Figure 40:** Impact of *P. larvae* metabolite on *E. coli*-----68

---

**KAZALO TABEL**

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Število shranjenih izolatov <i>P. larvae</i> po letih-----                                 | 33 |
| <b>Table 1:</b> The number of saved isolates of <i>P. larvae</i> per year-----                              | 33 |
| <b>Tabela 2:</b> Prevalenca genotipov ERIC v Sloveniji po letih-----                                        | 44 |
| <b>Table 2:</b> Annual prevalence of ERIC genotypes in Slovenia-----                                        | 44 |
| <b>Tabela 3:</b> Prisotnost kliničnih znakov v ... številu čebelnjakov/... % čebelnjakov-----               | 57 |
| <b>Table 3:</b> Presence of clinical signs in...number of apiaries/...% of apiaries-----                    | 57 |
| <b>Tabela 4:</b> Zbrani rezultati ugotavljanja inhibitornih snovi <i>P. larvae</i> z difuzijsko metodo----- | 65 |
| <b>Table 4:</b> Results of detecting inhibitory substances of <i>P. larvae</i> with diffusion method-----   | 65 |

## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

|              |                                                                                                                                         |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AD           | razlike v alelih; angl. <i>allele differences</i>                                                                                       |
| AŽ panj      | Alberti – Žnidersičev panj                                                                                                              |
| BHIA         | gojišče; angl. <i>Brain heart infusion agar</i>                                                                                         |
| bp           | bazni par                                                                                                                               |
| CSA          | gojišče; angl. <i>Columbia sheep-blood agar</i>                                                                                         |
| ERIC         | enterobakterijska ponavljajoča se medgenska ohranjena zaporedja; angl. <i>enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences</i> |
| GTP          | gvanin tri fosfat                                                                                                                       |
| HGČZ         | huda gniloba čebelje zalege; angl. <i>American foulbrood, AFB</i>                                                                       |
| IMP, VF      | Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani                                                         |
| KMG-MID      | enotna in neponovljiva identifikacijska številka čebelarstva                                                                            |
| LPMO         | litične polisaharidne monooksigenaze                                                                                                    |
| MLST         | tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov; angl. <i>multilocus sequence typing</i>                                                     |
| MRSP         | proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>                                                                         |
| MYPGP agar   | gojišče; angl. <i>Mueller-Hinton broth, yeast extract, potassium phosphate, glucose and pyruvate agar</i>                               |
| NRPS         | encim neribosomalna peptidna sintetaza                                                                                                  |
| NVI, VF      | Nacionalni veterinarski inštitut Veterinarske fakultete v Ljubljani                                                                     |
| PLA agar     | gojišče <i>Paenibacillus larvae</i> agar                                                                                                |
| PICBP49      | <i>P. larvae</i> chitin binding protein 49                                                                                              |
| PM           | peritrofna membrana                                                                                                                     |
| PKS          | encim poliketidna sintaza                                                                                                               |
| ST           | sekvenčni tip                                                                                                                           |
| THCIYGP agar | gojišče; angl. <i>tris HCl, yeast extract, glucose, piruvična kislina agar</i>                                                          |
| UVHVVR       | Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin                                                             |
| WGS          | sekvenciranje celotnih genomov; angl. <i>whole-genome sequencing</i>                                                                    |
| wgMLST       | tipizacija celotnega genoma na osnovi zaporedij več lokusov; angl. <i>whole-genome multilocus sequence typing</i>                       |
| ZVČ          | zdravstveno varstvo čebel, Veterinarske fakultete v Ljubljani                                                                           |

## 1 UVOD

Medonosna čebela (*Apis mellifera*) predstavlja enega od najpomembnejših opraševalcev rastlin in ima zaradi tega ključno vlogo v kmetijstvu pri pridelavi hrane in vzdrževanju ter spodbujanju naravne raznolikosti rastlin. Prav tako so čebele cenjene zaradi številnih čebeljih proizvodov, ki zdravilno učinkujejo na počutje ljudi (vanEngelsdorp in Meixner, 2010). Povsod po svetu, tudi v Sloveniji, pa je njihovo zdravje ogroženo zaradi hude gnilobe čebelje zalege (HGČZ, ang. *American foulbrood, AFB*), ki jo povzroča bacil *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*) (Genersch in sod., 2006). *P. larvae* je sporogena bakterija in se prenaša z izredno odpornimi sporami. Le-te ostanejo v panju po okužbi, smrti in razkroju čebeljih ličink, ki so edine občutljive na povzročitelja. Po panju jih raznašajo odrasle čebele, veliko vlogo pri prenosu bolezni ima tudi sam čebelar, ki z opremo in premiki čebel lahko bolezen prenaša na večje razdalje.

Bolezen je na seznamu OIE Terrestrial Animal Health Code in je po Pravilniku o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje HGČZ (Pravilnik, 2020; OIE, 2021) potrebno vsak sum prijaviti. Antibiotikov pri nas ni dovoljeno uporabljati, ker delujejo le na vegetativne oblike bakterij, odporne spore pa ostajajo kot vir nadaljnje okužbe. Izkazalo se je, da je po potrditvi povzročitelja, najučinkovitejši način nadzora bolezni uničenje kontaminiranih panjev in opreme s sežigom.

S tipizacijsko metodo ERIC PCR je bilo ugotovljeno, da se *P. larvae* pojavlja v 5 različnih genotipih ERIC. Za posamezne genotipe ERIC je znano, da lahko rastejo v obliki različnih kolonij, izražajo nekatere različne virulenčne dejavnike in kažejo različno virulenco tako na nivoju posamezne čebelje ličinke kot na nivoju celotne čebelje družine (Genersch in sod., 2006; Rauch in sod., 2009). Vse to se posledično kaže v različnih kliničnih znakih bolezni, ki jih čebelarji oziroma veterinarji opazijo ali spregledajo.

Do sedaj je diagnostika hude gnilobe čebelje zalege v Sloveniji temeljila na diagnostičnih postopkih, s katerimi smo iskali in dokazovali fenotipske lastnosti povzročitelja. Rezultati teh preiskav nam sicer pomagajo pri zatiranju bolezni, vendar so v epizootiološkem smislu zelo pomanjkljivi. Kljub temu, da smo pri izolaciji *P. larvae* opazili različne fenotipske profile povzročitelja, prisotnost različnih genotipov v Sloveniji do sedaj ni bila poznana.

## 1.1 Namen dela

Namen doktorske disertacije je bil ugotoviti epidemiološke značilnosti hude gnilobe čebelje zalege glede na klinično sliko bolezni, ki naj bi bila odvisna oziroma povezana z genotipom *P. larvae*.

Za ta namen smo želeli razviti in vpeljati moderne diagnostične postopke za zanesljivo in hitro ugotavljanje ter karakterizacijo povzročitelja HGČZ. Z molekularnimi diagnostičnimi postopki smo želeli določiti prisotnost različnih genotipov ERIC v Sloveniji in ugotoviti njihovo pojavljanje. Prisotnost različnih genotipov ERIC do sedaj v Sloveniji še ni bila raziskana. Okužbe z različnimi genotipi ERIC različno vplivajo na posamezno čebeljo ličinko oziroma na celotno čebeljo družino. Klinična slika okužb naj bi bila, ob številnih dejavnikih, ki vplivajo na posamezno ličinko in na čebeljo družino, odvisna tudi od genotipa ERIC, zato so podatki o prisotnosti genotipov v izbruhih HGČZ zelo pomembni.

Nadalje smo želeli z metodo WGS tipizirati klinične izolate *P. larvae* in jih tako epidemiološko povezati. Določitev sekvenčnega tipa (ST) z metodo MLST ima večjo moč razlikovanj kot določitev genotipov ERIC. Največjo moč razlikovanja in s tem veliko epidemiološko vrednost za potrebe določanja kužnih krogov in spremljanja širjenja HGČZ, pa ima analiza celotnih genomov (WGS). S temi podatki smo želeli preveriti ali se genetsko povezani sevi pojavljajo samo znotraj enega kužnega kroga, ali se pojavljajo tudi znotraj drugih kužnih krogov in ali se znotraj enega kužnega kroga pojavljajo tudi genetsko nepovezani sevi povzročitelja.

Ker smo pri izolaciji povzročitelja opazili, da se občasno pojavljajo kolonije *P. larvae*, ki zavirajo rast kontaminantov na plošči v obliki inhibicijske cone, smo želeli proučiti intenzivnost protimikrobne aktivnosti naših kliničnih izolatov *P. larvae* proti po Gramu pozitivnim in negativnim bakterijam ter kvasovkam. Zanimala nas je predvsem intenzivnost izločanja v odvisnosti od genotipa ERIC.



## **1.2 Hipoteze**

Z raziskavo smo želeli preveriti naslednje hipoteze:

### **1. Hipoteza**

S fenotipskimi in molekularnimi metodami bomo znotraj kužnega kroga dokazali različne morfotipe in genotipe *P. larvae* v zalegi in medu. Rezultati fenotipskih in molekularnih metod bodo primerljivi.

### **2. Hipoteza**

Genotip *P. larvae* določa klinično sliko hude gnilobe čebelje zalege oziroma prizadetost čebelje družine.

### **3. Hipoteza**

Izolati različnih genotipov *P. larvae* bodo izražali različno protimikrobno aktivnost.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 Zgodovina bolezni in povzročitelja

Bolezen čebel z značilnim smrdljivim vonjem obolele čebelje družine je bila prvič opisana v 18. stoletju. Vzroka za bolezen oziroma povzročitelja takrat še niso poznali. V 19. stoletju je veljal kot povzročitelj te bolezni *Bacillus alvei* (*B. alvei*). Ugotovili so, da bolezen lahko poteka v dveh oblikah: blažje in ozdravljivo obolenje odkrite zalege in hudo, neozdravljivo obolenje pokrite zalege (Cheshire in Cheyne, 1885). Leta 1906 je ameriški mikrobiolog White iz vlecljive mase okužene zalege, namesto *B. alvei*, v čisti kulturi izoliral takrat neznano bakterijo. Poimenoval jo je *Bacillus larvae* (*B. larvae*) (White, 1906). Opisal je razdelitev bakterijskih okužb čebelje zalege na blago gnilobo, za katero so kasneje ugotovili, da jo povzroča *Melissococcus plutonius*, s pogostimi sekundarnimi okužbami z bakterijama *B. alvei* in *Enterococcus faecalis* (Bailey, 1983), in na hudo gnilobo čebelje zalege, ki jo povzroča *B. larvae* (White, 1906). Leta 1950 so iz prašnatih ostankov odmrle zalege izolirali še eno bakterijo in jo poimenovali *Bacillus pulvifaciens* (*B. pulvifaciens*) (Katznelson, 1950). Z razvojem molekularnih metod sta bili obe vrsti, *B. larvae* in *B. pulvifaciens*, 50 let kasneje premeščeni v nov rod *Paenibacillus* (Ash in sod., 1993). Obe vrsti sta bili zaradi velike morfološke in genske podobnosti leta 1996 uvrščeni v eno vrsto z dvema podvrstama *P. larvae* subsp. *larvae* in *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* (Heyndrickx in sod., 1996). Kasneje pa so z različnimi molekularnimi metodami obe podvrsti uvrstili v eno vrsto *P. larvae* (Genersch in sod., 2006).

### 2.2 Lastnosti bakterije *Paenibacillus larvae*

*Paenibacillus larvae*, povzročitelj hude gnilobe čebelje zalege, je po Gramu pozitivna sporogena bakterija. Po obliki je peritrihna gibljiva palička, ki se rada povezuje v verige. Za rast in razvoj ji najbolj ustrezajo mikroaerofilni pogoji. Spore so edina kužna oblika *P. larvae*. S kontaminirano hrano se okužijo samo zelo mlade ličinke, odrasle čebele pa spore raznašajo in širijo bolezen (Genersch in sod., 2005, 2010).

#### 2.2.1 Genotipi

Z uporabo molekularnih tehnik so ugotovili, da se *P. larvae* pojavlja v različnih biološko pomembnih genotipih. Za proučevanje epidemioloških podatkov in populacijske strukture *P. larvae* so razvili več tipizacijskih metod, in sicer:

- pomnoževanje ponavljajočih se odsekov DNA z verižno reakcijo s polimerazo (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) – ERIC PCR, kjer se pri pomnoževanju uporabljajo

---

začetni oligonukleotidi ERIC (ang. *enterobacterial repetitive intergeneic consensus*), Ta metoda se v osnovi uporablja za tipizacijo enterobakterij, vendar so jo uspešno vpeljali tudi za tipizacijo bakterije *P. larvae* (Genersch in Otten, 2003),

- gelsko elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (PFGE) (Genersch in sod., 2006)
- tipizacijo na osnovi zaporedij več lokusov (ang. *multilocus sequence typing*, MLST) (Morrissey in sod., 2015).
- določanje zaporedij celotnih genomov (ang. *whole-genome sequencing*, WGS) (Papić in sod., 2021; Bertolotti in sod., 2021)

Zadnjih 20 let je bila standardna tipizacijska metoda ERIC PCR, na podlagi katere so *P. larvae* razvrščali v štiri genotipe ERIC (ERIC I -IV) (Genersch in sod., 2006). V letu 2020 je bil v španskem medu ugotovljen nov genotip ERIC V (Beims in sod., 2020). Nekoliko večjo moč razlikovanja od ERIC PCR ima tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov (MLST), ki po podatkih PubMLST Database seve trenutno deli v 34 sekvenčnih tipov (Morrissey in sod., 2015; Papić in sod., 2021, Jolley in sod. 2018). Z razvojem metode določanja zaporedij celotnih genomov, ki ima doslej največjo in s katerokoli drugo metodo neprimerljivo moč razlikovanja, je prišlo do velikega napredka tudi na področju epidemiološkega spremljanja bakterije *P. larvae* (Ågren in sod., 2017; Bertolotti in sod., 2021; Papić in sod., 2021; Žugelj in sod., 2021).

V izbruhih bolezni se *P. larvae* pojavlja v različnih biološko pomembnih genotipih. Genotipi ERIC se poleg genskega zapisa razlikujejo tudi po fenotipskih lastnostih, kot je morfologija spor, kolonij in najpomembneje v virulenci (Genersch in sod., 2006, Beims in sod., 2020). V izbruhih bolezni se pojavljata samo genotipa ERIC I in II, ki sta razširjena po celem svetu, tudi v Sloveniji (Poppinga in Genersch, 2015; Müller in sod., 2015; Fünfhaus in sod., 2013; Žugelj in sod., 2021).

#### **2.2.1.1 Rast na gojiščih in morfologija kolonij**

Kolonije *P. larvae* iz vzorcev obolele zalege v večini primerov zrastejo na gojiščih v 2-4 dneh po inkubaciji pri 37°C (OIE, 2018). Na različnih gojiščih zraste v različnih oblikah, barvah in velikostih kolonij. Genersch in sodelavci opisujejo, da *P. larvae* genotip ERIC I raste v obliki belo-sivih hrapavih kolonij, genotip ERIC IV pa v obliki belo-sivih gladkih kolonij. Za genotipa ERIC II in III so značilne pigmentirane, oranžno rdeče kolonije (Genersch in sod., 2005; 2006; Neuendorf in sod., 2004).

Za kultivacijo *P. larvae* se uporablja različna gojišča. V literaturi najpogosteje navajajo uporabo krvnega agarja z ovčjo krvjo (CSA) in agarja MYPGP (Genersch in Otten, 2003; Neuendorf in sod., 2004; Peters in sod., 2006; Rauch in sod. 2009; Poppinga in sod., 2012; Schäfer in sod., 2014; Garcia-Gonzales in sod., 2014a,b,c; Hertlein in sod., 2016; Beims in sod., 2020; Biova in sod., 2021...). Uporabljajo se tudi druga gojišča kot so J-agar (Hirai in sod. 2016), BHI agar z dodatkom ovčje krvi (Kušar in sod., 2021; Žugelj in sod., 2021), PLA agar (De Graaf in sod., 2006), THCIYGP agar (Genersch in sod., 2006; Krongdang in sod., 2017), ki so jim za inhibicijo rasti kontaminantov dodani nalidiksinska kislina, piruvična ali pipemidna kislina.

### 2.2.1.2 Biokemijske značilnosti

Bakterije *P. larvae* so biokemijsko aktivne, kar izkoriščamo pri identifikaciji izolatov. *P. larvae* v katalaznem testu reagira negativno, lahko tudi pozno pozitivno. Razgradnja ogljikovih hidratov do kislin naj bi bila genotipsko značilna. Tako genotip ERIC I za razliko od genotipov ERIC II, III in VI razgrajuje salicin in ne razgrajuje manitola (Genersch in sod., 2006).

### 2.2.1.3 Morfologija spor

Z elektronskim mikroskopom je bilo ugotovljeno, da se genotipi ERIC razlikujejo tudi po morfologiji površine spor. Ugotovljeni so bili naslednji tipi spor: spore z gladko površino, ki so značilne za genotip ERIC I, spore, nagubane podobno kot možgani, ki so značilne za genotip ERIC II, in spore z vzdolžnimi gubami, ki so značilne za genotipe ERIC III, IV in V (Genersch in sod., 2006; Beims in sod., 2020).

### 2.2.1.4 Virulenca

Bakterija *P. larvae* je obligatni ubijalec, ki mora povzročiti propad gostitelja, da se lahko širi. Virulenco obligatnih ubijalcev primarno določata dva dejavnika: verjetnost okužbe gostitelja in čas do smrti gostitelja. Zadostno verjetnost okužbe naslednjega gostitelja si bakterija *P. larvae* zagotavlja s sporulacijo, to je s sposobnostjo preobrazbe vegetativnih celic v zelo odporne spore, ki ostajajo infektivne več desetletij in lahko dolgo čakajo na naslednjega gostitelja. Z zelo visoko reprodukcijsko stopnjo in nastankom velikega števila spor v vsaki okuženi čebelji ličinki si bakterija zagotavlja veliko verjetnost okužbe.

*P. larvae* vpliva na posamezno čebeljo ličinko in povzroči njeno smrt, s tem pa vpliva na propad celotne čebelje družine (Rauch in sod., 2009). Pri genotipih ERIC III–V je čas, potreben za propad ličink, do 3 dni po okužbi, pri genotipu ERIC II do 7 dni, medtem ko je pri genotipu ERIC I ta čas 10 do 12 dni po okužbi. Genotipi ERIC II – V so tako na ravni ličinke bolj

virulentni od genotipa ERIC I (Genersch in sod., 2005; Rauch in sod., 2009; Beims in sod., 2020). Vendar pa je ob hitrejšem propadu ličink čistilni nagon čebelje družine, t.j. odstranjevanje odmrlih ličink s strani čebel negovalk, bolj učinkovit. Čistilni imunski odgovor celotne čebelje družine na okužbo je bolj prilagojen na zgodnji propad ličink, ki ga povzročajo bakterije *P. larvae* genotipa ERIC II. Na prvi pogled izgleda situacija paradoksalna, kot da je genotip ERIC I na ravni čebelje družine bolj virulenten kot genotip ERIC II. Kaže, da so bakterije *P. larvae* genotipov ERIC III – V preveč patogene in povzročijo smrt ličink tako hitro, da so jih čebele negovalke sposobne odstraniti iz panja pred sporulacijo, zato se ti genotipi ne pojavljajo v izbruhih bolezni po svetu. *P. larvae* genotipa ERIC V je bil ugotovljen v španskem medu, izolati genotipov ERIC III in IV pa so shranjeni le v zbirkah izolatov (Rauch in sod., 2009; Poppinga in Genersch 2015).

## 2.2.2 Virulenčni dejavniki

### 2.2.2.1 Vloga PICBP49, encima za razgradnjo hitina

Za razgradnjo PM oba genotipa *P. larvae*, ERIC I in ERIC II, izločata beljakovino PICBP49 (*P. larvae* chitin binding protein 49), ki se veže na hitin. PICBP49 spada v skupino litičnih polisaharidnih monooksigenaz (LPMO), ki so sposobne razgraditi tudi netopne polisaharide. Gre za hitinazo, ki se veže na hitin in ga tudi razgradi. PICBP49 je sposoben razgraditi topen in netopen hitin, zato ima med okužbo s *P. larvae* odločilno vlogo pri razgradnji PM. (Garcia-Gonzales in sod., 2014c).

### 2.2.2.2 Vloga sekundarnih presnovkov

Razvoj protokolov za genetsko manipulacijo bakterije *P. larvae* in odkritje prvih celotnih genomov genotipov ERIC I in II je omogočil vpogled v molekularne mehanizme patogeneze HGČZ (Djukic in sod., 2014). V genomu *P. larvae* genotipov ERIC I in II so ugotovili gruče genov, ki kodirajo multiencimske komplekse - neribosomalne peptidne sintetaze (NRPS) in hibridne NRPS/poliketidne sintaze (PKS). Ti zaporedno aktivirajo in kondenzirajo specifične aminokisline in tako proizvajajo majhne beljakovine. Za razliko od ribosomalne sinteze, ki kot predlogo za zaporedje aminokislin nastajajoče beljakovine vključuje mRNA, so NRPS-ji sestavljeni iz modulov, ki prinašajo po eno aminokislino na nastajajočo peptidno verigo (Garcia-Gonzales in sod., 2014a, Hertlein in sod., 2014). Na splošno je vsak modul NRPS sestavljen iz treh domen:

- 
- Adenilacijska domena A, ki specifično prepozna in aktivira aminokislino z ATP tako, da jo spremeni v aminoacil adenilat.
  - Tiolacijska domena aktivirano aminokislino kot tioester kovalentno veže preko fosfopanteteinilske roke.
  - Kondenzacijska domena C katalizira nastanek peptidne vezi med dvema aminokislinama med dvema sosednjima moduloma.

Kočni modul pogosto vsebuje dodatno tioesterazno domeno, ki sprosti beljakovino iz NRPS. Nekateri moduli NRPS vsebujejo še epimerizacijsko domeno E, ki izvaja dodatne specifične transformacijske reakcije, npr. metilacijo, oksidacijo in spreminjanje konfiguracije nastajajoče beljakovine iz L v D obliko (Garcia-Gonzales in sod., 2014a, Hertlein in sod., 2014).

Substrat NRPS predstavlja 20 proteinogenih aminokislin, pa tudi modificirane aminokislino, neproteinogene aminokislino, maščobne kisline, karboksilne kisline in več sto drugih substratov. Zato so sekundarni presnovki, ki jih proizvajajo ti multienzimski kompleksi, strukturno zelo različne molekule z mnogimi različnimi biološkimi funkcijami: protimikrobno, protivirusno, protitumorsko, imunosupresivno ali citotoksično (Hertlein in sod., 2014, Djukic in sod., 2014). Povzročitelju HGČZ *P. larvae* ti produkti s protimikrobno aktivnostjo pomagajo zaščititi nišo ličinkinega črevesa in mrtve čebelje ličinke pred mikroorganizmi, ki so normalno in ubikvitarno prisotni saprofiti. Značilno je namreč, da iz ostankov bolne zalege *P. larvae* izoliramo v čisti kulturi. Lahko pa sekundarni presnovki delujejo kot pravi virulenčni faktorji in *P. larvae* pomagajo prečkati bariero črevesnega epitelija in uničevati tkivo čebelje ličinke (Poppinga in Genersch, 2015, Garcia-Gonzales in sod., 2014a, Garcia-Gonzales in sod., 2014b).

### 2.2.2.3 Sevadicin

Predstavniki *P. larvae* genotipa ERIC II izražajo skupek genov, ki kodira trimodularno NRPS in proizvaja tripeptid sevadicin (Garcia-Gonzales in sod., 2014a). Sevadicin je bila prva genetsko, molekularno in funkcionalno dokazana neribosomalna beljakovina z antibiotično aktivnostjo, ki jo izloča *P. larvae* (Garcia-Gonzales in sod., 2014a). Encim sevadicin sintetaza se aktivira med vegetativno rastjo povzročitelja bolezni, njegov produkt, sevadicin, pa kaže le šibko protibakterijsko aktivnost. Slednjo lahko *P. larvae* kompenzira z natančnim časom sproščanja, ko je antibiotična aktivnost najbolj potrebna pri okuženih ličinkah, z izločanjem velikih količin sevadicina in/ali z ogromno populacijo povzročitelja v črevesju v pozni fazi okužbe. Glede na omejeno število bakterij uporabljenih pri poskusu antibiotične aktivnosti

sevadicina, je mogoče, da je sevadicin antibiotik z zelo ozkim spektrom delovanja (Garcia-Gonzales in sod., 2014a, Müller in sod., 2015). Na prehodu iz ne invazivne faze v invazivno fazo, ko *P. larvae* začne za vir hranil namesto porabljene hrane za ličinke, izkoriščati biomaso ličink, prihaja do presnovnega preskoka, pri katerem se predvideva, da ima vlogo tudi sevadicin, vendar ta še ni dokončno pojasnjena (Garcia-Gonzales in sod., 2014a, Garcia-Gonzales in sod., 2014b, Müller in sod., 2015).

#### 2.2.5.4. Penilarvini

*P. larvae* genotipa ERIC II, izraža gene za NRPS/PKS, ki proizvajajo penilarvine (A, B in C), lipoproteine, ki kažejo močno protiglivno aktivnost. Penilarvin A je protiglivno najaktivnejši in naj bi *P. larvae* pomagal ohranjati nišo ličinkinega črevesja pred ubikvitarno prisotnimi glivami. V zelo nizkih koncentracijah lahko penilarvini delujejo tudi kot signalne molekule. Na čebeljih ličinkah so dokazali močno citotoksično aktivnost penilarvinov. Povzročajo nastanek por in s tem poškodbo membrane črevesnih epitelijskih celic čebeljih ličink. Vloga teh beljakovin v patogenezi bolezni je zelo verjetna, vendar eksperimentalno še ni dokazana (Sood in sod., 2014; Müller in sod., 2015; Hertlein in sod., 2016).

#### 2.2.5.5. Penilamicini

Dodatno gručo genov NRPS/PKS so ugotovili in raziskovali pri bakteriji *P. larvae* genotipa ERIC II. Ta proizvaja kompleksne beljakovinske-poliketidne hibride penilamicine s široko protibakterijsko (tako proti po Gramu pozitivnim kot po Gramu negativnim bakterijam) in protiglivno aktivnostjo. Ugotovili so, da penilamicini v prisotnosti bakterije *P. larvae* preprečujejo rast mikrobnih kompetitorjev (bakterijskih in glivnih tekmecev). To bi lahko pojasnilo dejstvo, da povzročitelja hude gnilobe iz ostankov mrtve ličinke največkrat izoliramo v čisti kulturi (Garcia-Gonzales in sod., 2014b; Müller in sod., 2014; Müller in sod., 2015; Poppinga in Genersch, 2015). Penilamicini naj bi imeli pomembno vlogo v začetni fazi okužbe, ko bakterija *P. larvae* vzkljuje in prične kolonizirati črevo čebelje ličinke, vendar tudi njihova vloga v patogenezi HGČZ še ni dokončno raziskana in dokazana (Garcia-Gonzales in sod., 2014b). Penilamicini zaradi svoje bioaktivnosti predstavljajo tudi potencialne učinkovine za razvoj humanih in veterinarskih protimikrobnih zdravil (Müller in sod., 2014).

#### 2.2.5.6. Bacilibaktin

Za večino aerobnih organizmov je železo esencialen mikroelement, saj sodeluje v številnih bioloških procesih. Bakterija *P. larvae* je kot fakultativni anaerob razvila način, kako si v

aerobnih razmerah zagotoviti železo iz okolja tudi v gostitelju. Pri obeh najbolj raziskanih genotipih (ERIC I in ERIC II) so ugotovili gručo genov za NRPS, ki proizvaja siderofor kateholskega tipa bacilibaktin, ki veže železo iz okolja. Proizvodnjo bacilibaktina so dokazali v kulturah *P. larvae*, ki so izpostavljene nizkim koncentracijam železa. Eksperimentalno še niso uspeli dokazati vloge bacilibaktina pri okužbi z bakterijo *P. larvae*. Ker železo predstavlja pomemben dejavnik za rast večine bakterij v aerobnih razmerah, se zdi, da bakterija *P. larvae* s tvorbo bacilibaktina ustvarja neugodne razmere za rast kompetitivnih bakterij, ne pa da tekmuje z gostiteljem za železo (Hertlein in sod., 2014; Müller in sod., 2015; Poppinga in Genersch, 2015).

#### 2.2.5.7. Vloga citotoksinov

Po razgradnji PM je potek okužbe (patogeneza) z bakterijo *P. larvae* različen glede na genotip ERIC. Primerjalne analize genomov so pokazale, da sevi genotipa ERIC I vsebujejo več lokusov za toksine, ki jih genotip ERIC II nima oziroma niso funkcionalni. Epitelij črevesa čebelje ličinke ostane nezaščiten in bakterija *P. larvae* ima do njega neposreden dostop, napade epitelij in si omogoči vstop v hemocel ličinke. Patogene bakterije pogosto izločajo toksine, ki se vpletajo v normalno celično funkcijo celic gostiteljic. Pri bakteriji *P. larvae* so do danes opisali tri toksine (Fünfhaus in sod., 2013; Djukic in sod., 2014).

##### 2.2.5.7.1. Toksina Plx1 in Plx2

V genomu bakterije *P. larvae* genotipa ERIC I so ugotovili gene za dva binarna AB-toksina, ki jih pri genotipu ERIC II ni (Fünfhaus in sod., 2013). Ti geni kodirajo dvokomponentna AB toksina Plx1 in Plx2, ki sta sestavljena iz dveh podenot. Podenota A predstavlja encimsko aktiven del, podenota B pa je odgovorna za vezavo na celični površinski receptor. Podenota B je sestavljena iz domene R, s katero se toksin veže na celico in domene T, ki prenese podenoto A v celico gostiteljico. V celici encimsko aktivna podenota A, ki je ADP-riboziltransferaza, zavira normalne celične funkcije tako, da katalizira prenos adenzindifosfatriboze (ADP-riboze) iz nikotinamidadenindinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) na različne tarčne beljakovine in jih inaktivira (Fünfhaus in sod., 2013).

Plx1 je enoverižni eksotoksin, njegova tarčna molekula naj bi bila DNA, posledica njegovega delovanja pa je uničenje aktinskega citoskeleta, kar se tipično kaže v spremembi morfologije celic. Podenota B Plx1 se veže na glikoproteine in glikolipide epiteljskih celic ličinkinega črevesa in tako olajša vstop toksina v celico (Fünfhaus in sod., 2013).



Tudi Plx2 je eksotoksin, sestavljen iz dveh domen. Plx2B domena je pomembna za vezavo na celico gostiteljico. Z N-terminalnim delom Plx2B se toksin podobno kot Plx1 veže na glikoproteine in glikolipide na gostiteljski celici in omogoči vstop encimsko aktivni domeni Plx2A. Plx2A domena ima katalitično funkcijo. Inaktivira majhne, na GTP vezane proteine iz skupine Rho. Inaktivacija proteinov Rho vpliva na znotrajcelične signalne procese pomembne za regulacijo aktinskega citoskeleta. To vodi v depolimerizacijo citoskeleta, kar ima za posledico poškodbo aktinskega citoskeleta in spremembo morfologije gostiteljevih celic (Fünfhaus in sod., 2013).

Oba toksina delujeta na celično funkcijo tako, da poškodujeta zgradbo epitelijskega tkiva in omogočita bakteriji, da paracelularno prehaja epitelij. S poskusi so ugotovili, da oba toksina delujeta neodvisno drug od drugega, in da lahko *P. larvae* ERIC I kompenzira izgubo Plx1 ali Plx2. Glede na to, da je povzročitelj kljub odsotnosti obeh toksinov sposoben usmrtiti približno 50% ličink, ugotavljajo, da toksina nimata glavne vloge v patogenezi HGČZ (Fünfhaus in sod., 2013).

#### 2.2.5.7.2. C3larvin

C3larvin je toksin s protiglivno aktivnostjo. Izražata ga oba genotipa *P. larvae*, ERIC I in ERIC II. C3larvin spada v skupino C3-toksinov, natančneje v skupino mono-ADP-riboziltransferaz. To so beljakovinski eksotoksini s transferazno aktivnostjo, ki delujejo tako, da odstranjujejo ADP-ribozno skupino iz  $\text{NAD}^+$ , jo kovalentno vežejo na beljakovinsko tarčo v celici in s tem spremenijo delovanje tarče oz. jo inaktivirajo. Kljub močni toksičnosti C3larvina ob njegovi aplikaciji v citoplazmo kvasovk njegova vloga pri patogenezi okužb z bakterijo *P. larvae* še vedno ni dobro poznana (Krska in sod., 2015).

#### 2.2.5.8. Vloga površinskega proteina SplA

Bakterija *P. larvae* genotipa ERIC II izraža površinsko beljakovino SplA, ki je zanj specifična in predstavlja eno najpomembnejših znanih razlik med genotipoma ERIC I in II. S poskusi na celičnih kulturah so dokazali, da je beljakovina SplA pomembna za pritrjevanje bakterije na plazmalemo črevesnih celic čebelje ličinke in paracelularni prehod *P. larvae* v hemocel ličinke in zato predstavlja pomemben dejavnik virulence pri genotipu ERIC II. S poskusi so ugotovili, da se umrljivost ličink, okuženih z bakterijo *P. larvae*, ob odsotnosti SplA zmanjša za okoli 50 %. Tudi vloga te beljakovine v patogenezi HGČZ še ni dokončno raziskana (Poppinga in sod., 2012; Poppinga in Genersch, 2015).

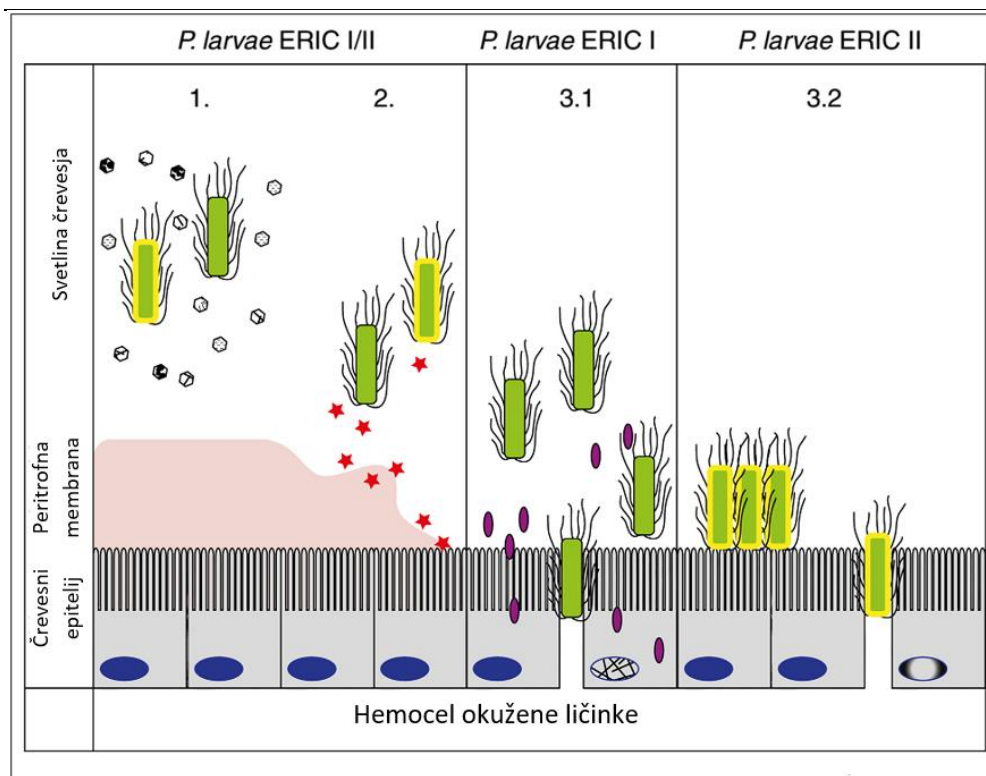
### 2.2.3 Patogeneza

Na okužbo s *P. larvae* so občutljive samo zelo mlade čebelje ličinke v starosti 12-36 ur po izvalitvi iz jajčeca (Genersch in sod., 2005). Čebelje ličinke se okužijo *per os* s hrano, kontaminirano s sporami, ki predstavljajo edino kužno obliko *P. larvae* (Wilson, 1971; Genersch in sod., 2005). Za okužbo je dovolj že okoli 10 spor (Genersch, 2005). S staranjem postajajo čebelje ličinke čedalje manj občutljive in so v dveh dneh po izvalitvi iz jajčeca odporne proti okužbi s *P. larvae* (Gregorc in Bowen, 1998; Garcia-Gonzalez in Genersch, 2013). Po okužbi v lumnu srednjega črevesa ličinke spore v 12. do 24. urah vzkljujejo in vegetativne oblike bakterij se masovno razmnožijo (Yue in sod., 2008). V prvi, neinvazivni fazi okužbe ni opaziti nobenih poškodb epitelijske plasti črevesa, kljub temu, da se povzročitelj intenzivno množi. *P. larvae* v tej fazi presnavlja predvsem ogljikove hidrate iz hrane, s katero čebele negovalke hranijo mlado zalego. Kot vir ogljika mu služi tudi hitin iz peritrofne membrane ličinke (Garcia-Gonzalez in Genersch, 2013). V drugi, invazivni fazi povzročitelj napade in prečka epitelij srednjega črevesa in vdre v hemocel, kar ima za posledico smrt ličinke. Mrtvo ličinko nato bakterije razgradijo v vlecljivo maso (Müller in sod., 2015). V tej, destruktivni fazi okužbe povzročitelj za hrano izkorišča zunajcelični matriks in celične komponente. Kot vir ogljika mu služi glikogen, različni aminosladkorji in nukleotidi iz propadle ličinke (Garcia-Gonzales in Genersch 2013). Vlecljivo maso v končni fazi sestavljajo samo bakterije. Ko začne povzročitelju primanjkovati hrane, se začne sporulacija. Vlecljiva masa se posuši v suho lusko, ki vsebuje veliko število spor (Garcia-Gonzalez in Genersch, 2013). Spore so zelo odporne proti vročini, mrazu, izsušitvi, vlagi in so sposobne okužbe več kot 35 let (Genersch, 2010b). V okuženi čebelji družini spore raznašajo odrasle čebele. Z ropanjem se bolezen širi tudi na druge čebelje družine (Garcia-Gonzalez in Genersch, 2013). Ogromno število zelo trdoživih spor omogoča povzročitelju, da se zelo učinkovito širi med čebeljimi družinami znotraj čebelnjaka in tudi zunaj njega ter onemogoča izkoreninjenje bolezni.

Ključni dejavnik pri patogenezi hude gnilobe čebelje zalege, ki najverjetneje loči neinvazivno in invazivno fazo, je razgradnja peritrofne membrane (PM) v ličinkinem srednjem črevesu. PM predstavlja prvo oviro, ki jo mora povzročitelj premagati, da lahko napade epitelijske celice in se razširi v hemocel (Garcia-Gonzalez in Genersch, 2013). Gre za organizirano plast v največjem deležu sestavljeno iz hitina in iz glikoproteinov (Gregorc in Bowen, 1998; Garcia-Gonzales in sod., 2014c). PM prekriva apikalni del epitelijskega črevesa čebeljih ličink in

predstavlja učinkovito bariero pred abrazivnimi delci hrane, toksini in patogenimi mikroorganizmi (Gregorc in Bowen, 1998; Garcia-Gonzales in Genersch, 2013; Garcia-Gonzales in sod., 2014c). Poleg obrambne funkcije ima PM vlogo pri transportu hranilnih snovi in selektivni absorpciji hrane in vode, saj zadržuje tekočo hrano nad epitelijem, skozi katerega poteka absorpcija hranil (Gregorc in Bowen, 1998; Sulimanović in Jenčič, 1996). Najdebelejša je v kranialnem delu srednjega črevesa, v kavdalnem delu je tanjša. Njena funkcionalna celovitost je življenjsko pomembna za preživetje ličinke (Gregorc in Bowen, 1998; Garcia-Gonzales in Genersch, 2013; Garcia-Gonzales in sod., 2014c). PM je pri čebeljih ličinkah dokazano prisotna že 8 ur po izvalitvi iz jajčeca. S starostjo se njena debelina večja, s tem pa se povečuje obramba ličink pred vstopom entomopatogenov v hemocel (Garcia-Gonzales in Genersch, 2013). Z namenom prečkati PM *P. larvae* izloča različne proteaze in proteine, ki razgrajujejo hitin. *P. larvae* je sposoben presnavljati celo N-acetil-D-glukozamin, sestavni del hitina, ter ga izkoriščati kot vir ogljika. Z razgradnjo hitina v PM ličinke si *P. larvae* odpre pot do epiteljskih celic črevesa, ki jih napade in kjer začne izražati še druge dejavnike virulence (Garcia-Gonzales in Genersch, 2013; Garcia-Gonzales in sod., 2014c).

Pri preučevanju virulence genotipov ERIC I in II so ugotovili, da se oba genotipa *P. larvae* razlikujeta tudi v izražanju dejavnikov virulence, kar nakazuje, da sta genotipa ERIC I in ERIC II razvila različne strategije za ubijanje okuženih čebeljih ličink (Garcia-Gonzales in sod., 2014a; Djukic in sod., 2014).



**Slika 1:** Patogeneza okužb z bakterijo *P. larvae* genotipov ERIC I in II (Poppinga in Genersch, 2015). 1. Sekundarni presnovki, ki jih izločajo bakterije obeh genotipov (šesterokotniki), pomagajo izriniti ostale mikrobné tekmece ter olajšajo prečkanje epitelijskega in vdor v hemocel. 2. Bakterije obeh genotipov izločajo PICBP49 (zvezdice), encim, ki razgradi peritrofnó membrano (PM), zaščitni sloj epitelijskega srednjega črevesa čebelje ličinke. V tej fazi, ki loči neinvazivno od invazivne faze, bakterija kot vir hranil izrablja hitin iz PM. 3.1 Bakterije genotipa ERIC I s toksini napadejo nezaščitene epitelijske celice (ovalni), toksini spremenijo morfologijo celice ter bakterijam omogočijo paracelularno prečkanje epitelijskega in vdor v hemocel. 3.2 Bakterije genotipa ERIC II izražajo površinsko beljakovino SplA (rumen rob celice), kar jim omogoča neposredno vezavo na epitelijske celice.

**Figure 1:** Pathogenesis of *P. larvae* ERIC I and II infections (Poppinga and Genersch, 2015). 1. Secondary metabolites secreted by both genotypes *P. larvae* (hexagons) help to outcompete microbial competitors and to set the stage for conquering the larval midgut lumen. 2. Both genotypes secrete PICBP49 (stars), enzyme to digest peritrophic matrix (PM), which protects the midgut epithelium. In this phase, which marks the transition from the non-invasive to invasive phase, *P. larvae* uses chitin from PM as a source of nutrition. 3.1 *P. larvae* ERIC I attacks the unprotected epithelium cells with secreted toxins (ovals), toxins change the morphology of the cells and enable bacteria to breach the epithelium via paracellular route. 3.2 *P. larvae* ERIC II expresses S-layer protein SplA (yellow edge of the cell), which enables direct attachment to epithelial cells.

## 2.3 Klinična slika HGČZ

Zgodnja smrt ličink in čiščenje okuženih satnih celic se klinično kaže kot presledkasta zalega oz. prisotnost različno stare zalege v panju. Iz satnih celic lahko s tanko paličko potegnemo vlecljive kremaste do temno rjave ostanke ličink, kar je značilen znak za hudo gnilo. Vlecljiva masa je posledica razgradnje večinoma starejših okuženih ličink, najpogosteje po zaprtju zalege. Spremembe se kažejo tudi na satnih pokrovčkih, ki potemniijo, dobijo masten videz in postanejo vdrti ter preluknjani in nagrizeni od čebel, ki skušajo obolelo zalego

odstraniti. Vlecljivi ostanki ličinke se v kasnejši fazi bolezni posušijo v tanko ploščato lusko, ki je tesno pritrjena na spodnjo steno satne celice. Pri okužbi in razgradnji zalege v razvojnem stadiju bube lahko pri posušениh ostankih opazimo štrleči jeziček iz glave do vrha celice. Štrleči jeziček je zelo značilen, vendar redko viden znak (de Graaf in sod., 2006; OIE, Terrestrial Manual, 2018)



**Slika 2:** Presledkasta zalega (levo) in naluknjani pokrovci satnih celic (desno).

**Figure 2:** Mottled brood (left) and punctured capping of the cells (right).



**Slika 3:** Štrleči jeziček, redko opazni ostanki po okužbi zalege v razvojnem stadiju bub (OIE, 2018).

**Figure 3:** Protruded tongue, rarely seen remains after infection of the brood in the pupal stage (OIE, 2018).

Glede na genotip oziroma virulenco *P. larvae* se klinična slika kaže različno. Genotip ERIC II povzroči smrt ličinke v 7 dneh po okužbi, ko satne celice še niso zaprte s pokrovci, zato čebele čistilke lahko očistijo propadle ličinke. Klinično se to kaže v neenakomerni starosti zalege, presledkasti zalegi, ni pa nujno, da se ugotovi spremenjena ličinka z značilno vlecljivo maso (Genersch in sod., 2005; Rauch in sod., 2009).

## 2.4 Prenos in širjenje HGČZ

Na klinično ugotavljanje in širjenje HGČZ v največji meri vpliva gostota čebelnjakov in aktivnosti čebelarjev (Peters et al., 2006). Bolezen se večinoma prenaša horizontalno. Pri prenosu imajo pomembno vlogo čebele. Čebelam čistilkam se pri čiščenju okuženih satnih celic spore *P. larvae* prilepijo na dlačice in jih uspešno raznesejo po panju. Čebele negovalke jih s hrano ponudijo novemu zarodu čebeljih ličink in tako sklenejo krog povzročitelja in gostitelja. Na svojih dlačicah spore raznašajo tudi pašne čebele, ki lahko kontaminirajo tudi okolico čebelnjaka. Bolezen se prenaša tudi z ropanjem od HGČZ oslabilih družin, pri čemer si močna družina v svoj panj zanese spore *P. larvae*. Pri takem prenosu bolezni se bolezen večinoma širi znotraj kužnega kroga; to je v pasu preletne razdalje čebele, ki je glede na geografsko konfiguracijo ocenjen na pas 3 km (Genersch, 2010; Pravilnik, 2020). Pri horizontalnem širjenju HGČZ ima zelo veliko vlogo tudi čebelar. S prevozom okuženih čebel na oddaljeno pašo, s trgovanjem z okuženimi čebelami in njihovimi proizvodi, s posojanjem oziroma izposojanjem okužene čebelarske opreme ter slabo čebelarsko prakso si čebelar lahko sam prenese bolezen v več panjev v svojem čebelnjaku ali celo raztrosi spore in širi bolezen na večje geografske razdalje (Genersch, 2010; Žugelj in sod. 2021).

Podatki o razlikah v virulenci na nivoju čebelje družine (Rauch in sod., 2009) nakazujejo, da se povzročitelj z nizko virulenco na nivoju čebelje družine (genotip ERIC II) lahko prenaša tudi vertikalno z rojenjem čebel. Na začetku okužbe *P. larvae* genotip ERIC II ne vpliva na moč čebelje družine zaradi učinkovitega socialnega imunskega odziva in družina ne kaže kliničnih znakov bolezni. Če družina v tem času roji, lahko sama sebe očisti spor *P. larvae* oziroma se prilagodi na povzročitelja (Fries in sod., 2006, Genersch, 2010).

## 2.5 Epidemiologija

*P. larvae* se pojavlja povsod po svetu, kjerkoli se pojavlja medonosna čebela (Genersch, 2010, Morrissey et al., 2015). Razvoj molekularnih metod tipizacije povzročitelja je omogočil ugotavljanje in epidemiološko spremljanje različnih genotipov *P. larvae*. Z različnimi molekularnimi metodami so raziskovalci po Evropi, pa tudi širše po svetu, ugotavljali prisotnost različnih genotipov *P. larvae*, njihovo virulenco in poti širjenja na svojem območju. Ugotovili so, da se v kliničnih primerih v izbruhih bolezni pojavljata samo genotipa ERIC I in ERIC II (Genersch, 2010). Podatki epidemioloških študij pojavnosti posameznega genotipa po državah so pomembni zaradi razlik v virulenci med genotipi, kar vpliva na širjenje in je pomembno tudi

za nadzor bolezni. Do danes so bile opravljene študije prevalenze posameznega genotipa *P. larvae* v Nemčiji, kjer so ugotovili, da je v zahodni Nemčiji prevladujoč tip ERIC II (Genersch in Otten, 2003; Peters in sod., 2006), v vzhodni Nemčiji pa prevladuje tip ERIC I. V večini drugih Evropskih državah, kjer so opravili epidemiološke študije, v Avstriji (Loncaric in sod., 2009), v Italiji (Bassi in sod., 2015), Belgiji (Descamps in sod., 2016) Švici in na Finskem (Genersch in sod., 2006) je bil v izbruhih HGČZ najpogostejše ugotovljen genotip ERIC I. Na Češkem so prevalenco genotipov ERIC ugotavljali pred kratkim in ugotovili, da prevladuje genotip ERIC II (Biova in sod., 2021). Ueno in sodelavci so ugotovili, da je na Japonskem prevladujoč genotip ERIC I-ST15 (Ueno in sod., 2018), ki je po podatkih iz literature najpogostejši ST ERIC I in se pojavlja v številnih državah na 5 kontinentih (Morrissey in sod., 2015). So pa na Japonskem v zadnjem desetletju ugotovili povečano frekvenco genotipa ERIC II-ST10 (Hirai in sod., 2016; Ueno in sod., 2018). V Sloveniji pojavnost genotipov ERIC do sedaj še ni bila raziskana.

## 2.6 Diagnostika in nadzor HGČZ

Diagnostika HGČZ pri nas v Sloveniji poteka po Pravilniku o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje HGČZ in temelji na kliničnih znakih v oboleli čebelji družini ter na dokazovanju povzročitelja bolezni, s klasično bakteriološko preiskavo (Pravilnik, 2020). Povzročitelja ugotavljamo v različnih vrstah vzorcev. Ob izbruhih bolezni *P. larvae* izoliramo neposredno iz spremenjene čebelje zalege. V primeru monitoringa bolezni ugotavljamo prisotnost spor v vzorcih medu, drobirja, voska ali odraslih čebel. Diagnostika na osnovi biokemijskih lastnosti za *P. larvae* je dokaj dolgotrajna in traja 4–10 dni (Genersch in Otten, 2003; Genersch in sod., 2006). Zato je za identifikacijo poraslih kolonij bolj primerna tehnologija masne spektrometrije – MALDI-TOF, ki masni spekter preiskovanega mikroba računalniško primerja z masnim spektrom referenčnih mikrobov v bazi podatkov aparata (Schäfer in sod., 2014; Singhal in sod., 2015). Metoda je zanesljiva, hitra, poceni in naj bi omogočala tudi razlikovanje genotipov ERIC I in II (Schäfer in sod., 2014).

Bolezen povzroča veliko gospodarsko škodo v kmetijstvu v Sloveniji in povsod po svetu. Najučinkovitejši ukrep za uspešno zatiranje HGČZ je uspešno preprečevanje širjenja bolezni. V Sloveniji je po Pravilniku o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje HGČZ vsak sum na bolezen potrebno sporočiti veterinarjem ZVČ na regionalnih enotah NVI, ki pregledajo sumljive čebelje družine in odvzamejo vzorce za bakteriološko preiskavo na *P. larvae*. Z izolacijo povzročitelja na gojiščih se sum potrdi. Odredi se neškodljivo uničenje ali

---

pretresanje čebeljih družin in dezinfekcija čebelarskega pribora. UVHVVR izda odločbo o vzpostavitvi okuženega območja - kužnega kroga v pasu 3 km od okuženega čebelnjaka oziroma v odvisnosti od konfiguracije terena v preletni razdalji čebel. Odredi se prepoved premikov čebel iz in v kužni krog. Veterinarji ZVČ morajo vse čebelnjake v kužnem krogu pregledati na klinične znake HGČZ. Čebelarji, ki imajo negativen rezultat kliničnega pregleda čebel in negativen rezultat letnega pregleda drobirja na prisotnost spor *P. larvae*, lahko na podlagi dovoljenja UVHVVR čebele premaknejo iz kužnega kroga (Pravilnik, 2020).



### 3 MATERIALI IN METODE

V raziskavo smo vključili 1245 shranjenih izolatov *P. larvae*, pridobljenih iz 293 čebelnjakov, ki jih je oskrbovalo 254 čebelarjev v letih od 2017 do 2019.

#### 3.1 Vzorčenje in zbiranje izolatov *P. larvae* z epidemiološkimi podatki

Izolate *P. larvae* smo pridobivali sproti ob izbruhih HGČZ in ob rednem monitoringu medu. Izolirali smo jih iz brisov spremenjene zalege in iz spor v medu. Vzorčili so strokovnjaki za zdravstveno varstvo čebel (ZVČ) NVI VF. V raziskovalne namene smo izolate shranjevali v zbirki izolatov na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani. V letih 2017 – 2019 smo v zbirko shranili večino izolatov pridobljenih iz izbruhov HGČZ iz vzorcev spremenjene zalege in medu.

**Tabela 1:** Število shranjenih izolatov *P. larvae* po letih

**Table 1:** The number of saved isolates of *P. larvae* per year

| Leto   | Izolati <i>P. larvae</i> iz<br>zalege | Izolati <i>P. larvae</i> iz<br>medu | Skupaj |
|--------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------|
| 2017   | 186                                   | 139                                 | 325    |
| 2018   | 238                                   | 111                                 | 349    |
| 2019   | 340                                   | 231                                 | 571    |
| Skupaj | 764                                   | 481                                 | 1245   |

Hkrati z izolati smo shranjevali tudi epidemiološke podatke, ki so jih pridobili vzorčevalci - strokovnjaki za zdravstveno varstvo čebel. Za vsak izolat *P. larvae* smo shranili naslednje podatke: Ime in priimek čebelarja ter KMG-MID čebelarja, naslov in občina čebelarja, datum odvzema vzorca, datum sprejema vzorca na enoto NVI, vzorčevalec, vrsta vzorca (zalega oz. med), številka zapisnika in številke vzorcev iz sistema EPI, oznake panjev, v katerih so bili vzorci odvzeti, datum začetka in konca preiskave in enota NVI, kjer se je bakteriološka preiskava opravljala, območni urad UVHVVR, pod katerega spada čebelar. Na podlagi KMG-MID čebelarstva smo si pridobili in shranili tudi x in y koordinate čebelnjakov. Shranjujemo tudi podatke o morfotipih kolonij *P. larvae*, ter podatke, v kateri kužni krog naj bi čebelar spadal. Ker se kužni krogi med sabo lahko časovno in prostorsko prekrivajo so ti podatki okvirni.

### 3.2 Priprava anketnega vprašalnika in obdelava podatkov

Za preučitev zakonitosti širjenja okužb s *P. larvae* in pojavnosti različnih kliničnih znakov v odvisnosti od genotipa ERIC v slovenskih čebelarstvih smo za čebelarje in veterinarje za ZVČ pripravili anketni vprašalnik.

Prvi del vprašalnika je bil namenjen čebelarjem. Vseboval je vprašanja o čebelarju (osebne podatke o čebelarju, njegovo izobrazbo, izkušnje in namen čebelarjenja), o čebelarstvu (število čebeljih družin, promet s čebelami ter prevoze na pašo v preteklih treh letih, tehnologijo čebelarjenja, čebelarjeva ocena razmer čebelnjaka in biovarnosti) in o zdravju čebel (prisotnost znakov HGČZ, druge bolezni, zdravljenje).

Drugi del vprašalnika je bil namenjen veterinarjem za ZVČ, ki so vprašalnik prinesli čebelarjem ob pregledu njihovega čebelnjaka. Veterinarji so v drugem delu vprašalnika opredelili vzrok pregleda čebelnjaka, s svojega stališča ocenili razmere in biovarnost v čebelnjaku in podrobno opisali klinične znake, ki so jih opazili.

Anketni vprašalniki so se izpolnjevali v letu 2019. V anketi so sodelovali predvsem čebelarji znotraj kužnih krogov v letu 2019, ki so jim veterinarji za ZVČ pregledovali čebelje družine na prisotnost HGČZ. Za zadostno število čebelarstev negativnih na HGČZ je bila anketa izvedena tudi pri čebelarjih izven kužnih krogov.

### 3.3 Statistična obdelava podatkov

Podatke iz vprašalnikov smo dopolnili s podatki o genotipih ERIC za izolate *P. larvae*, izolirane iz brisov spremenjene zalege čebeljih družin in/ali medu. Statistično smo podatke analizirali s programom R v3.6.2 (R Core Team; <https://www.r-project.org/>). Številске podatke smo opisali z osnovnimi opisnimi statistikami, opisne podatke pa s frekvencami in deleži. Testirali smo razlike med HGČZ-pozitivnimi in negativnimi čebelnjaki ter med tipoma ERIC I in II. Normalnost porazdelitve številskih spremenljivk smo testirali s Shapiro-Wilk testom. Ker spremenljivke niso bile normalno porazdeljene, smo za primerjave med skupinami uporabili neparametrični Wilcoxonov test vsote rangov. Povezanost opisnih spremenljivk s statusom čebelnjaka ali s tipom ERIC smo ugotavljali s hi-kvadrat testom, ko je bila izpolnjena predpostavka o pričakovanih frekvencah ali Fisherjevim eksaktnim testom. Merilo za statistično značilnost je bila vrednost  $p < 0,05$ .

### **3.4 Bakteriološka preiskava spremenjene zalege in medu na *P. larvae***

Izolacija *P. larvae* je bila opravljena po standardnem operativnem postopku Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani in je povzeta iz priročnika mednarodne organizacija za zdravje živali (OIE Terrestrial Manual, 2018).

#### **3.4.1 Bakteriološka preiskava spremenjene zalege**

Brise klinično spremenjene zalege smo nasadili direktno na trdna gojišča BHIA (angl. *Brain Heart Infusion Agar*; Oxoid) z ovčjo krvjo, tiaminom in nalidiksinsko kislino ter na krvni agar (KA; angl. *Blood Agar Base*; Oxoid). Plošče smo inkubirali aerobno 2–7 dni pri 37 °C. Pri prognozi, kdaj bodo kolonije zrastle, nam je bil v veliko pomoč po Gramu pobarvan bris materiala spremenjene čebelje zalege, ki smo ga pregledali pod mikroskopom že ob začetku preiskave. Naše izkušnje kažejo, da prisotnost številnih vegetativnih oblik bacilov ob manjšem številu spor napoveduje hiter začetek rasti *P. larvae* na BHIA in krvnem agarju že po 24-urni inkubaciji.

#### **3.4.2 Bakteriološka preiskava medu**

Vzorci medu smo pred nasajanjem na gojišče segreti na 45–50 °C, da je postal bolj tekoč. V sterilno centrifugirko smo odtehtali 50 g medu. Dodali smo 150 ml tople vode in dobro premešali, da smo dobili homogeno suspenzijo, ki smo jo centrifugirali 30 min pri 4.000 g (Multifuge 1 S-R, Heraeus). Po centrifugiranju smo supernatant previdno odlili in na dnu centrifugirke pustili 1–2 ml sedimenta. Sediment smo premešali in ga 1 ml odpipetirali v sterilno epruveto. Dodali smo 9 ml sterilne fiziološke raztopine ter homogenizirali (suspenzija 1). Za uničenje vegetativnih bakterij v medu smo suspenzijo 10 min segrevali pri 80 °C. S sterilno fiziološko raztopino smo pripravili še dve zaporedni 10-kratni redčitvi suspenzije 1 (suspenziji 2 in 3).

Po 500 µl vseh treh pripravljenih razredčin suspenzij smo nasadili na trdno gojišče BHIA z ovčjo krvjo, tiaminom in nalidiksinsko kislino. Plošče smo inkubirali aerobno 2–7 dni pri 37 °C. Rast kolonij *P. larvae* iz vzorcev medu je bila odvisna od časa vzklitja spor, zato so bile lahko kolonije na gojišču različno velike.

### **3.5 Identifikacija izolatov *P. larvae***

Glede na morfologijo smo zrasle kolonije na BHIA in KA ocenili kot sumljive na bakterijo *P. larvae*. Posebej smo bili pozorni na barvo, robove in tipičen vonj kolonij. V primeru istega morfotipa smo presadili po eno kolonijo na novo gojišče za pridobitev čiste kulture. Če so na

gojišču zrasli različni morfortipi smo na novo gojišče presadili do 5 kolonij, ki smo jih nato pregledali z barvanjem po Gramu in katalaznim preizkusom.

### 3.5.1 Identifikacije izolatov *P. larvae* s Plagemannovim testom

V laboratoriju NVI Maribor – Ptuj smo izolate *P. larvae* determinirali s Plagemannovim testom. Sumljivo kolonijo smo presadili na poševnik BHIA in ga inkubirali za 24 – 72 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo v tekočini poševnika pod mikroskopom ugotavljali za *P. larvae* značilne velike bičke.

### 3.5.2 Identifikacija izolatov *P. larvae* z masno spektrometrijo MALDI-TOF

Za hitrejšo identifikacijo *P. larvae* smo validirali metodo masne spektrometrije MALDI-TOF. Tehnologija MALDI-TOF temelji na računalniški primerjavi masnega spektra preiskovanega izolata s spektri referenčnih bakterij v bazah podatkov aparature, bakterijsko vrsto pa lahko zanesljivo določimo že v nekaj minutah (Singhal in sod., 2015).

Za vpeljavo in validacijo metode za identifikacijo bakterije *P. larvae* z masno spektrometrijo MALDI-TOF (Bruker Daltonics) smo uporabili referenčne kulture *P. larvae* tipov ERIC I–V (ERIC I - ATCC 9545, ERIC II - CCUG 49660A, ERIC III - LMG 16252, ERIC IV - ATCC 49843 in ERIC V - DSM 106052). Z istimi referenčnimi kulturami je bila pripravljena tudi podatkovna zbirka v pripadajoči programski opremi. Skupaj z referenčnimi sevi smo v postopku validacije testirali 50 izolatov iz arhivske zbirke IMP VF, ki so bili na podlagi morfoloških in biokemijskih lastnosti že zanesljivo determinirani kot bakterija *P. larvae*. Kot negativno kontrolo smo uporabili preverjene kulture iz rodu *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus* in *B. licheniformis*), ki so sorodni rodu *Paenibacillus*.

Po vpeljavi metode smo vse izolate *P. larvae* identificirali z masno spektrometrijo MALDI-TOF po navodilih proizvajalca (Bruker Daltonics). Z zanko smo nanesti del bakterijske kolonije na označeno površino testne ploščice in jo posušili pri sobni temperaturi. Na suho kulturo smo dodali reagent (matriks HCCA; Sigma–Aldrich, Merck) in počakali, da se je posušil. Nato smo ploščico vstavili v aparaturo, kjer je analizator odčital komponente, ki so predstavljale beljakovinski masni spekter preiskovanega izolata. Za interpretacijo rezultatov smo uporabili programsko opremo MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics). Rezultati so bili glede ustreznosti vrste in rodu razvrščeni po barvni lestvici (zelena, rumena, rdeča) ter ovrednoteni s kategorijami (v primeru identifikacije do bakterijske vrste s kategorijo A – zelena barva).

### **3.6 Shranjevanje izolatov *P. larvae* po identifikaciji**

Po identifikaciji z masno spektrometrijo MALDI-TOF smo čiste kulture *P. larvae* prenesli v posebne vial, ki vsebujejo porozne kroglice in kriokonzervans (Microbank Pro-Lab Diagnostics). Vial smo dobro premešali, da se je v luknjice kroglic ujel kriokonzervans s celicami *P. larvae*. Preostanek tekočine smo odpipetirali in zavrgli. Kroglice smo enakomerno porazdelili po viali in jih shranili pri  $-70^{\circ}\text{C}$  v zbirki izolatov na IMP, VF za namen nadaljnjih analiz.

### **3.7 Tipizacija izolatov *P. larvae* z metodo ERIC**

Za tipizacijo bakterije *P. larvae* je splošno razširjena metoda ERIC-PCR, na podlagi katere so izolati *P. larvae* doslej razvrščeni v pet tipov, glede na značilne profile pomnožkov.

#### **3.7.1 Izbor izolatov za tipizacijo ERIC**

Iz zbirke izolatov *P. larvae* smo na podlagi spremljajočih podatkov izbrali izolate, ki smo jim določili ERIC genotip. Izolate smo izbrali tako, da smo tipizirali vsaj en izolat vsakega čebelarja, ki je bil pozitiven na *P. larvae* v zalegi ali medu v letih 2017 - 2019. Prednost smo dali izolatom iz zalege, ker le-ti pomenijo, da so v čebelnjaku povzročili HGČZ s kliničnimi znaki. Tipizirali smo tudi po en izolat iz medu iz potrjenega čebelnjaka, če je bil na voljo. Prav tako smo tipizirali samo izolat iz medu, če izolata iz klinično bolne zalege ni bilo. Več tipov ERIC smo določili izolatom, ki naj bi sodili v isti kužni krog in naj bi bili po epizootioloških podatkih, ki so nam jih pridobili vzorčevalci, povezani.

#### **3.7.2 Izolacija DNA iz bakterijskih kultur *P. larvae* za tipizacijo z metodo ERIC**

DNA iz čistih bakterijskih kultur *P. larvae* smo izolirali s kompletom 'DNA isolation from complex samples' (IMMT, Institute of Metagenomics and Microbial Technologies Slovenija) po navodilih proizvajalca, po prilagojenem protokolu s skrajšanimi časi inkubacije in centrifugiranja, saj se je običajen protokol s segrevanjem in centrifugiranjem med samim postopkom tipizacije ERIC izkazal kot neprimeren.

Za izolacijo DNA iz izolatov odbranih za tipizacijo WGS, smo uporabili drug komplet in način izolacije DNA, da smo zagotovili DNA zadostne kakovosti in integritete za izvedbo metode WGS, ki je primerna tudi za tipizacijo ERIC.

### 3.7.3 Tipizacija izolatov *P. larvae* z metodo ERIC-PCR

Tipizacijo ERIC smo izvedli po predhodno opisanem protokolu (Genersch and Otten, 2003; Genersch et al., 2006), ki smo ga optimizirali, da je omogočal analizo s kapilarno elektroforezo. Prilagodili smo koncentracijo začetnih oligonukleotidov (Versalovic in sod., 1994) in izbor DNA polimeraze. Reakcijska mešanica (25 µl) je vsebovala 1 × 'Multiplex PCR Master Mix' (Qiagen), 2 µM vsakega začetnega oligonukleotida in 5 µl izolirane DNA. Pomnožke smo analizirali s kapilarno elektroforezo QIAxcel (Qiagen), s kartušo 'QIAxcel DNA High Resolution Kit'. Uporabili smo program ločevanja OM500 in čas injiciranja 10 s. Pri ločevanju smo uporabili velikostni marker 'QX Alignment Marker 15–5000 bp' in poravnalni marker 'QX Size Marker 100–2500 bp' (oba Qiaxcel).

## 3.8 Tipizacija izolatov *P. larvae* z metodo WGS

### 3.8.1 Nabor izolatov *P. larvae* za WGS

Ker smo pri ERIC tipizaciji ugotovili dva spremenjena tipa ERIC, smo za ugotavljanje sorodnosti in klonalnih razmerij med izolati *P. larvae* v izbruhih HGČZ izbrali 59 izolatov *P. larvae*. 38/59 izolatov je imelo spremenjen ERIC vzorec. Izolati so bili odbrani iz 29 čebelnjakov, ki jih je vzdrževalo 27 čebelarjev. Izbrali smo jih iz 13 različnih kužnih krogov po Sloveniji.

### 3.8.2 Izolacija DNA iz bakterijskih kultur *P. larvae* za tipizacijo WGS in izvedba WGS

DNA smo iz nabora 59 izolatov *P. larvae* za tipizacijo WGS izolirali s kompletom 'DNeasy Blood & Tissue Kit' (Qiagen) po protokolu za Gram-pozitivne bakterije po navodilih proizvajalca. Po izolaciji smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili integriteto DNA. S fluorometrom Qubit 3.0, za katerega smo uporabili komplet 'Qubit 1 × dsDNA High-Sensitivity Assay Kit'; Thermo Fisher Scientific smo preverili koncentracijo izolirane DNA. Izolate so sekvencirali v sekvencijskem centru Oxford Genomics Centre (Združeno kraljestvo) s kompletom 'NEBNext Ultra DNA Sample Prep Master Mix Kit' (NEB) in tehnologijo Illumina (2 × 150 bp) na aparaturi NovaSeq 6000 System (Illumina) do minimalne pokritosti 130 ×.

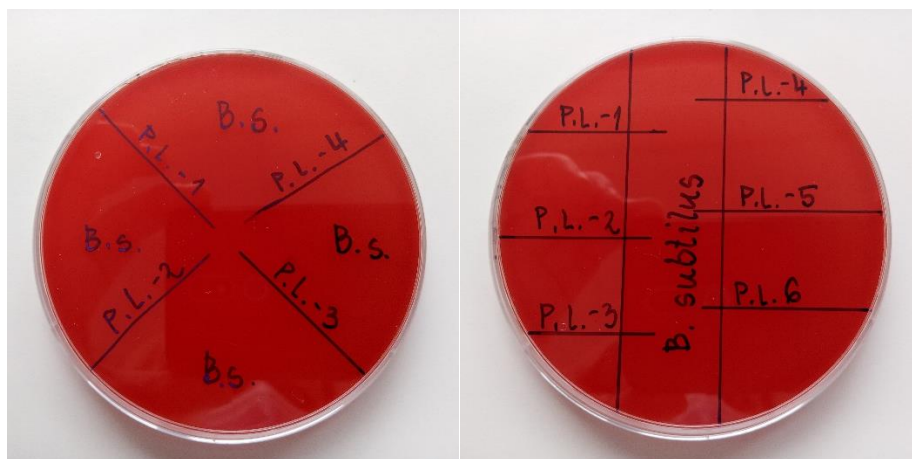
## 3.9 Ugotavljanje inhibitornih snovi *P. larvae* z neposrednim nasajanjem dveh kultur na krvni agar

Inhibitorne snovi smo orientacijsko ugotavljali z metodo neposrednega nasajanja različnih sevov *P. larvae* ob kulturo *B. subtilis*, ki je referenčni mikroorganizem za ugotavljanje

zaviralnih substanc (*B. subtilis* spore suspension for inhibition test, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija).

Kolonijo *B. subtilis* smo zmešali v 5 ml PFR – gostote 0,5 po McFarlandu. Suspenzijo smo z vatenko nanesti na površino krvnega agarja. Čez kulturo smo v obliki črt nasadili različne izolate *P. larvae* in plošče inkubirali pri 37°C za 24 ur. Po inkubaciji smo na ploščah preverili rast *P. larvae* in ob njem cono inhibicije rasti *B. subtilis*.

*B. subtilis* smo v obliki črte nasadili na krvni agar. Pravokotno na *B. subtilis* smo nasadili različne izolate *P. larvae* in plošče inkubirali na 37°C za 24 ur. Po inkubaciji smo na ploščah preverili cono inhibicije rasti *B. subtilis* v bližini *P. larvae*.



**Slika 4:** Ugotavljanje inhibitornih snovi *P. larvae* z neposrednim nasajanjem dveh kultur na krvni agar.

**Figure 4:** Detecting inhibitory substances of *P. larvae* by direct culturing of two bacteria on blood agar.

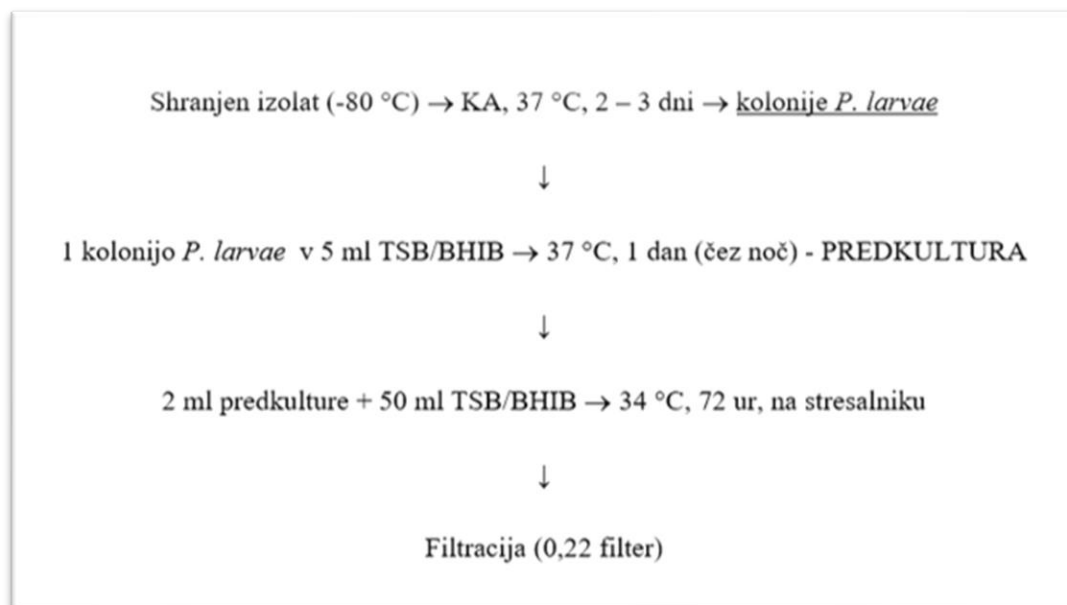
### 3.10 Izolacija inhibitornih snovi *P. larvae*

#### 3.10.1 Kultivacija *P. larvae* za izolacijo inhibitornih snovi

Izolat *P. larvae* shranjen pri -70°C smo oživel na krvnem agarju. Kroglico iz zamrznjene kulture smo sadili na krvni agar in ga inkubirali pri 37°C za 2 – 3 dni, da so zrasle kolonije *P. larvae*. Eno kolonijo *P. larvae* smo zamešali v 5 ml srčkovega bujona z nalidiksinsko kislino in tiaminom (Brain heart infusion broth – BHIB, proizvajalec) in v 5 ml sojinega triptoznega bujona (Soy – triptose broth – TSB) ter ga 24 ur inkubirali pri 37°C. Na ta način smo dobili predkulturo *P. larvae*, iz katere smo 2 ml cepili v 50 ml TSB/BHIB. Bujon smo s stalnim stresanjem inkubirali pri 34° C 72 ur.

### 3.10.2 Pregled filtrata *P. larvae*

Po inkubaciji smo kulturo na bujonu pregledali pod mikroskopom, kjer smo ugotavljali prisotnost bacilov. Kulturo smo nato filtrirali skozi filter 0,22, da smo odstranili bakterije. Za kontrolo filtracije smo filtrat nasadili na KA in ga 2 do 3 dni inkubirali pri 37°C. Filtracija je bila uspešna, če na KA po 3 dneh ni zrastle nobena kolonija. Filtrat smo uporabili za ugotavljanje prisotnosti inhibitornih snovi z difuzijsko metodo.



**Slika 5:** Shematski prikaz izolacije inhibitornih snovi *P. larvae*

**Figure 5:** Schematic view of *P. larvae* inhibitory substances isolation

### 3.11 Testiranje inhibitorne učinkovitosti *P. larvae*

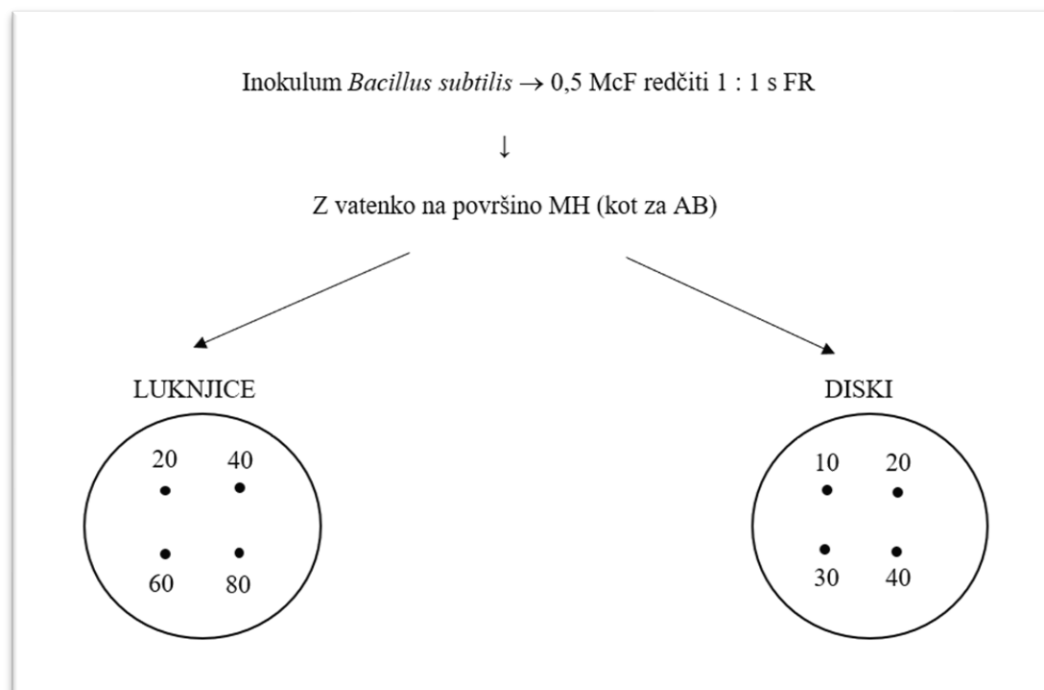
Inhibitorno učinkovitost *P. larvae* smo testirali na:

- po Gramu pozitivnih bakterijah: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*
- po Gramu negativnih bakteriji: *Escherichia coli*
- kvasovki: *Malassezia pachydermatis*.

Suspenzijo testne bakterije, gostote 0,5 po McFarlandu, redčeno s fiziološko raztopino v razmerju 2:1, smo s sterilno vatenko nanесли na površino plošče agarja Mueller Hinton (MH).



Suspenzijo testne kvasovke, gostote 0,5 po McFarlandu, redčeno s fiziološko raztopino v razmerju 2:1, smo s sterilno vatenko nanesli na površino gojišča Sabouraud dekstrozni agar (SDA).



**Slika 6:** Testiranje inhibitorne učinkovitosti *P. larvae* z difuzijsko metodo

**Figure 6:** Testing of inhibitory effectiveness of *P. larvae* with diffusion method

### 3.11.1 Difuzijska metoda s papirnatimi diski

Filtrirne vpojne papirnate diske smo sterilizirali in jih po štiri nanesli na površino gojišča MH oz. SDA, inokulirano s testno bakterijo. Na diske smo nanesli različne volumne supernatanta *P. larvae* iz točke 3.6.1. Na eni plošči smo testirali 10 µl, 20 µl, 30 µl in 40 µl supernatanta *P. larvae* in jih inkubirali pod pogoji za rast testne bakterije, večinoma 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo ugotavljali območje inhibicije rasti testne bakterije oziroma kvasovke.

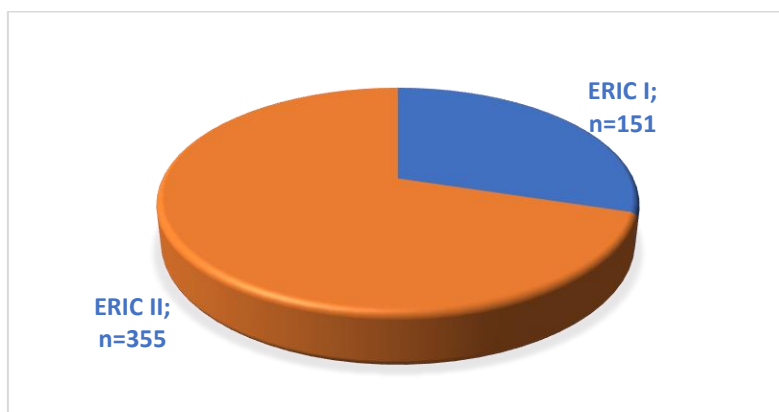
### 3.11.2 Difuzijska metoda z luknjicami

V agar MH, inokuliran s testno bakterijo, smo z zadnjim koncem sterilne kirurške igle izrezali po 4 luknjice. V luknjice smo nanesli 20 µl, 40 µl, 60 µl in 80 µl supernatanta *P. larvae* in plošče inkubirali pod pogoji za rast testne bakterije, večinoma 24 ur na 37 °C. Po inkubaciji smo ugotavljali območje inhibicije rasti testne bakterije.

## 4 REZULTATI

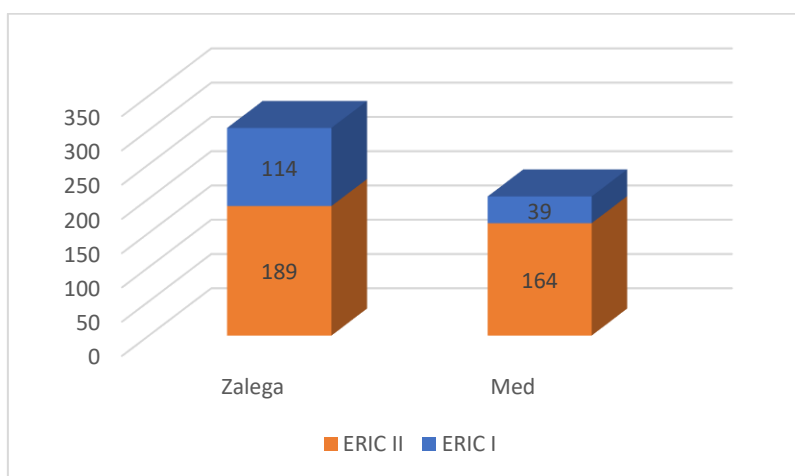
### 4.1 Tipizacija z metodo ERIC

Tipizirali smo 506 izolatov *P. larvae*, pridobljenih iz 303 vzorcev spremenjene zalege in 203 vzorcev medu, ki je vseboval spore *P. larvae*. Izolati so bili pridobljeni v letih 2017 – 2019. Vzorci so bili iz 263 čebelnjakov, ki jih je vzdrževalo 232 čebelarjev iz različnih regij Slovenije. Iz 107/263 čebelnjakov smo ERIC tipizirali več kot en izolat *P. larvae* na čebelnjak (2 – 16 izolatov/čebelnjak). Na izbor več izolatov je vplivala velika gostota čebelnjakov v kužnem krogu ali ugotovljen spremenjen vzorec ERIC I tipa. Pri 8/107 čebelnjakov smo ugotovili mešano okužbo z ERIC I in ERIC II. Ugotovili smo, da pri vseh tipiziranih izolatih *P. larvae* prevladuje genotip ERIC II (70,2% - 355/506). Genotip ERIC II prevladuje tako v zalegi (62,4% - 189/303) kot v medu (80,8% - 164/203).



**Slika 7:** Pojavljanje genotipov ERIC v izolatih *P. larvae* v Sloveniji v letih 2017 – 2019

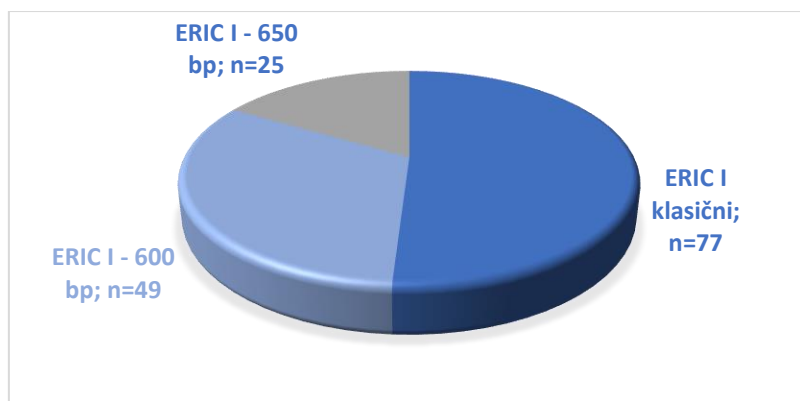
**Figure 7:** Occurrence of ERIC genotypes among Slovenian *P. larvae* isolates in 2017 – 2019



**Slika 8:** Pojavljanje genotipov ERIC v vzorcih zalege in medu

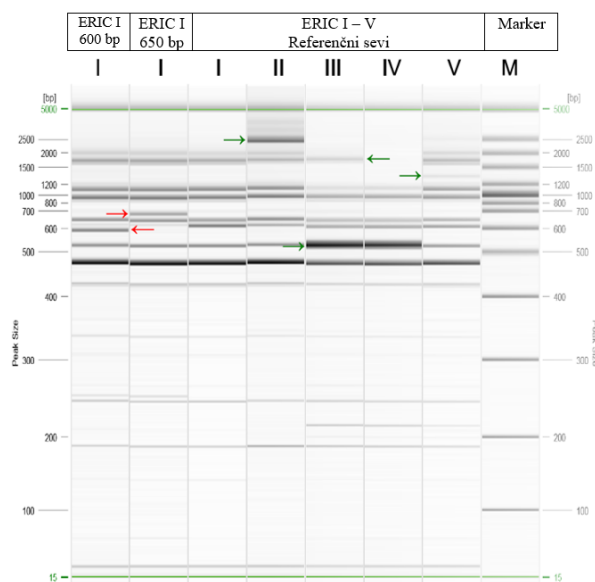
**Figure 8:** Occurrence of ERIC genotypes in brood and honey samples

Genotip ERIC I je predstavljal 29,8% - 151/506 tipiziranih izolatov. 74/151 izolatov genotipa ERIC I, je kazalo nekoliko spremenjen vzorec ERIC I: (i) 49 izolatov je imelo dodaten pas pri 600 bp, (ii) 25 izolatov pa je imelo dodaten pas pri 650 bp. Za genotip ERIC II smo ugotovili značilen pas pri 2800 bp, ki je pri genotipu ERIC I manjkal. ERIC tipizirali smo tudi referenčne seve vseh petih genotipov ERIC in s kapilarno elektroforezo prikazali za posamezen genotip ERIC značilne pasove.



**Slika 9:** Ugotovljeni genotipi ERIC I v Sloveniji

**Figure 9:** Detected ERIC I genotypes in Slovenia



**Slika 10:** ERIC profili, pridobljeni z ločevanjem pomnožkov DNA s kapilarno elektroforezo. Z rdečima puščicama sta označena pomnožka, ki se razlikujeta od klasičnega ERIC I. Z zelenimi puščicami so označeni pomnožki značilni za posamezne ERIC tipe.

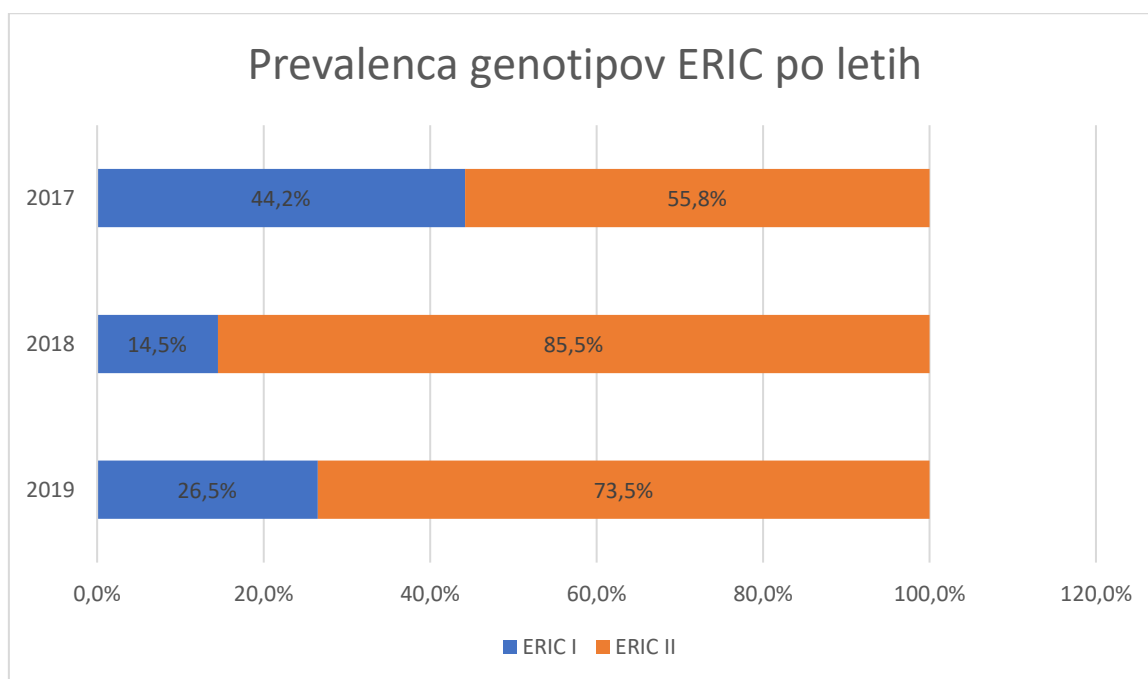
**Figure 10:** ERIC profiles from capillary electrophoresis. Red arrows pointing at bands different from conventional ERIC I. Green arrows pointing at ERIC genotype specific bands.

Za izračun prevalence genotipov ERIC smo upoštevali 271 vseh izolatov - po eden izolat na čebelnjak in dodatnih osem, kjer je bila ugotovljena mešana okužba z genotipoma ERIC I in II.

**Tabela 2:** Prevalenca genotipov ERIC v Sloveniji po letih

**Table 2:** Annual prevalence of ERIC genotypes in Slovenia

| Leto | Število izolatov | ERIC II (%) | ERIC I (%) |
|------|------------------|-------------|------------|
| 2017 | 86               | 55,8        | 44,2       |
| 2018 | 83               | 85,5        | 14,5       |
| 2019 | 102              | 73,5        | 26,5       |



**Slika 11:** Prevalenca genotipov ERIC v Sloveniji po letih

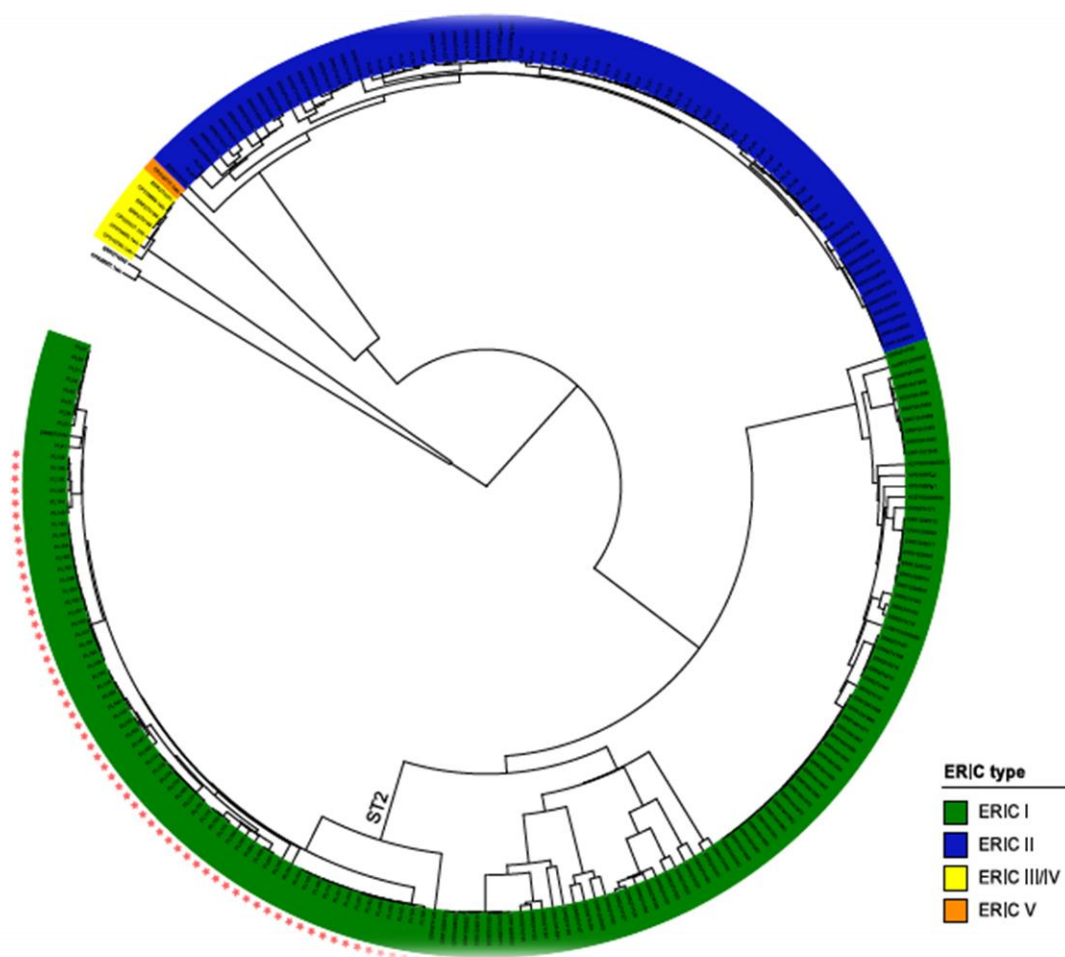
**Figure 11:** Annual prevalence of ERIC genotypes in Slovenia

## 4.2 Tipizacija izolatov *P. larvae* z metodo WGS

Za ugotavljanje filogenije in klonalnih razmerij med izolati *P. larvae* v izbruhih HGČZ z genotipom ERIC I smo 59 izolatov genotipa ERIC I (38/59 izolati s spremenjenim ERIC I profilom) analizirali celoten genom. Izolati so bili pridobljeni iz 29 čebelnjakov, ki jih je vzdrževalo 27 čebelarjev in so pripadli 13 različnih kužnim krogom po Sloveniji.

Z metodo MLST, kjer smo analizirali sedem hišnih genov, je vseh 59 izolatov pripadalo sekvenčnemu tipu ST2.

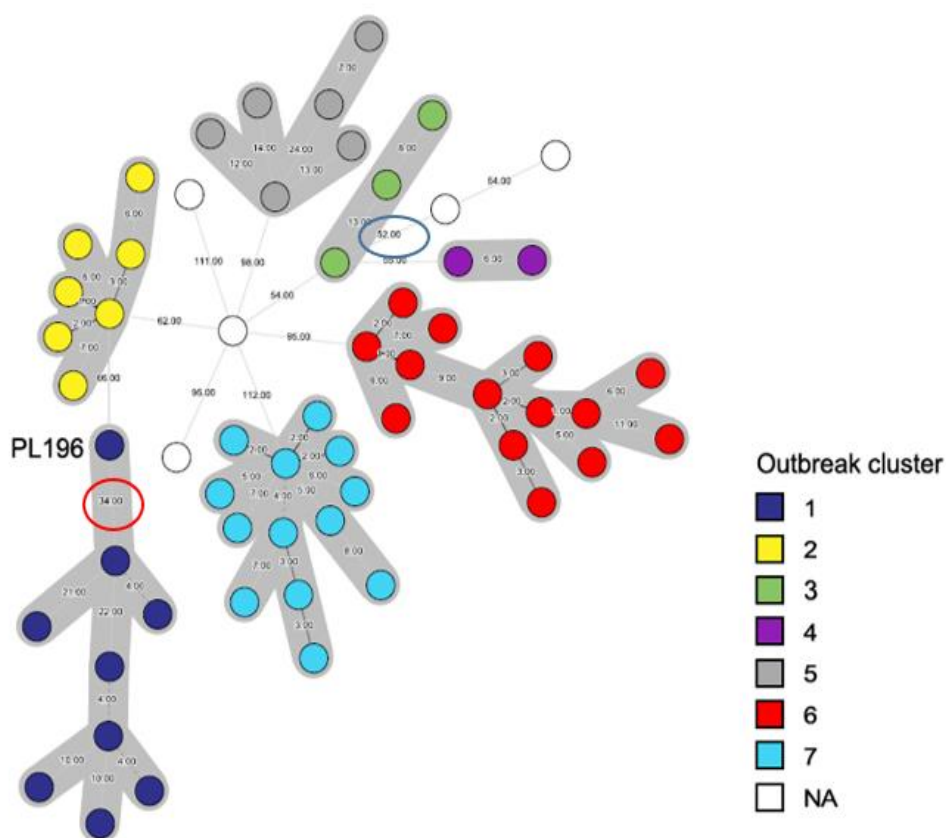
Z wgMLST analizo celotnega genoma smo genome 59 izolatov ERIC I iz naše raziskave primerjali s 179 v javnih zbirkah objavljenimi genomi *P. larvae*. Analiza je bila opravljena na 5738 wgMLST lokusih. Vseh 59 genomov se je v filogenetskem drevesu razvrstilo v klad ERIC I in gručo ERIC I-ST2.



**Slika 12:** Filogenetsko drevo. Razvrstitev izolatov (rdeče zvezdice) v klad ERIC I in gručo ERIC I-ST2.

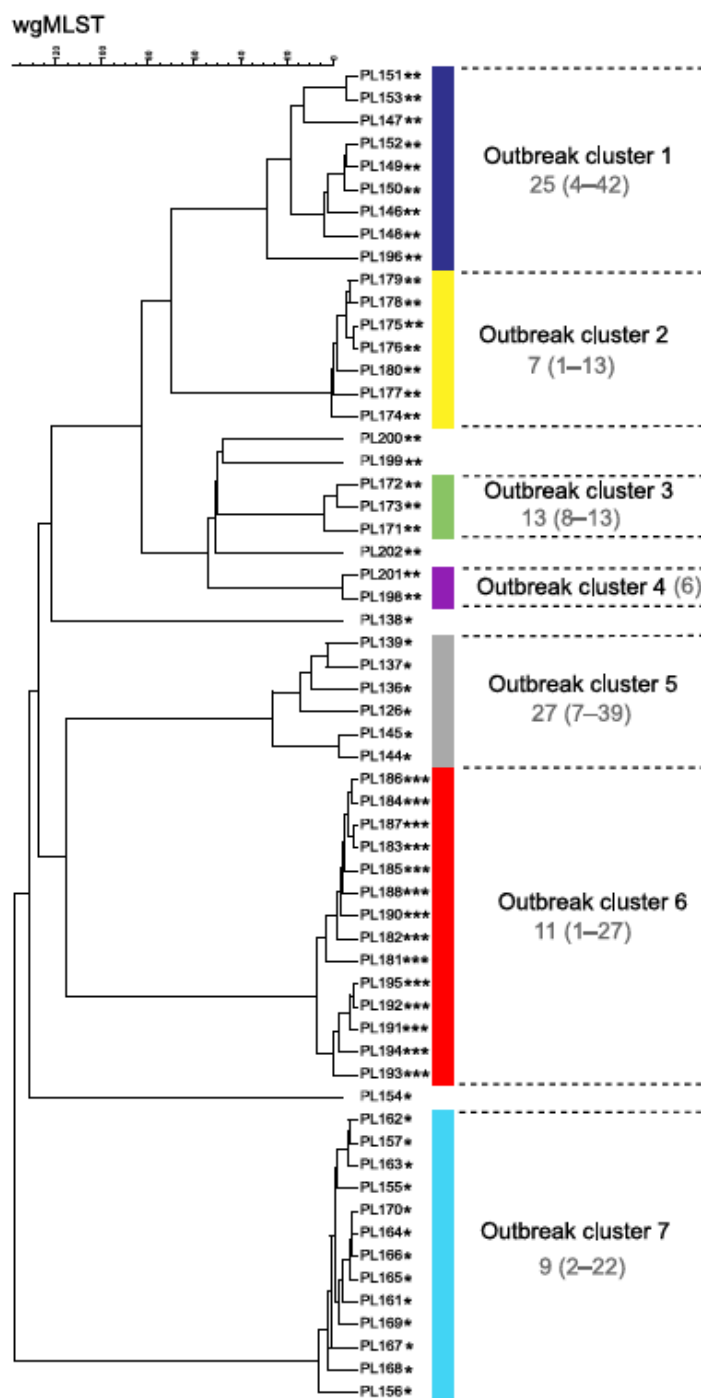
**Figure 12:** Phylogenetic tree. Classification of isolates (red stars) within ERIC I clade and ERIC I-ST2 cluster.

Na podlagi mejne razlike v alelih (35 AD) smo pri 59 izolatih ugotovili sedem gruč povezanih izolatov, kar smo na podlagi epidemioloških podatkov lahko povezali v sedem izbruhov bolezni: (i) štirje izbruhi z genotipom ERIC I, ki je vseboval dodaten pas pri 600 bp; (ii) dva izbruha s »klasičnim« genotipom ERIC I in (iii) en izbruh z genotipom ERIC I, ki je vseboval dodaten pas pri 650 bp. Pet izolatov ni pripadlo nobenemu izmed izbruhov bolezni.



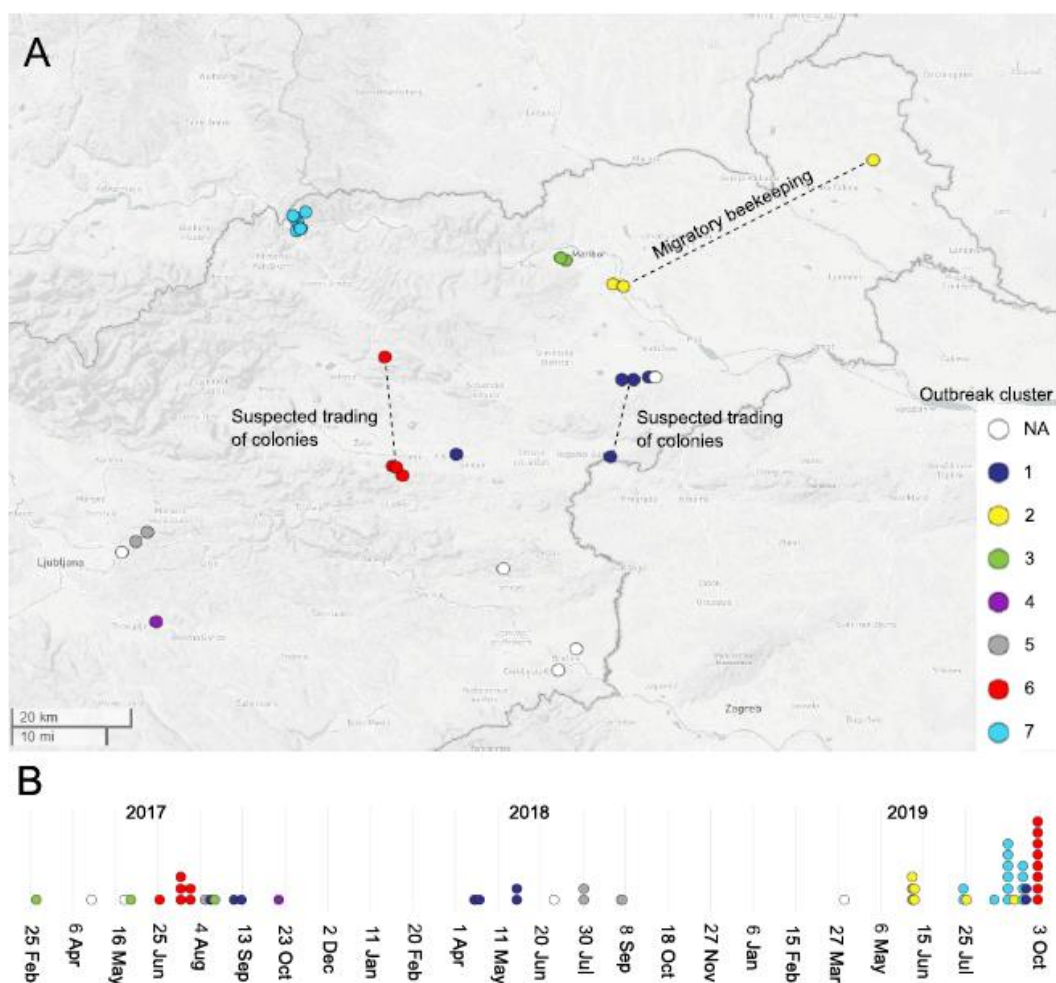
**Slika 13:** Minimalno vpeto drevo. Pri 59 izolatih smo ugotovili sedem gruči izolatov, povezanih z izbruhom bolezni (različne barve), pet izolatov ni pripadlo nobeni gruči (bela barva). Minimalna razlika med z izbruhom povezanim in nepovezanim izolatom je bila 52 razlik v alelih (AD) - obkroženo modro. Maksimalna razlika med izolati, ki so pripadali isti gruči je bila 34 AD (obkroženo rdeče), zato smo za razlikovanje med z izbruhom povezanim oziroma nepovezanim izolatom določili mejno razliko v alelih – 35 AD.

**Figure 13:** wgMLST minimum spanning tree. Seven outbreak clusters were identified (different colors), five isolates did not fall within any of the identified outbreak clusters (white color). The minimum distance between the outbreak-related and nonrelated isolates was 52 allele differences (AD) – circled blue. The maximum distance between isolates belonging to the same outbreak cluster was 34 AD (circled red), so for distinction between the outbreak-related and nonrelated isolates the threshold of 35 AD was determined.



**Slika 14:** UPGMA wgMLST drevo. Na desni so povprečne (min. – max.) razlike v alelih med izolati v posamezni gruči. Izolati označeni z \* pripadajo klasičnemu genotipu ERIC I, z \*\* genotipu ERIC I z dodatnim pasom pri 600bp, z \*\*\* pa pripadajo genotipu ERIC I z dodatnim pasom pri 650 bp.

**Figure 14:** UPGMA wgMLST tree. Right site of the tree is showing median pairwise (min. – max.) allele differences between the isolates of the same outbreak cluster. \* Isolates exhibiting a conventional ERIC I banding pattern, \*\* isolates exhibiting ERIC I pattern with an additional 600-bp band, \*\*\* isolates exhibiting ERIC I pattern with an additional 650-bp band.



**Slika 15:** Geografski (A) in časovni (B) prikaz preiskanih izbruhov HGČZ z *P. larvae* genotipom ERIC I-ST2 v letih 2017 - 2019. Krogi prikazujejo čebelnjak (A) oziroma izolat (B) in so pobarvani glede na gručo izbruha bolezni. Primerov označenih z belimi krogi nismo povezali z nobenim izbruhom.

**Figure 15:** Spatial (A) and temporal (B) distribution of investigated outbreak-related ERIC I-ST2 isolates in years 2017 to 2019. Circles represent an apiary (A) or isolate (B) and is colored according to the corresponding outbreak cluster. White circles were isolates without an assigned outbreak cluster.

Pri vseh sedmih izbruhih bolezni smo z metodo wgMLST dokazali prenos znotraj kužnega kroga, v polmeru 3 km pasu okoli izbruha bolezni, kar je opredeljeno skladno s preletno razdaljo čebel. Pri treh izbruhih smo z metodo wgMLST dokazali prenos na daljše razdalje – med kužnimi krogi. Pri teh izbruhih je bolezen s prevozom čebel na pašo in s prodajo oziroma nakupom čebeljih družin prenašal sam čebelar. Pri dveh izbruhih smo ugotavljali izolate *P. larvae* tako iz zalege kot iz medu v vseh treh letih študije, 2017 – 2019. Pri petih izbruhih so se izolati pojavljali v enem letu (2x v 2017, 1x v 2018, 2x v 2019).

V osmih primerih smo v enem čebelnjaku odkrili mešano okužbo z ERIC I in ERIC II, tako v zalegi, kot v medu.



### 4.3 Morfotipi kolonij *P. larvae*

Pri izolaciji *P. larvae* smo ugotovili rast v obliki treh tipov kolonij: (i) sive hrapave kolonije, (ii) sive gladke kolonije in (iii) pigmentirane kolonije. Pigmentacija kolonij je bila različna. Največkrat smo ugotavljali oranžen rob, pojavljale pa so se tudi kolonije, ki so imele oranžen center, rdeče ali temno rdeče kolonije. Ugotovili smo, da so se nekatere sive gladke kolonije kot sveža kultura po 7 dneh spremenile v pigmentirane kolonije. Opazili smo tudi, da so nekateri sevi *P. larvae*, ki so v primarni kulturi rasli v obliki pigmentiranih kolonij, po shranjevanju in ponovnem nasajanju zrasli kot sive gladke kolonije. Na podlagi opisane rasti smo izolatoma določili dva osnovna morfotipa:

- **Morfotip I**, kjer je *P. larvae* rasel v obliki sivih hrapavih kolonij, ki se s starostjo in pasažo kulture niso spreminjale in
- **Morfotip II**, kjer je *P. larvae* rasel v obliki sivih gladkih ali pigmentiranih gladkih kolonij, ki so se lahko spreminjale s starostjo in pasažo kulture.

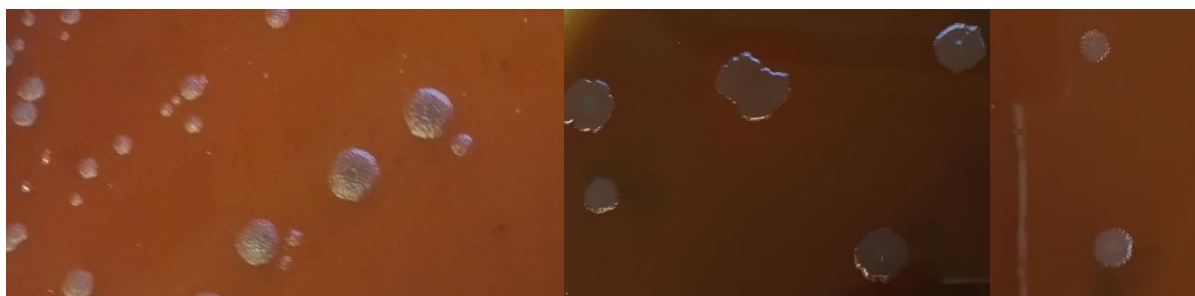


**Slika 16:** Morfotipi *P. larvae*. Morfotip I – sive hrapave kolonije (levo) in morfotip II – sive gladke (sredina) in pigmentirane gladke kolonije (desno).

**Figure 16:** *P. larvae* morphotypes. Morphotype I – grey rough colonies (left) and morphotype II – grey smooth (middle) and pigmented smooth colonies (right).

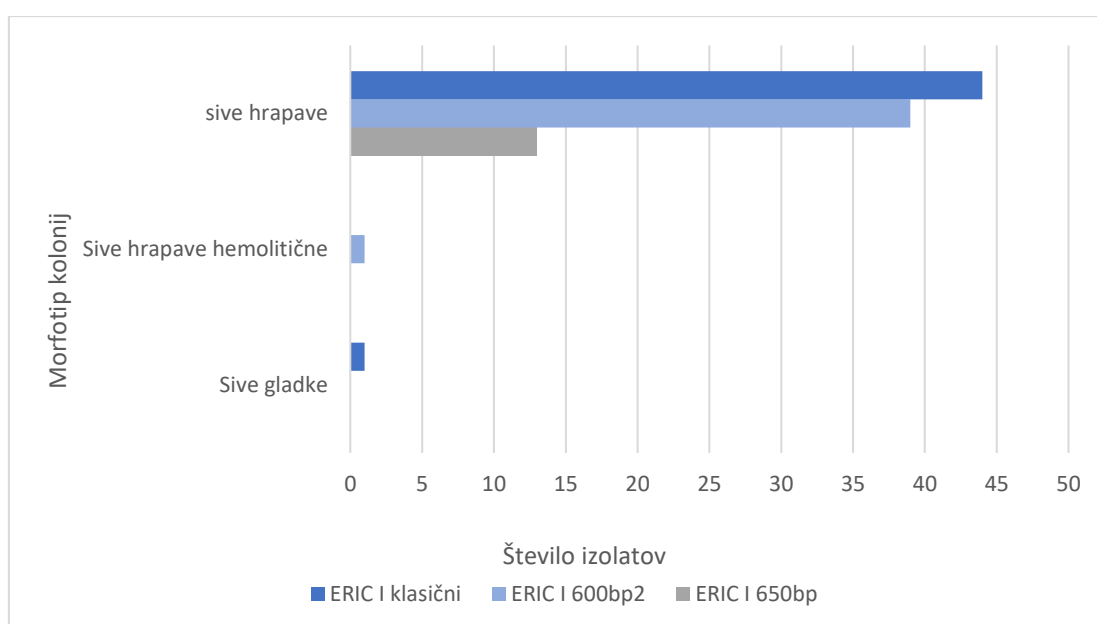
### 4.4 Primerjava morfotipov kolonij in pripadajočih genotipov ERIC

Pri 333 izolatih *P. larvae* smo morfotipe kolonij primerjali z genotipi ERIC. Primerjali smo 99/333 izolatov *P. larvae* genotipa ERIC I. Od 99 izolatov genotipa ERIC I jih je 98 (99%) raslo v obliki sivih hrapavih kolonij. 1/98 izolat je rasel v obliki sivih hrapavih hemolitičnih kolonij. Pri 1/99 (1%) izolatu pa smo ugotovili rast v obliki sivih gladkih kolonij, ki so značilne za genotip ERIC II.



**Slika 17:** Podobne sive hrapave kolonije *P. larvae*, značilne za genotip ERIC I.

**Figure 17:** Similar grey rough colonies of *P. larvae*, characteristic for ERIC I genotype.



**Slika 18:** Ugotovljeni morfotipi kolonij pri genotipih ERIC I *P. larvae*

**Figure 18:** Detected ERIC I morphotypes of *P. larvae*

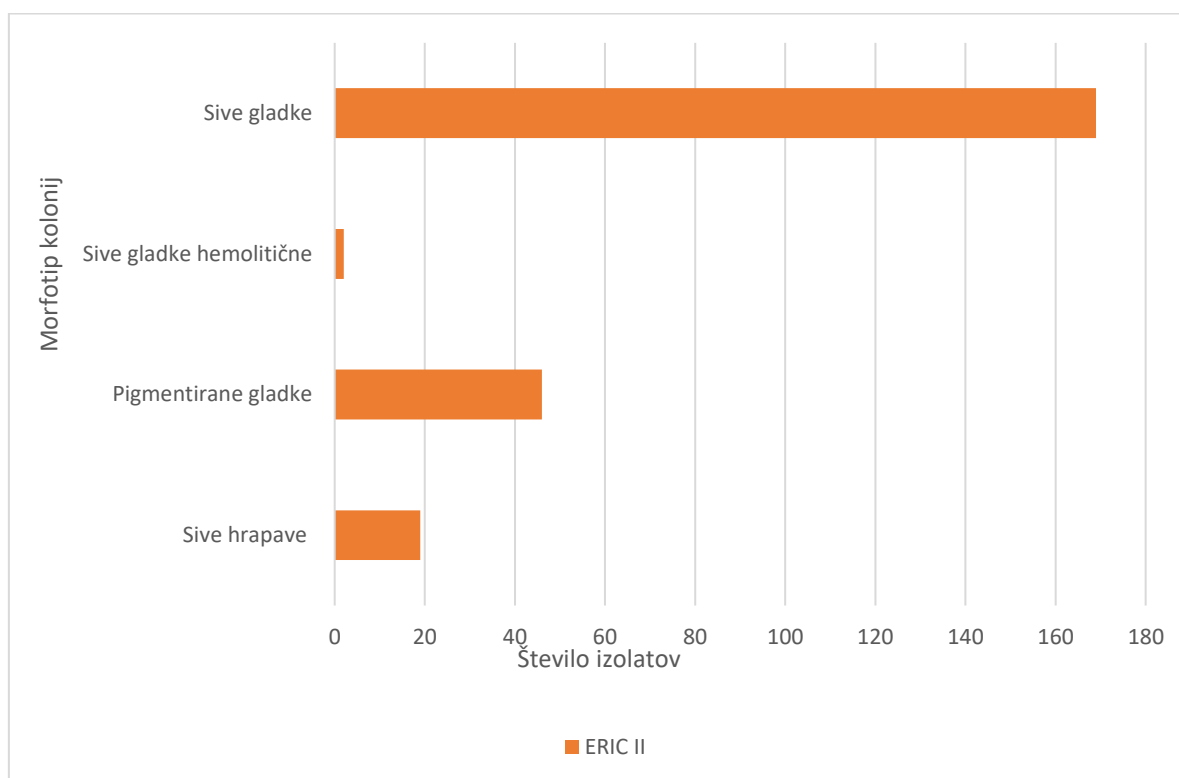
Morfotip kolonij smo preverjali tudi pri 234/333 izolatih *P. larvae* genotipa ERIC II. 169/234 (72%) jih je raslo v obliki značilnih sivih gladkih kolonij, 2 od 169 sta bili hemolitični. 46/234 (20%) izolatov je raslo v obliki različno pigmentiranih gladkih kolonij. Nekatere kolonije so bile v celoti oranžno obarvane, nekatere so imele oranžno obarvan rob ali center, nekatere so bile temno rdeče barve. Ugotovili smo, da se obarvanost kolonij lahko spreminja glede na starost kolonij na plošči – s starostjo se kolonije lahko bolj intenzivno obarvajo ali se razbarvajo. Nekatere kolonije, ki so ob izolaciji povzročitelja zrasle kot pigmentirane, so ob presajanju na sveže gojišče izgubile obarvanje in so rasle v obliki sivih gladkih kolonij. Pri 19/234 (8%)

izolatih smo ugotovili rast v obliki sivih hrapavih kolonij, ki so sicer značilne za genotip ERIC I.



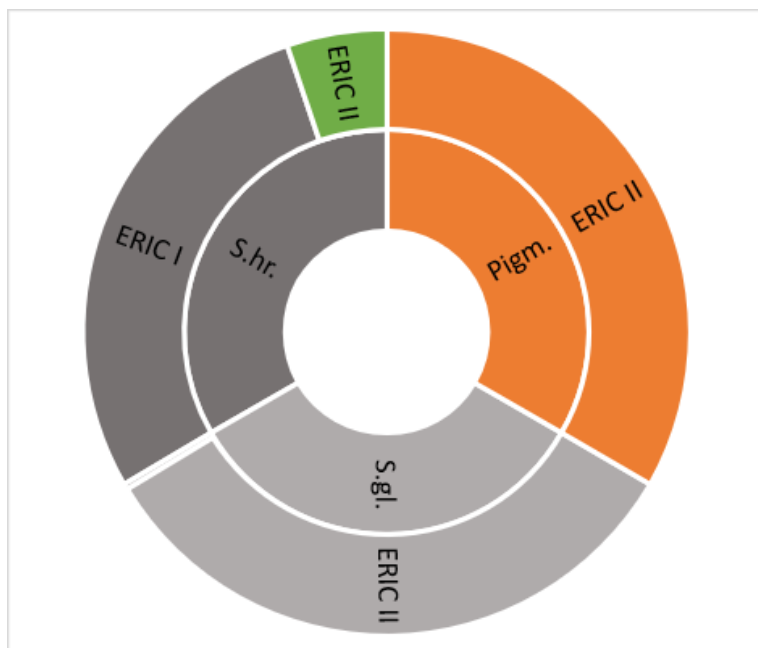
**Slika 19:** Različne kolonije *P. larvae* značilne za genotip ERIC II. Sive gladke (levo), lahko tudi hemolitične (sredina) in pigmentirane kolonije (desno).

**Figure 19:** Various colonies of *P. larvae* characteristic for ERIC II genotype. Grey smooth (left), also hemolytic (middle) and pigmented colonies (right).



**Slika 20:** Ugotovljeni morfolotipi kolonij pri genotipih ERIC II *P. larvae*

**Figure 20:** Detected ERIC II morphotypes of *P. larvae*

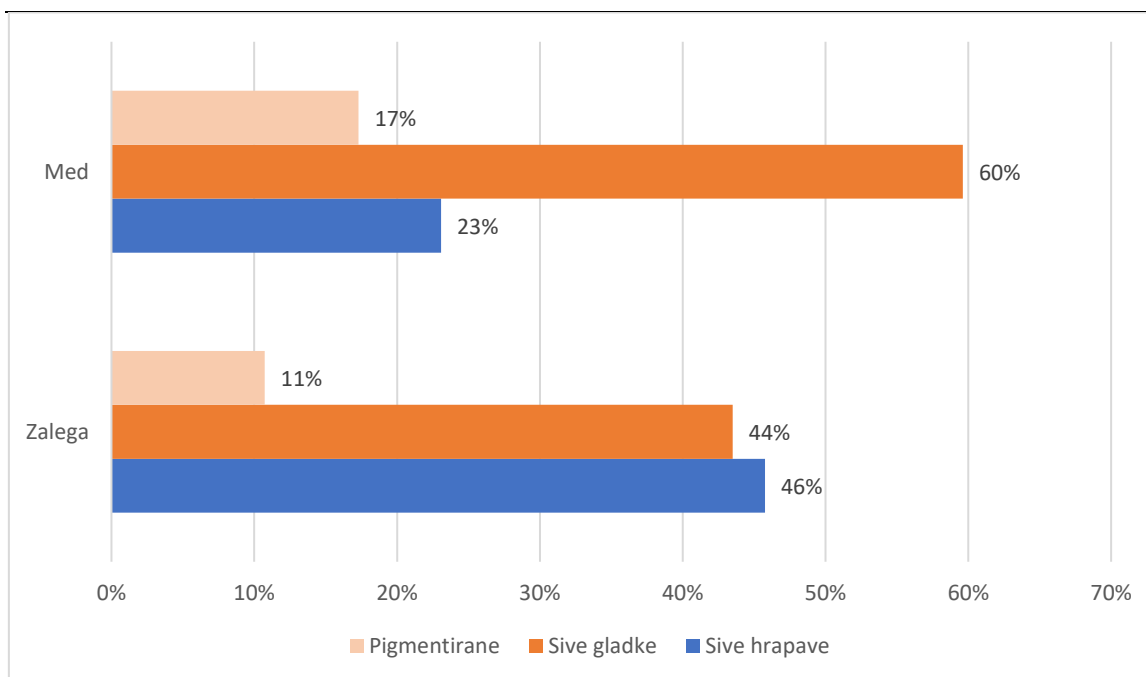


**Slika 21:** Primerjava genotipov ERIC z morfotipi *P. larvae*. Vse pigmentirane kolonije so bile tudi genotipsko opredeljene kot genotip ERIC II. 99 % sivih gladkih kolonij je bilo genotipsko opredeljenih kot genotip ERIC II, pri 1 % sivih gladkih kolonij smo ugotovili neznačilen genotip ERIC I. 84 % sivih hrapavih kolonij je bilo genotipsko opredeljenih kot genotip ERIC I, pri 16 % sivih hrapavih kolonij smo ugotovili neznačilen genotip ERIC II.

**Figure 21:** Comparison of ERIC genotypes and morphotypes *P. larvae*. All pigmented colonies were genotypically determined as ERIC II. 99 % of grey smooth colonies were genotypically determined as ERIC II, 1 % of grey smooth colonies were determined as atypical ERIC I. 84 % of grey rough colonies were genotypically determined as ERIC I, 16 % of grey rough colonies were determined as atypical ERIC II.

Od 156 izolatov *P. larvae* iz medu, ki smo jim določili morfotip, jih je 36 izolatov raslo kot sive hrapave kolonije, značilne za ERIC I. 27/36 jih je bilo s tipizacijo opredeljenih kot ERIC I, 9/36 pa kot ERIC II. 93/156 izolatov iz medu je raslo kot sive gladke kolonije, značilne za ERIC II. 92/93 izolatov je bilo s tipizacijo opredeljenih kot ERIC II, 1/93 pa kot ERIC I. 27/156 izolatov iz medu je raslo kot različno obarvane kolonije, ki so tudi značilne za genotip ERIC II. Vseh 27 pigmentiranih izolatov je bilo s tipizacijo opredeljenih kot ERIC II.

Od 177 izolatov *P. larvae* iz zalege, ki smo jim določili morfotip, jih je 81 izolatov raslo kot sive hrapave kolonije, značilne za ERIC I. 71/81 jih je bilo s tipizacijo opredeljenih kot ERIC I, 10/81 pa kot ERIC II. 77/177 izolatov iz zalege je raslo kot sive gladke kolonije, značilne za ERIC II. Vseh 77 izolatov je bilo s tipizacijo opredeljenih kot ERIC II. 19/177 izolatov iz zalege je raslo kot različno obarvane kolonije, ki so tudi značilne za genotip ERIC II. Vseh 19 pigmentiranih izolatov je bilo s tipizacijo opredeljenih kot ERIC II.



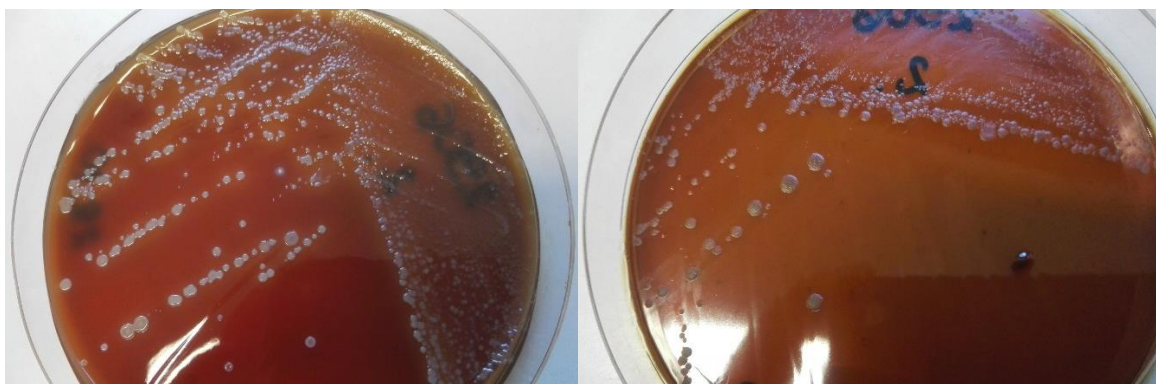
**Slika 22:** Morfotipi *P. larvae* po vzorcih iz zalege in medu

**Figure 22:** *P. larvae* morphotypes by samples from brood and honey

#### 4.5 Razlike pri izolaciji *P. larvae* iz spremenjene zalege in iz medu.

##### 4.5.1 Ugotavljanje akutnosti procesa v panju na podlagi mikroskopskega pregleda brisa zalege pred nasajanjem in rast na gojiščih

Ugotovili smo, da je *P. larvae* iz spremenjene zalege zrasel v časovnem sorazmerju od akutnosti procesa v panju. Pri sveži, akutni okužbi v panju smo rast *P. larvae* zaznali že v 24 urah po nasajanju, morfološko prepoznavne kolonije pa so zrastle v 2 do 3 dneh. Pri starem, kroničnem procesu v panju smo zaznali rast *P. larvae* kasneje, po 4 – 5 dneh, včasih celo šele 7. dan. Na gojišču so rasle različno velike kolonije, kot posledica časovne razlike v kalitvi spor *P. larvae*. *P. larvae* je iz spremenjene zalege zrasel v čisti kulturi brez kontaminantov.



**Slika 23:** Tipična rast *P. larvae* v čisti kulturi iz vzorcev spremenjene zalege. Sive gladke kolonije, značilne za ERIC II (levo) in sive hrapave kolonije, značilne za ERIC I (desno).

**Figure 23:** Typical growth of *P. larvae* from infected brood in pure culture. Grey smooth colonies, characteristic for ERIC II (left) and grey rough colonies, characteristic for ERIC I (right)

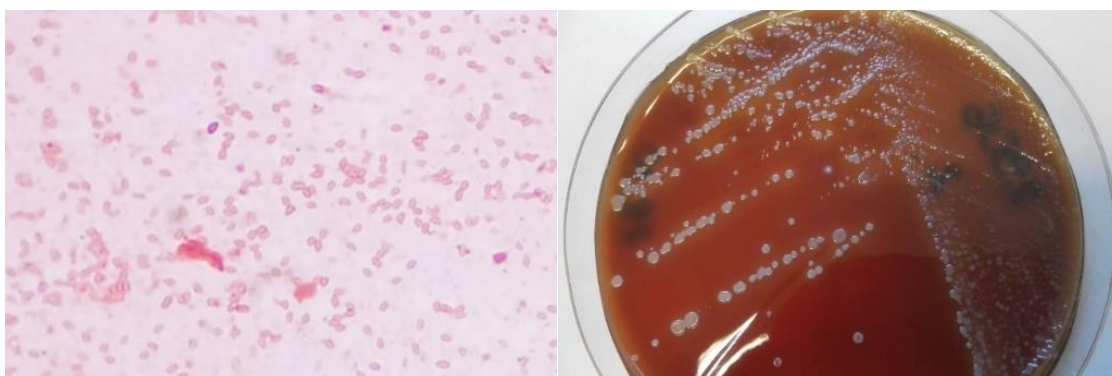
Akutnost procesa smo lahko napovedali z barvanjem brisa po Gramu po nasajanju na gojišča. Pri aktivni (akutni) okužbi v panju smo že ob začetku gojiščne preiskave pod mikroskopom ugotavljali številne po Gramu pozitivne bacile, le posamični so tudi sporulirali.



**Slika 24:** Po Gramu pozitivni bacili v brisu spremenjene zalege nakazujejo na svežo, akutno okužbo s *P. larvae* (levo); posledično hitra rast na BHIA v čisti kulturi (desno).

**Figure 24:** Gram-positive bacilli in infected brood smear are indicating fresh, acute *P. larvae* infection (left); consequently, there is quick growth of *P. larvae* on BHIA in pure culture (right).

Pri kronični, stari okužbi panja smo pod mikroskopom poleg posamičnih bacilov ugotavljali številne ovalne spore, lahko tudi samo spore.



**Slika 25:** Izolacija *P. larvae* iz zalege – kroničen proces. Za *P. larvae* značilne ovalne spore v brisu zalege nakazujejo star, kroničen proces v panju (levo); spore počasi in neenakomerno kalijo, zato je rast v čisti kulturi lahko opazna šele po 3-7 dneh, kolonije pa so različnih velikosti (desno).

**Figure 25:** Isolation of *P. larvae* from brood – chronic process. Typical *P. larvae* oval spores in brood smear are indicating old, chronic process in comb (left); the growth in pure culture is noticeable only after 3-7 days, because spores are germinating slowly and unevenly; colonies of different sizes are noticeable (right).



#### 4.5.2 Izolacija *P. larvae* iz medu

Pri izolaciji *P. larvae* iz medu je povzročitelj največkrat zrasel v mešani kulturi v kombinaciji s kontaminanti v različnih oblikah in velikostih kolonij. Kot kontaminanti so se največkrat pojavljali po Gramu pozitivni bacili iz rodu *Bacillus*. Zaradi počasne kalitve spor povzročitelja so se prve tipične kolonije na gojiščih pojavile šele 4. ali 5. dan preiskave, včasih celo zadnji 7. dan preiskave. Čas inkubacije *P. larvae* iz medu je zato lahko daljši kot pri spremenjeni zalegi in za zaključek preiskave, negativne glede na prisotnost *P. larvae* v medu, je nujna inkubacija vsaj 7 dni.



**Slika 26:** Izolacija *P. larvae* iz medu. *P. larvae* iz medu večkrat zraste v mešani kulturi (levo in desno) skupaj s kontaminanti. Spore časovno različno kalijo, zato so kolonije na gojišču različno velike.

**Figure 26:** Isolation of *P. larvae* from honey. From honey *P. larvae* often grows in mixed culture (left and right) with contaminants. Colonies on the agar are different sizes, because spores germinate at different time.

#### 4.6 Rezultati anketnega vprašalnika

Anketne vprašalnike so čebelarji izpolnjevali v letu 2019. V anketi je sodelovalo 84 čebelarjev iz različnih regij Slovenije. 60/84 čebelarjev je v letu 2019 pri svojih čebelah imelo klinične znake HGČZ, 24/84 čebelarjev pa ni poročalo o pojavu HGČZ. Odgovore na vprašalnike smo obdelali in dobili sledeče rezultate.

##### 4.6.1 Odgovori čebelarjev v anketnem vprašalniku

Posamezni čebelar je čebelaril s povprečno 18 čebeljimi družinami na čebelnjak (največ 82 čebeljih družin /čebelnjak oziroma 93 vseh čebeljih družin na vseh lokacijah). Večina čebelarjev je imela čebelnjak na eni lokaciji, največ na 6 lokacijah eden čebelar. Najpogosteje so uporabljali listovne oziroma AŽ panje, nekateri tudi nakladne panje. Čebelarji so bili stari

od 25 do 85 let in so imeli od 3 do 80 let (povprečno 25 let) izkušenj s čebelarjenjem. Med 84 anketiranimi čebelarji je bilo 5 žensk. Večina čebelarjev je bila upokojencev (56/84), 1 nezaposlen, 3 kmetovalci, ostali so bili zaposleni v drugih poklicih. Večina je končala srednjo poklicno šolo (50/84) ali diplomo 1. bolonjske stopnje (24/84), ostali pa so imeli različne stopnje izobrazbe v razponu od osnovne šole do doktorata. Večina anketiranih se je s čebelarjenjem ukvarjala popolnoma ljubiteljsko (53/84), nekateri so čebelarili ljubiteljsko in jim je to predstavljalo tudi majhen del dohodka (28/84), 4 čebelarjem pa je čebelarjenje predstavljalo dodatno gospodarsko dejavnost. Velika večina anketiranih se je s čebelarjenjem ukvarjala zaradi proizvodnje medu za lastno uporabo (79/84) ali prodajo (37/84), poleg tega so kot razlog za čebelarjenje navedli tudi pomoč čebelam in okolju (38/84) ter opraševanje (39/84). 16/84 čebelarjev je v preteklosti že imelo diagnosticirano HGČZ. 68/84 čebelarjev je od 2017 do pregleda v letu 2019 poročalo o izgubi čebeljih družin, v povprečju 2–5 družin na leto, največ celo 62 čebeljih družin v enem letu. V letih 2017 – 2019 so čebelarji najpogosteje poročali o pojavu varoze, sledila je poapnela zalega, težave z maticami in ropanje. Po mnenju čebelarjev so glavni vzroki za pojav in širjenje HGČZ opuščeni čebelnjaki, ropanje, slaba skrb za higieno v čebelnjaku ter da se bolezen ne prijavi.

Okolico, v kateri čebelarijo, so čebelarji najpogosteje ocenili kot srednjo do slabo (20–34/84), največkrat so izpostavili veliko gostoto čebelnjakov. Sodelovanje s sosednjimi čebelarji so ocenili kot dobro oziroma zelo dobro (49/84). Tudi razpoložljivost časa za čebelarjenje so ocenili kot dobro oziroma zelo dobro (21–44/84). Higieno svojega čebelnjaka in opreme ter preprečevanje dostopa drugim osebam do čebelnjaka so ocenili kot zelo dobro (34–37/84). Svoje poznavanje vzrokov za širjenje bolezni so pogosto ocenili kot dobro (36/84). Označevanje satja v primeru premeščanja so ocenili kot slabo (27/84). Večinoma zamenjajo 30% satja na leto.

V letu 2018 so za zdravljenje največkrat uporabili pripravke z amitrazom (62/84), oksalno kislino (51/84) in mravljinčno kislino (32/84). En čebelar v letu 2018 čebel ni zdravil. Večina čebelarjev za krmljenje čebel uporablja sladkorno raztopino (83/84) in komercialne pogače (39/84).

Največ čebelarjev je čebelarilo s svojo opremo, devet čebelarjev si je opremo izposojalo ali jo posojalo drugim, od tega pet od istega čebelarja, trije od čebelarskega društva, eden pa si je izposojal ali posojal opremo več čebelarjem. Dva med njimi posojene opreme ne očistita.



25/84 čebelarjev matice vzreajo sami, ostali jih občasno ali vedno dokupujejo. V letih 2017 – 2019 je 21/84 čebelarjev kupilo eno ali več čebeljo družino ali paketne čebele; 18 čebelarjev je navedlo, da niso imeli urejene dokumentacije za vse nakupe. 8/84 čebelarjev je v zadnjih treh letih prodalo čebelje družine ali paketne čebele; 5 jih je navedlo, da niso imeli urejene dokumentacije za vse prodaje. 18/84 čebelarjev je v zadnjih treh letih vozilo čebele na pašo; 5 jih je navedlo, da za to niso imeli vedno urejene dokumentacije. Od leta 2017 do 2019 je 28/84 čebelarjev ujelo 1–15 rojev na leto; 12 čebelarjev je roj takoj prestavilo v panj, ostali so roj vsaj za en dan ločili od ostalih čebel, dva med njimi sta roj ločila za 30 dni.

#### 4.6.2 Odgovori veterinarjev ZVČ glede ugotavljanja kliničnih znakov in razmer na čebelarstvu

V 57/84 primerov so veterinarji opravili pregled čebelarstva po odločbi, ker se je le-ta nahajal v kužnem krogu, v 19 primerih je šlo za sum na HGČZ, 8 krat je šlo za kontrolni pregled po ugotovljeni HGČZ, eno čebelarstvo je bilo pregledano zaradi registracije vzreje matic. V povprečju so veterinarji pregledali 23 čebeljih družin na čebelnjak. Po navedbah veterinarjev so čebelarji ob sumu na HGČZ večinoma najprej poklicali veterinarja (16/19), en čebelar je poklical svetovalca na Čebelarski zvezi Slovenije (ČZS), dva pa sta takoj ukrepala sama. Poleg HGČZ so veterinarji v čebelnjakih v 24/84 primerih ugotovili tudi druge bolezni oz. težave: najpogosteje poapnelo zalego (11/24), brezmatičnost (9/24) in varozo (7/24). Razmere za čebelarjenje so veterinarji, podobno kot čebelarji, ocenili kot dobro ali srednje. Higieno in izvajanje biovarnostnih ukrepov v čebelnjaku pa so veterinarji ocenili kot dobro, nekoliko slabše kot čebelarji.

Veterinarji so ocenjevali prisotnost različnih kliničnih znakov v čebeljih družinah s kliničnimi znaki HGČZ (60 čebelarjev).

**Tabela 3:** Prisotnost kliničnih znakov v ... številu čebelnjakov/... % čebelnjakov

**Table 3:** Presence of clinical signs in...number of apiaries/...% of apiaries

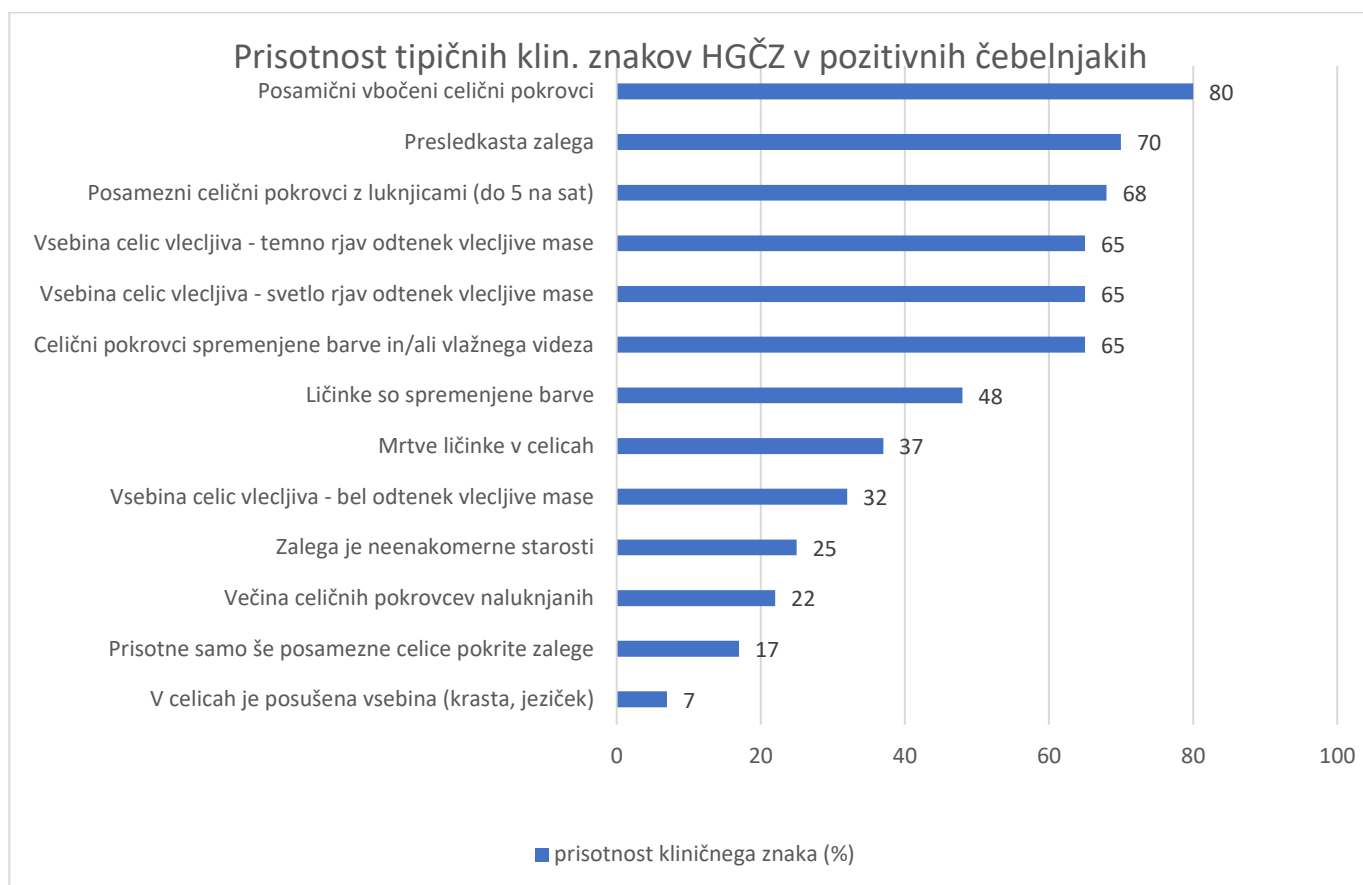
| KLINIČNI ZNAK                              | PRISOTEN | PRISOTEN V % |
|--------------------------------------------|----------|--------------|
| Večje število mrtvih čebel pred panji      | 3        | 5            |
| Pred panji čebele lazijo, ne morejo leteti | 2        | 3            |
| Temne, svetleče čebele pred panji          | 1        | 2            |
| Posamezne čebele pred panji drgetajo       | 1        | 2            |
| Čebelje ličinke in bube pred panji         | 1        | 2            |

|                                                              |    |    |
|--------------------------------------------------------------|----|----|
| Pročelje panjev onesnaženo s fecesom                         | 0  | 0  |
| Zalega je neenakomerne starosti                              | 15 | 25 |
| Presledkasta čebelja zalega                                  | 42 | 70 |
| Prisotne samo še posamezne celice pokrite zalege             | 10 | 17 |
| Celični pokrovci spremenjene barve in/ali vlažnega videza    | 39 | 65 |
| Posamezni celični pokrovci vbočeni                           | 48 | 80 |
| Posamezni celični pokrovci z luknjicami (do 5 na sat)        | 41 | 68 |
| Večina celičnih pokrovcev naluknjanih                        | 13 | 22 |
| Mrtve ličinke v celicah                                      | 22 | 37 |
| Ličinke v celicah imajo spremenjeno lego                     | 15 | 25 |
| Ličinke so spremenjene barve                                 | 29 | 48 |
| Zalega ima kiselkast vonj                                    | 6  | 10 |
| Vsebina celic vlecljiva - bel odtenek vlecljive mase         | 19 | 32 |
| Vsebina celic vlecljiva - svetlo rjav odtenek vlecljive mase | 39 | 65 |
| Vsebina celic vlecljiva - temno rjav odtenek vlecljive mase  | 39 | 65 |
| V celicah je posušena vsebina (krasta, jeziček)              | 4  | 7  |
| Mrtve ličinke v obliki mešička                               | 6  | 10 |
| Posušena mrtva ličinka v obliki ladjice                      | 0  | 0  |
| Posamezne poapnele ličinke                                   | 6  | 10 |
| Več kot 10 % poapnelih ličink                                | 1  | 2  |
| Bolezenske spremembe so na svetlem satu/satih                | 19 | 32 |
| Bolezenske spremembe so na temnem satu/satih                 | 30 | 50 |
| Bolezenske spremembe so na svetlih in temnih satih           | 34 | 57 |
| Bolezenske spremembe so na enem satu                         | 25 | 42 |
| Bolezenske spremembe so na dveh satih                        | 34 | 57 |
| Bolezenske spremembe so na treh ali več satih                | 18 | 30 |
| Vidne čebele z deformiranimi krili                           | 1  | 2  |
| Vidna varoja na čebelah                                      | 3  | 5  |
| Vidna varoja pod pokrovčki celic                             | 5  | 8  |

|                                            |    |    |
|--------------------------------------------|----|----|
| Sati onesnaženi s čebeljimi iztrebki       | 0  | 0  |
| Jakost čebelje družine ni spremenjena      | 28 | 47 |
| Čebelja družina je delno oslabela          | 22 | 37 |
| Čebelja družina je močno oslabela          | 10 | 17 |
| V panju ni več čebel ali jih je le peščica | 4  | 7  |
| Družina je izropana                        | 7  | 12 |

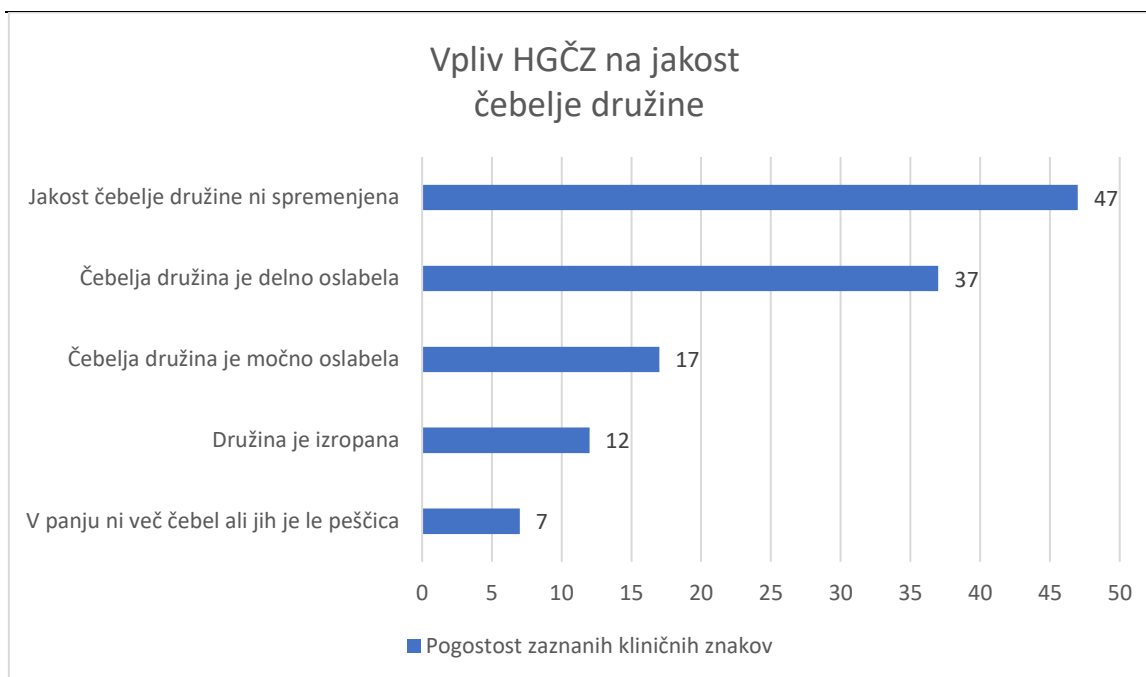
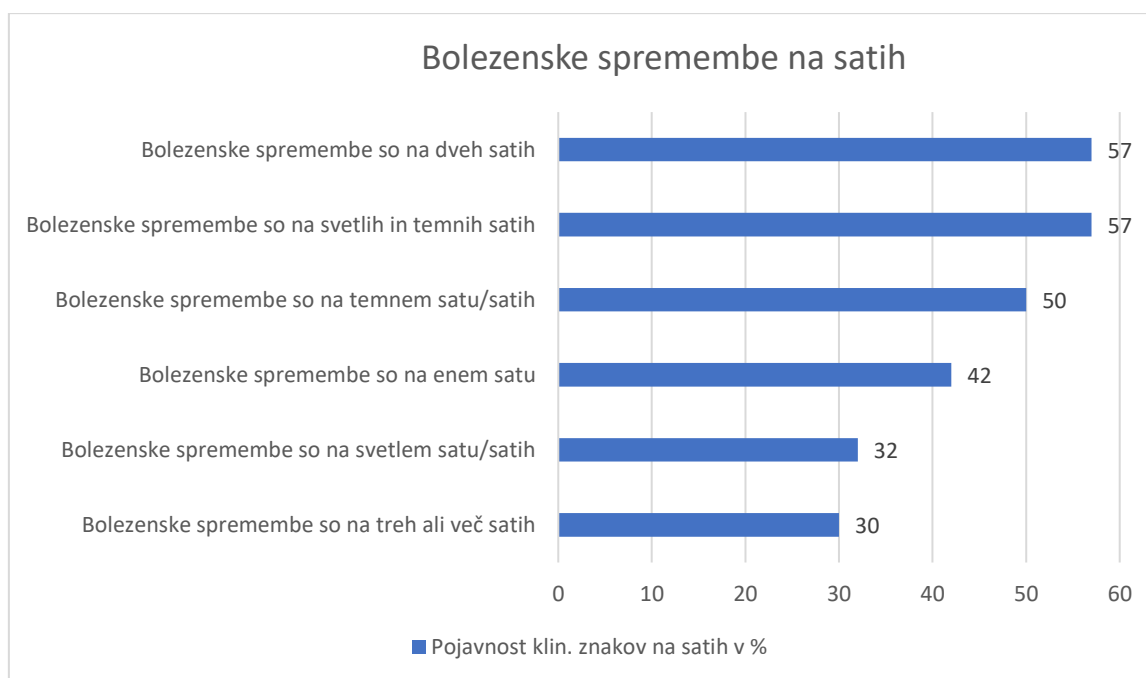
Opomba: Modro – statistično značilni klinični znaki za ERIC I; oranžno - statistično značilni klinični znaki za ERIC II.

Notice: Blue – statistically characteristic clinical signs for ERIC I; orange - statistically characteristic clinical signs for ERIC II.



**Slika 27:** Prisotnost tipičnih kliničnih znakov HGČZ v pozitivnih čebelnjakih.

**Figure 27:** Presence of typical clinical signs of AFB in positive apiaries.

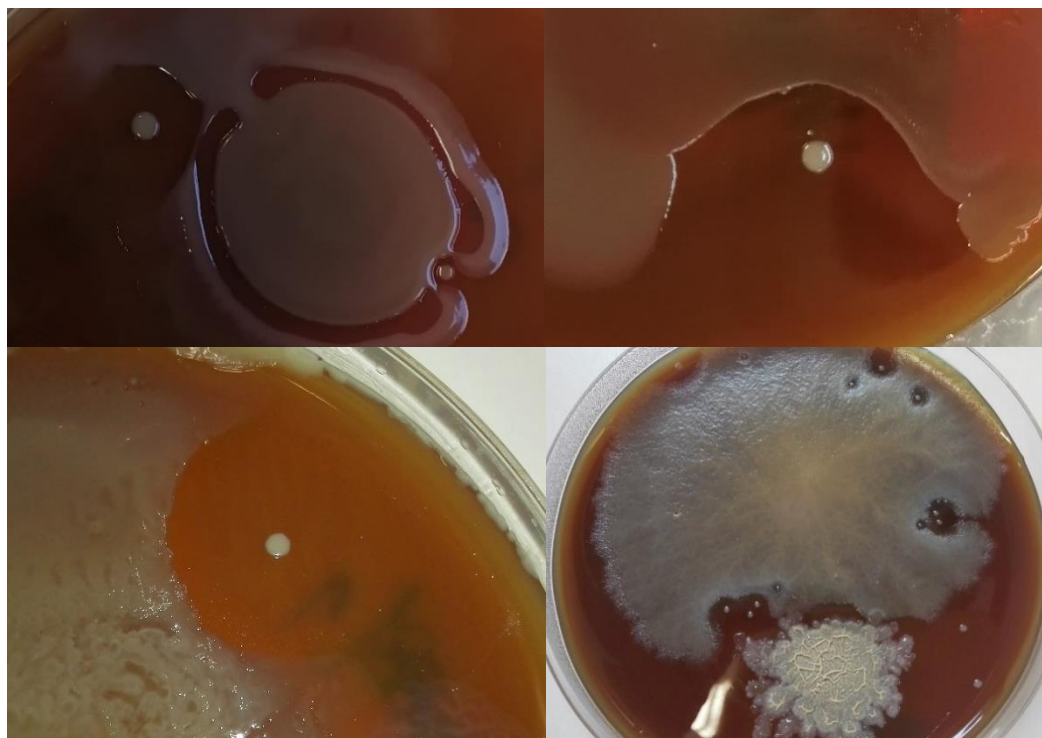
**Slika 28:** Vpliv HGČZ na jakost čebelje družine.**Figure 28:** AFB influence on strength of bee colony.**Slika 29:** Vpliv HGČZ na sate.**Figure 29:** AFB influence on combs.

Ugotovili smo tri klinične znake, ki so bili statistično značilno povezani le s tipom ERIC I: (i) mrtve ličinke v obliki mešička ( $p = 0,0201$ ), (ii) bolezenske spremembe prisotne na treh ali več satih ( $p = 0,0089$ ) in (iii) pod pokrovčki celic ni vidne varoje ( $p = 0,0336$ ).

Pri dvanajstih kliničnih znakih smo ugotovili statistično značilno povezanost z genotipom ERIC II in sicer: zalega neenakomerne starosti ( $p = 0,0225$ ), mrtve ličinke v celicah ( $p = 0,0145$ ), ličinke spremenjene barve ( $p = 0,0389$ ), vlecljiva vsebina celic belega ( $p = 0,0167$ ) ali rjavega ( $p < 0,0001$ ) odtenka, posamezne poapnele ličinke ( $p = 0,0273$ ), bolezenske spremembe prisotne na svetlem ( $p = 0,0094$ ) in temnem ( $p = 0,0640$ ) satu, spremembe na enem ( $p = 0,0003$ ) ali dveh ( $p < 0,0001$ ) satih, delno oslabela ( $p = 0,0447$ ) ter izropana ( $p = 0,0610$ ) čebelja družina.

#### 4.7 Ugotavljanje con inhibicije rasti pri izolaciji *P. larvae* iz medu

Pri bakteriološki preiskavi medu na spore *P. larvae* smo, kljub predhodni obdelavi vzorcev pri visoki temperaturi z namenom uničenja vegetativnih oblik kontaminantov, pogosto izolirali bakterije v mešani kulturi. Kolonije *P. larvae* smo iz medu le izjemoma izolirali v čisti kulturi. V mešani rasti smo občasno ugotavljali, da so kolonije *P. larvae*, kljub invazivni rasti kontaminantov, povzročale cono inhibicije rasti drugih kolonij in s tem omogočile dovolj prostora za lastno rast.



**Slika 30:** Različne cone inhibicije rasti kontaminantov okrog kolonije *P. larvae*.

**Figure 30:** Different inhibition zones of contaminants growth around the colony *P. larvae*.

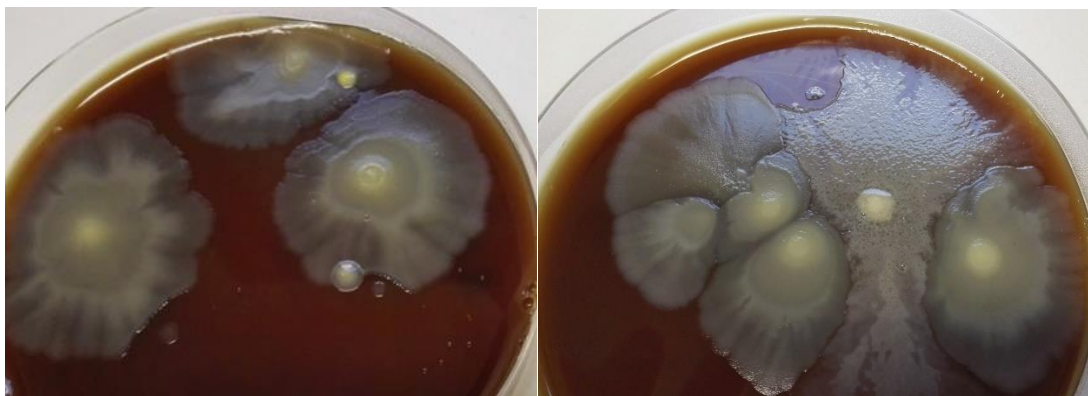
Cono inhibicije rasti smo opazili pri obeh morfotipih kolonij *P. larvae* – morfotip I: sive hrapave kolonije in morfotip II: sive gladke kolonije, ki so se lahko čez čas spremenile v gladke kolonije z oranžnim robom ali centrom. Pogosteje smo inhibicijo ugotovili pri *P. larvae* morfotipa II.



**Slika 31:** Inhibicija rasti bakterije *Paenibacillus lactis*. Sive hrapave kolonije *P. larvae* opazno inhibirajo rast bakterije *Paenibacillus lactis*, ki se v vzorcu pojavlja kot kontaminant.

**Figure 31:** *Paenibacillus lactis* growth inhibition. Grey rough colonies of *P. larvae* noticeable inhibit growth of *Paenibacillus lactis*, as a contaminant in sample.

Nekatere kontaminante, ki so se pri gojiščni preiskavi medu na spore *P. larvae* pogosto ponavljali, smo identificirali z metodo masne spektrometrije (MALDI TOF). Najpogosteje smo ugotavljali bakterije *Bacillus megaterium*, občasno tudi *Bacillus flavus*, in *Paenibacillus lactis*.

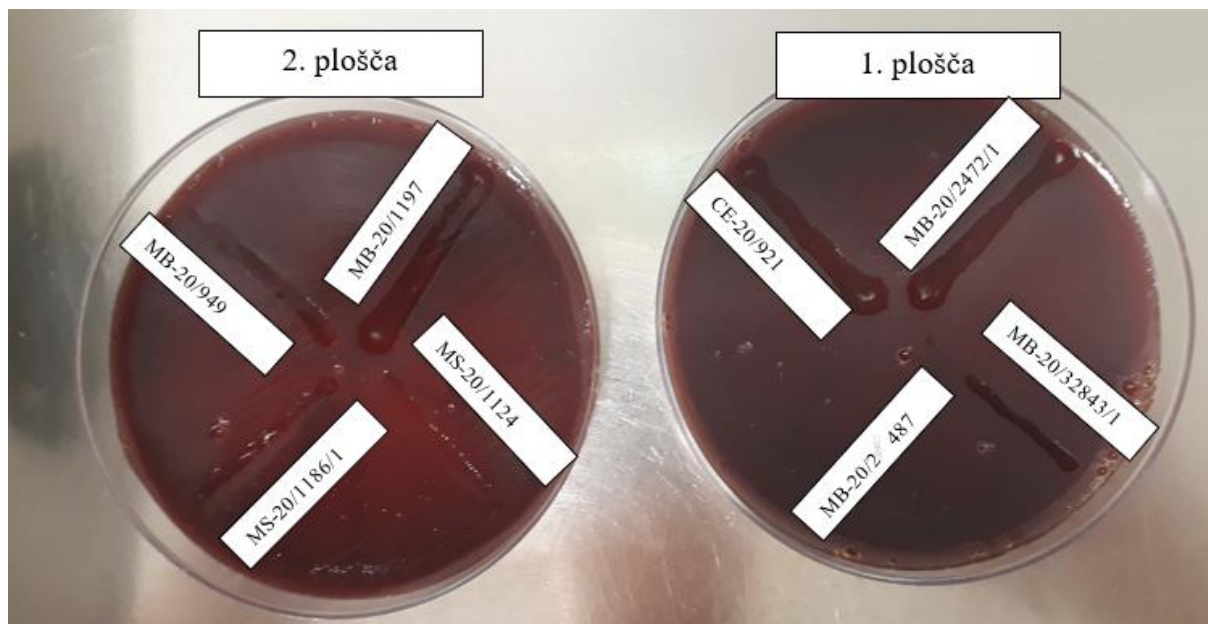


**Slika 32:** Kontaminanti vzorcev medu. Velike invazivne kolonije *Bacillus megaterium* (levo) in vejčasta rast *Bacillus flavus* med kolonijami *B. megaterium* (desno).

**Figure 32:** Contaminants of honey samples. Big invasive colonies of *Bacillus megaterium* (left) and branched growth of *Bacillus flavus* among *B. megaterium* colonies (right).

#### 4.8 Ugotavljanje inhibitornih snovi *P. larvae* z neposrednim nasajanjem dveh kultur na krvni agar

Po 24 urni inkubaciji *B. subtilis* na KA, pri temperaturi  $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , čez katerega smo v štirih črtah nasadili različne izolate *P. larvae* smo zaznali različno inhibicijo rasti *B. subtilis*.

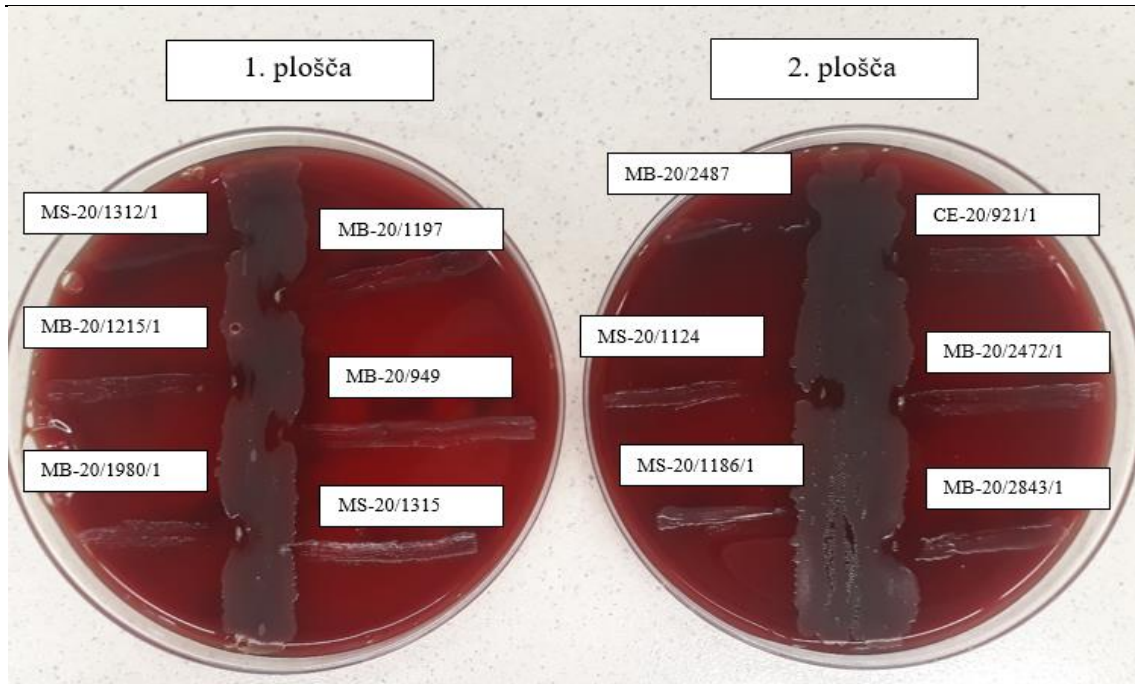


**Slika 33:** Različne cone inhibicije rasti bakterije *B. subtilis*. Na 1. plošči je izolat *P. larvae* CE-20/921 kazal največjo inhibicijo rasti bakterije *B. subtilis*, izolat *P. larvae* MB-20/2472/1 manjšo inhibicijo rasti, izolat *P. larvae* MB-20/32843/1 še manjšo inhibicijo rasti, medtem ko je *B. subtilis* prerastel nasajeni izolat *P. larvae* MB-20/2487, ki sploh ni inhibiral rasti *B. subtilis*. Na 2. plošči je izolat *P. larvae* MB-20/1197 kazal največjo inhibicijo rasti bakterije *B. subtilis*, izolat *P. larvae* MB-20/949 manjšo inhibicijo rasti, izolat *P. larvae* MS-20/1186/1 še manjšo inhibicijo rasti, medtem ko je izolat *P. larvae* MS-20/1124 rasel komaj zaznavno in zelo šibko inhibiral rast bakterije *B. subtilis*.

**Figure 33:** Different inhibition zones of *B. subtilis*. On 1. agar *P. larvae* CE-20/921 is showing the biggest inhibition of the growth of *B. subtilis*, *P. larvae* MB-20/2472/1 smaller inhibition of the growth, *P. larvae* MB-20/32843/1 even smaller inhibition of the growth. *B. subtilis* has overgrown *P. larvae* MB-20/2487, with no inhibition of the growth of *B. subtilis*. On 2. agar *P. larvae* MB-20/1197 is showing the biggest inhibition of the growth of *B. subtilis*, *P. larvae* MB-20/949 smaller inhibition of the growth, *P. larvae* MS-20/1186/1 even smaller inhibition of the growth. *P. larvae* MS-20/1124 is growing barely noticeable with weak inhibition of the growth of *B. subtilis*.

Pri drugem poskusu smo *B. subtilis* nasadili na KA v obliki črte in nanj pravokotno izolate *P. larvae*. Po 24 urni inkubaciji plošč na  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  smo ugotovili bolj ali manj izrazito inhibicijo rasti bakterije *B. subtilis* v odvisnosti od izolata *P. larvae*.





**Slika 34:** Različne cone inhibicije rasti na širokem pasu *B. subtilis* (navpična kultura). Tudi na tak način je izolat *P. larvae* (horizontalne kulture) MB-20/1197 kazal največjo inhibicijo rasti *B. subtilis*. Izrazita cona inhibicije je bila opazna tudi pri izolatih *P. larvae* MB-20/949, CE-20/921/1, MB-20/1215/1, MB-20/1980/1, MB-20/2843/1, MS-20/1124 in MB-20/2487. Pri izolatih MS-20/1312/1 in MB-20/2472/1 je bila inhibicija rasti komaj opazna oziroma je pri izolatih MB-20/1315 in MS-20/1186/1 ni bilo.

**Figure 34:** Different inhibition zones on wide stripe of *B. subtilis* (vertical culture). *P. larvae* isolates (horizontal cultures) MB-20/1197 is showing the biggest inhibition of the growth of *B. subtilis*. Inhibition of the growth was noticeable with *P. larvae* MB-20/949, CE-20/921/1, MB-20/1215/1, MB-20/1980/1, MB-20/2843/1, MS-20/1124 and MB-20/2487. Inhibition of the growth was barely seen with *P. larvae* MS-20/1312/1 and MB-20/2472/1 or was missing with *P. larvae* MB-20/1315 in MS-20/1186/1.

#### 4.9 Difuzijska metoda ugotavljanja protimikrobnih snovi iz supernatanta *P. larvae*

Z difuzijsko metodo smo ugotavljali izražanje protimikrobnih snovi pri izolatih *P. larvae* različnih morfortipov in genotipov. Pri referenčni sevih *P. larvae* genotipov ERIC I, II, III, IV in V nismo zaznali inhibicije rasti niti pri po Gramu pozitivnih bakterijah niti pri po Gramu negativnih bakterijah. Tudi pri kliničnih izolatih *P. larvae* genotipa ERIC II nismo zaznali inhibicije rasti niti pri po Gramu pozitivnih bakterijah niti pri po Gramu negativnih bakterijah.

Pri posameznih sevih *P. larvae* genotipa ERIC I s pasom pri 600 bp smo ugotovili inhibicijo rasti pri nekaterih po Gramu pozitivnih bakterijah (*B. subtilis*, *S. pseudintermedius*, MRSP) in pri kvasovki *M. pachydermatis*. Pri drugih sevih *P. larvae* genotipa ERIC I s pasom pri 650 bp in »klasičnega« ERIC I ni bilo nobene inhibicije rasti bakterij.



A. Žugelj: Epidemiološke in klinične značilnosti ... v povezavi z genotipom *Paenibacillus larvae*

Ljubljana : UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

**Tabela 4:** Zbrani rezultati ugotavljanja inhibitornih snovi *P. larvae* z difuzijsko metodo

**Table 4:** Results of detecting inhibitory substances of *P. larvae* with diffusion method

| <i>P. larvae</i> | genotip  | BS 30              | kontaminant          | VF-18/18292                | 2906/10    | RDK 056          | RDK 052        | <i>M. pachydermatis</i> |
|------------------|----------|--------------------|----------------------|----------------------------|------------|------------------|----------------|-------------------------|
|                  |          | <i>B. subtilis</i> | <i>B. megaterium</i> | <i>S. pseudintermedius</i> | MRSP       | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> |                         |
| Ref. sevi        | ERIC I   | ni inhibicije      | /                    | /                          | /          | ni inhibicije    | ni inhibicije  | /                       |
| Ref. sevi        | ERIC II  | ni inhibicije.     | /                    | /                          | /          | ni inhibicije    | ni inhibicije  | /                       |
| Ref. sevi        | ERIC III | ni inhibicije      | /                    | /                          | /          | ni inhibicije    | ni inhibicije  | /                       |
| Ref. sevi        | ERIC IV  | ni inhibicije      | /                    | /                          | /          | ni inhibicije    | ni inhibicije  | /                       |
| Ref. sevi        | ERIC V   | ni inhibicije      | /                    | /                          | /          | ni inhibicije    | ni inhibicije  | /                       |
| MB-17/2120/3 A   | ERIC I*  | inhibicija         | ni inhibicije        | inhibicija                 | /          | razredčen        | ni inhibicije  | /                       |
| MB-17/2120/4 B   | ERIC I*  | inhibicija         | ni inhibicije        | /                          | /          | razredčen        | ni inhibicije  | /                       |
| MB-17/2120/6 C   | ERIC I*  | inhibicija         | ni inhibicije        | /                          | inhibicija | razredčen        | ni inhibicije  | inhibicija              |
| B-19/3046        | ERIC II  | ni inhibicije.     | /                    | /                          | /          | ni inhibicije    | ni inhibicije  | /                       |
| MB-19/1548       | ERIC I*  | ni inhibicije      | /                    | /                          | /          | ni inhibicije    | ni inhibicije  | /                       |
| MB-18/1813       | ERIC I   | ni inhibicije      | /                    | /                          | /          | ni inhibicije    | ni inhibicije  | /                       |
| B-19/3054        | ERIC II  | ni inhibicije      | /                    | /                          | /          | ni inhibicije    | ni inhibicije  | /                       |

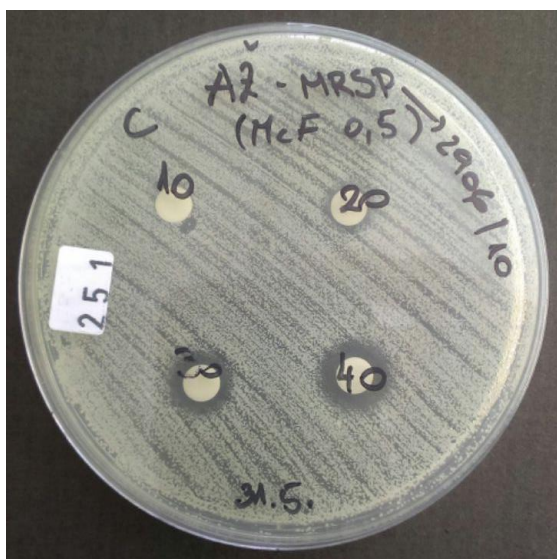
Opomba: Z modro je označena inhibicija; \*spremenjen profil ERIC I

Note: Inhibition is marked blue; \*altered ERIC I profile



**Slika 35:** Vpliv metabolita *P. larvae* na bakterijo *S. pseudintermedius*. Metabolit *P. larvae* (A) s protimikrobnim delovanjem je testiran po standardni difuzijski metodi za ugotavljanje občutljivosti *S. pseudintermedius* za antibiotike - opazna cona inhibicije rasti *S. pseudintermedius* (desno povečana slika).

**Figure 35:** Impact of *P. larvae* metabolite on *S. pseudintermedius*. The metabolite of *P. larvae* (A) with antimicrobial activity was tested according to the standard diffusion method for determining the susceptibility of *S. pseudintermedius* to antibiotics - a noticeable zone of growth inhibition of *S. pseudintermedius* (right enlarged image).



**Slika 36:** Vpliv metabolita *P. larvae* na proti meticilinu odporen *S. pseudintermedius* (MRSP). Metabolit *P. larvae* (C) v različnih količinah (10, 20, 30 in 40 µl) na standardnem difuzijskem antibiogramu za ugotavljanje občutljivosti - z večanjem količine metabolita opazna večja cona inhibicije rasti MRSP.

**Figure 36:** Impact of *P. larvae* metabolite on methicillin resistant *S. pseudintermedius* (MRSP). *P. larvae* metabolite (C) in different volumes (10, 20, 30 in 40 µl) on standard diffusion antibiogram for MRSP antibiotic sensitivity detection – noticeable bigger inhibition zone of MRSP with increasing volume.



**Slika 37:** Vpliv metabolita *P. larvae* na kvasovko *M. pachydermatis*. Metabolit *P. larvae* (C) v različnih količinah (10, 20, 30 in 40 µl) na standardnem difuzijskem antibiogramu za ugotavljanje občutljivosti kvasovke *M. pachydermatis* za inhibitorne snovi *P. larvae* - z večanjem količine metabolite opazna večja cona inhibicije rasti kvasovke *M. pachydermatis*.

**Figure 37:** Impact of *P. larvae* metabolite on *M. pachydermatis*. *P. larvae* metabolite (C) in different volumes (10, 20, 30 in 40 µl) on standard diffusion antibiogram for *M. pachydermatis* inhibitory substances of *P. larvae* detection – noticeable bigger inhibition zone of *M. pachydermatis* with increasing volume of metabolite.



**Slika 38:** Vpliv metabolita *P. larvae* na bakterijo *B. subtilis*.

Levo: Metabolit *P. larvae* (A) v različnih količinah (10, 20, 30 in 40 µl) dodan na diske in v luknjice (20, 40, 60 in 80 µl) v difuzijskem antibiogramu za ugotavljanje občutljivosti bakterije *B. subtilis* za inhibitorne snovi *P. larvae* - z večanjem količine supernatanta opazna večja cona inhibicije rasti *B. subtilis*.

Desno: Metabolit *P. larvae* (A, B in C) namnožen na gojišču TSB v različnih količinah (10, 20, 30 in 40 µl) dodan na diske v difuzijskem antibiogramu za ugotavljanje občutljivosti bakterije *B. subtilis* za inhibitorne snovi *P. larvae* - z večanjem količine metabolita opazna večja cona inhibicije rasti *B. subtilis* pri vseh treh sevih *P. larvae*.

**Figure 38:** Impact of *P. larvae* supernatant on *B. subtilis*.

Left: *P. larvae* metabolite (A) in different volumes (10, 20, 30 in 40 µl) added on discs and in holes (20, 40, 60 in 80 µl) on standard diffusion antibiogram for *B. subtilis* inhibitory substances of *P. larvae* detection – noticeable bigger inhibition zone of *B. subtilis* with increasing volume.

Right: *P. larvae* metabolite (A, B and C) cultivated in TSB medium in different volumes (10, 20, 30 in 40 µl) added on discs on standard diffusion antibiogram for *B. subtilis* inhibitory substances of *P. larvae* detection – noticeable bigger inhibition zone of *B. subtilis* with increasing volume.



**Slika 39:** Vpliv metabolita *P. larvae* na bakterijo *S. aureus*. Metabolit *P. larvae* (A, B in C) namnožen na gojišču TSB v različnih količinah (10, 20, 30 in 40 µl) dodan na diske v difuzijskem antibiogramu za ugotavljanje občutljivosti bakterije *S. aureus* za inhibitorne snovi *P. larvae* - z večanjem količine metabolita opazna večja cona razredčene rasti *S. aureus* pri vseh treh sevih *P. larvae*, ni pa popolne inhibicije rasti

**Figure 39:** Impact of *P. larvae* metabolite on *S. aureus*. *P. larvae* metabolite (A, B and C) cultivated in TSB medium in different volumes (10, 20, 30 in 40 µl) added on discs on standard diffusion antibiogram for *S. aureus* inhibitory substances of *P. larvae* detection – noticeable diluted, but not completely inhibited, growth of *S. aureus* with increasing volume of all three *P. larvae* metabolites.



**Slika 40:** Vpliv metabolita *P. larvae* na bakterijo *E. coli*. Metabolit *P. larvae* (A, B in C) namnožen na gojišču TSB v različnih količinah (10, 20, 30 in 40 µl) dodan na diske v difuzijskem antibiogramu za ugotavljanje občutljivosti bakterije *E. coli* za inhibitorne snovi *P. larvae* - ni inhibicije rasti.

**Figure 40:** Impact of *P. larvae* metabolite on *E. coli*. *P. larvae* metabolite (A, B and C) cultivated in TSB medium in different volumes (10, 20, 30 in 40 µl) added on discs on standard diffusion antibiogram for *E. coli* inhibitory substances of *P. larvae* detection – no inhibition of growth.

#### 4.10 Ugotavljanje genov za sintezo inhibitornih snovi

Z analizo celotnih genomov smo pri kliničnih izolatih genotipa ERIC I in II preverili prisotnost genov za sekundarne presnovke. Pri genotipu ERIC I smo ugotovili prisotnost gena za sevadicin



in penilamicin, ki so ju proučevali pri genotipu ERIC II, za katerega naj bi bila značilna (Garcia-Gonzales in sod., 2014), in prisotnost gena za amilociklicin, ki naj bi imel protimikroben učinek na po Gramu pozitivne bakterije (Scholz in sod., 2014). Pri genotipu ERIC II smo ugotovili prisotnost genov za sevadicin in penilamicin.

## 5 RAZPRAVA

**Hipoteza 1:** S fenotipskimi in molekularnimi metodami bomo znotraj kužnega kroga dokazali različne morfotipe in genotipe *P. larvae* v zalegi in medu. Rezultati fenotipskih in molekularnih metod bodo primerljivi.

*P. larvae* ima v svojem genomu zapise za številne gene, na podlagi katerih se fenotipsko lahko ali pa ne izražajo različne lastnosti bakterije, ki jih nato lahko proučujemo. Celoten genski zapis imenujemo genotip bakterije. Ko ugotavljamo posamezne odseke genoma, ki so značilni za določen podtip *P. larvae*, tudi govorimo o genotipu, čeprav bi bilo pravilneje govoriti o tipu bakterije. Ko pa z različnimi metodami ugotavljamo izražanje lastnosti bakterije, kamor sodi rast bakterije na gojiščih, oblika spor, značilen biokemijski in metaboličen profil bakterije in zelo pomembna virulenca bakterije, govorimo o fenotipu *P. larvae*.

V naši raziskavi smo s fenotipskimi metodami, kamor spada izolacija povzročitelja na trdih gojiščih in potrditev *P. larvae* z metodo MALDI TOF, ugotavljali prisotnost različnih morfotipov kolonij *P. larvae* med sevi, ki smo jih izolirali v Sloveniji med leti 2017 in 2019 iz spremenjene zalege in medu. Z različnimi molekularnimi metodami smo izolate *P. larvae* tipizirali, jim določili genotipe in za nekatere celo analizirali celotne genome.

### 5.1 Potrjevanje *P. larvae* z metodo MALDI TOF

Potrjevanje *P. larvae* s klasičnimi metodami - z ugotavljanjem makroskopskih in mikroskopskih lastnosti kolonij, s klasičnimi in komercialnimi biokemijskimi testi za identifikacijo ter dokazovanje bičkov s Plagemannovim testom je dolgotrajen postopek, ki traja 7 – 10 dni (Genersch in Otten, 2003; Genersch in sod. 2006). Zato smo v rutinsko diagnostiko *P. larvae* vpeljali metodo masne spektrometrije MALDI TOF in s tem posodobili algoritem ugotavljanja HGČZ pri nas (Priloga 1). Z validacijo smo ugotovili, da s to metodo lahko zelo zanesljivo identificiramo izolate vseh genotipov *P. larvae*. Omogočil nam je hitrejšo in cenejšo identifikacijo bakterije, saj smo metodo pogosto lahko uporabili že na primarni kulturi, sam postopek identifikacije pa je trajal le 10 – 15 minut. Na enak način smo lahko identificirali tudi številne kontaminante, ki so bili morfološko podobni *P. larvae* in smo jih tako lahko hitro izločili iz nadaljnje obravnave. Tako smo lahko pospešili tudi zaključevanje obravnave vzorcev, ki so bili negativni na *P. larvae*. Z uporabo nove identifikacijske metode MALDI TOF smo postopek bakteriološke preiskave in postavitve diagnoze skrajšali najmanj za polovico, kar je za čebelarja izjemno pomembno, ker mu omogoča hitrejšo ukrepanje. Metoda naj bi na osnovi analize masnega spektra omogočala tudi razlikovanje genotipov ERIC I in II (Schäfer in sod.,

2014), vendar se to na naši aparaturi Bruker Daltonics zaenkrat še ni izkazalo za izvedljivo. Zato smo za ločevanje med genotipi ERIC vpeljali mnogo bolj zanesljivo metodo ERIC-PCR.

## 5.2 Genotipi bakterije *P. larvae* v Sloveniji

Tipizacija z metodo ERIC je najbolj standardna tipizacijska metoda za *P. larvae*, na podlagi katere je izolate mogoče razvrstiti v 5 doslej opisanih genotipov (Genersch in sod., 2006; Beims in sod. 2020). Z našo raziskavo smo v Sloveniji izolate *P. larvae* prvič tipizirali in jim določili ERIC genotipe. Tipizirali smo 506 izolatov *P. larvae*, kar je po doslej znanih podatkih največje število tudi v svetovnem merilu. Ugotovili smo, da se, za razliko od naših sosednjih držav Avstrije (Lončarić in sod., 2009) in Italije (Bassi in sod., 2015), pri nas najpogosteje pojavljajo izbruhi HGČZ s povzročiteljem *P. larvae* genotipa ERIC II. Tako v zalegi kot tudi v medu se najpogosteje pojavlja genotip ERIC II. . Isti genotip prevladuje tudi na Češkem, kjer so opravili raziskavo na 102 izolatih *P. larvae* iz izbruhov HGČZ. Genotip ERIC I so ugotovili le na mejnih območjih s Poljsko, Slovaško in Avstrijo. (Biova in sod., 2021). Peters in sodelavci so s študijo na 176 izolatih ugotovili, da je prevladujoč genotip ERIC II tudi v severozahodni Nemčiji (Peters in sod., 2006). Pri naših sosedih v Avstriji so s to metodo tipizirali 214 izolatov *P. larvae* iz zalege in medu in ugotovili, da so izolati v 58 % pripadali genotipu ERIC I in v 42 % genotipu ERIC II (Lončarić in sod., 2009). V Italiji so ERIC tipizirali 117 izolatov *P. larvae* in ugotovili, da tudi v Italiji močno prevladuje genotip ERIC I. V severni Italiji so ugotovili prisotnost genotipa ERIC II v manjšem odstotku, medtem ko so se v centralni Italiji pojavljali izbruhi bolezni zgolj z genotipom ERIC I (Bassi in sod., 2015). Podatkov o pojavljanju genotipov ERIC v sosednji Hrvaški in Madžarski v literaturi nismo zasledili. V literaturi so še podatki o Belgiji, kjer prevladuje genotip ERIC I. Raziskavo so opravili na 116 izolatih *P. larvae* (Descamps in sod., 2016). Po podatkih iz literature izven Evrope, na Japonskem in v Severni Ameriki prevladuje genotip ERIC I (Ueno in sod., 2018; Krongdang in sod., 2017).

V naši raziskavi smo tipizirali vzorce iz 263 čebelnjakov in v 8 čebelnjakih ugotovili mešano okužbo z genotipoma ERIC I in II. O posameznih primerih mešanih okužb v čebelnjaku poročajo tudi iz Nemčije, Avstrije in Italije, kjer se oba genotipa pojavljata v izbruhih bolezni (Peters in sod., 2006; Lončarić in sod., 2009; Bassi in sod., 2015). Predvidevamo, da je prisotnost obeh genotipov znotraj enega čebelnjaka posledica velike gostote čebelnjakov v Sloveniji, kar omogoča učinkovito širjenje bolezni tako s strani čebel v posameznem kužnem krogu, kot s strani čebelarjev, ki povzročitelja lahko prenašajo na daljše razdalje.

Pomnožke DNA smo prikazali s kapilarno elektroforezo. Pri naših izolatih smo ugotovili za genotip ERIC II značilen pas pri 2800 bp, ta pas je značilno manjkal pri genotipu ERIC I. Ugotovili smo tudi dva spremenjena profila ERIC I, eden je imel dodaten pas pri 600 bp, drugi pa pri 650 bp. V primerjavi z gelsko elektroforezo, ki je bila do sedaj najpogosteje uporabljena, kapilarna elektroforeza zelo detajlno prikaže pomnožke DNA. Slike so čiste in primerljive, kar je zelo pomembno, ko želimo primerjati naše pomnožke DNA s pomnožki drugih raziskovalcev.

### 5.3 Sekvenciranje celotnih genomov *P. larvae*

Izbrali smo 59 epidemiološko in genetsko zanimivih izolatov iz naše raziskave in jim analizirali celotne genome. Z uporabo metode MLST, ki temelji na analizi sedmih hišnih genov, značilnih za *P. larvae*, in določitvi sekvenčnih tipov, je moč razlikovanja med izolati mnogo boljša, kot samo z določanjem genotipov ERIC. Izolati genotipa ERIC I so gensko najbolj raznoliki in se lahko razvrščajo v več sekvenčnih tipov kot izolati ostalih genotipov (Morrissey in sod., 2015). Danes je v podatkovno bazo *P. larvae* PubMLST vpisanih 34 poznanih sekvenčnih tipov (Jolley in sod., 2018). Vsem našim izolatom *P. larvae* genotipa ERIC I smo z metodo *in silico* MLST iz podatkov sekvenc celotnega genoma določili sekvenčni tip ST 2. V ST 2 so se razvrstili tudi izolati s spremenjenim profilom ERIC I.

Najmočnejšo oziroma neomejeno moč razlikovanja med tipi bakterij pa ima uporaba metode sekvenciranja celotnih genomov. Metoda cgMLST je bila uporabljena za epidemiološko študijo izbruhov HGČZ na Švedskem (Ågren in sod., 2017). Za razlikovanje med s posameznim izbruhom povezanimi in nepovezanimi izolati *P. larvae* so Papić in sodelavci razvili shemo wgMLST z največjo močjo razlikovanja, saj temelji na analizi celotnega genoma. Iz podatkov wgMLST lahko izolatom *P. larvae* določimo genotipe ERIC, ki se razvrščajo vsak v svoj klad, določimo lahko sekvenčne tipe, ki se razvrščajo v gruče, na podlagi razlik v alelih pa lahko določimo tudi ali izolati sodijo v skupen izbruh bolezni ali ne (Papić in sod., 2021). Vseh 59 izolatov iz naše študije se je z metodo wgMLST filogenetsko razvrstilo v klad ERIC I in celo v isto gručo ERIC I-ST2. Največja razlika med z izbruhom povezanim in nepovezanim izolatom je bila 52 razlik v alelih, največja razlika med z izbruhom povezanimi izolati pa je bila 34 razlik v alelih. Ugotovili smo, da se izolati, ki so genetsko in epizootiološko povezani, razlikujejo v največ 34 alelih wgMLST na minimalnem vpetem drevesu (MST). Zato smo za gručo klonalnih – genetsko povezanih izolatov določili mejno razliko v alelih 35 AD, kar se je skladalo s predhodno opisanimi razlikami med z izbruhom povezanim in nepovezanim izolatom (Papić in



sod., 2021). Ugotovljena meja za opredelitev klonalno povezanih izolatov *P. larvae* je velikega pomena za razumevanje genetike in evolucije omenjene bakterije ter za prihodnje epidemiološke preiskave HGČZ. Na primeru preiskovanih izbruhov smo pokazali prednosti metode wgMLST v primerjavi z metodama MLST in ERIC, ki nimata zadostne moči razlikovanja za opredelitev klonalnih izolatov. Z upoštevanjem epidemioloških podatkov smo ugotovili sedem izbruhov bolezni. S posameznimi izbruhi smo lahko povezali tudi izolate z genotipom ERIC I s spremenjenim profilom. Ugotovili smo tudi tri prenose klona *P. larvae*, ki ga nismo mogli pojasniti s preletno razdaljo čebel (aktivnostjo čebel), temveč s človeško aktivnostjo (premik čebel na skupno pašo, skupni oskrbovalec čebelnjakov ali čebelarska oprema in izmenjava čebeljih družin). To dokazuje, da so za končno potrditev izbruhov ključni natančni epidemiološki podatki in dobre tipizacijske metode, ki omogočajo prepoznavanje genetsko identičnih povzročiteljev. Na podlagi ugotovljenih dejstev pri preiskovanju naših izbruhov je potrjeno, da je upoštevanje dobre čebelarske prakse eden izmed najpomembnejših načinov omejevanja HGČZ.

Dolgo časa so bili znani in opisani le štirje genetski tipi *P. larvae* (ERIC I-IV), leta 2020 pa so v Španiji iz medu izolirali sev, ki predstavlja nov genotip ERIC V (Beims in sod., 2020). Tudi za naše izolate s spremenjenimi profili ERIC I, ki smo jih ugotovili s tipizacijo ERIC, smo sprva menili, da predstavljajo nov ERIC genotip *P. larvae*. Kasneje se je izkazalo, da ne predstavljajo novega genotipa, ampak so razlike najverjetneje posledica uporabe zelo natančne metode s kapilarno elektroforezo, ki zelo podrobno prikaže pomnožke DNA. Za določitev novega genotipa bi se le-ta v filogenetskem drevesu razvrstil v svoj klad, s poskusi pa bi bilo potrebno ugotoviti tudi njegove fenotipske lastnosti.

Vpeljava in uporaba metode WGS ima v posodobljenem algoritmu ugotavljanja HGČZ (Priloga 1) največji doprinos, saj je analiza celotnih genomov v povezavi z epidemiološkimi podatki trenutno najboljša metoda za ugotavljanje poti širjenja bolezni.

#### **5.4 Primerjava fenotipov in genotipov *P. larvae***

Večina bakterij raste na trdnih gojiščih v obliki kolonij, ki so značilne za določeno bakterijsko vrsto. Sevi bakterije *P. larvae* pa imajo posebno lastnost, da lahko rastejo v obliki zelo različnih kolonij, ki se lahko razlikujejo po obliki, barvi, velikosti in teksturi površine. Razlike v morfologiji kolonij so tako velike, da se v določenih primerih zdi skoraj neverjetno, da bi lahko pripadale isti vrsti. Idealno bi bilo, če bi lahko na podlagi teh morfoloških lastnosti posameznih tipov kolonij razlikovali med posameznimi genotipi, vendar so te lastnosti precej spremenljive

in odvisne od številnih dejavnikov. S fenotipsko metodo ugotavljanja rasti *P. larvae* na trdnih gojiščih smo pri naših izolatih ugotovili dva morfotipa, kot sta opisana v literaturi (Genersch in Otten, 2003; Neuendorf in sod., 2004). Večina avtorjev jih opredeljuje zgolj opisno, drugi pa jih označujejo kot morfotip I in II. V naši raziskavi, ki je temeljila na največjem doslej opisanem številu izolatov, so morfotip I predstavljale dokaj enotne sive hrapave kolonije, ki se s časom inkubacije in pasažo niso spreminjale. Morfotip II pa je predstavljala zelo pestra zbirka sivih gladkih in različno pigmentiranih kolonij, ki so s starostjo in pasažo lahko spreminjale obarvanje. Morfološki tip kolonij *P. larvae* je do neke mere povezan s tipom ERIC, vendar je po podatkih raziskave v Italiji morfotip kolonij odvisen tudi od bakterijske pasaže (Bassi in sod., 2015). S primerjavo genotipa in morfotipa *P. larvae* smo ugotovili, da so bile kolonije morfotipa II genotipsko opredeljene kot genotip ERIC II. Tudi kolonije morfotipa I so bile v večini potrjene kot genotip ERIC I, vendar smo pri 16 % kolonij morfotipa I ugotovili neznačilen genotip ERIC II. Po pričakovanjih je bil morfotip kolonij spremenjenih profilov ERIC I enak morfotipu I, značilnemu za genotip ERIC I.

Od naših 99 izolatov genotipa ERIC I jih je 98 (99%) raslo v obliki sivih hrapavih kolonij morfotipa I, od tega je bil en izolat tudi hemolitičen. Samo en izolat tipa ERIC I je rasel v obliki sivih gladkih kolonij, (ki so sicer značilne za genotip ERIC II), zato ugotavljamo, da sta hrapavost površine in neobarvanost kolonij zelo zanesljivi morfološki lastnosti za preliminarno določanje genotipa ERIC I. Poleg tega je bila pri vseh naših izolatih ta lastnost stabilna in se s pasažami ni spreminjala. Mnogo manj diagnostično zanesljiv pa je bil izgled kolonij morfotipa II.

Rezultati fenotipskih in molekularnih metod v naši raziskavi so bili primerljivi, ne pa popolnoma skladni. Naša študija kaže, da se obarvanost kolonij lahko spreminja glede na starost kolonij na gojišču – s starostjo se kolonije lahko bolj intenzivno obarvajo ali se razbarvajo. Nekatere kolonije, ki so ob izolaciji povzročitelja zrasle kot pigmentirane, so ob presajanju na sveže gojišče izgubile obarvanje in so rasle v obliki sivih gladkih kolonij. Tako bi prisotnost kolonij morfotipa I lahko uporabljali kot orientacijsko metodo za preliminarno določanje genotipa ERIC I. Kolonije morfotipa II se lahko pojavljajo pri genotipih II, III, IV in V, zato je določanje genotipa na tej osnovi nemogoče. Ker pa v Sloveniji ostali genotipi še niso bili ugotovljeni, bi bila uporabna tudi za preliminarno določanje genotipa II.

Ker smo v osmih kužnih krogih, celo v istem čebelnjaku, v zalegi in medu ugotovili prisotnost obeh genotipov ERIC I in II z značilnima pripadajočima morfotipoma menimo, da rezultate fenotipskih in molekularnih metod lahko ocenimo kot primerljive in tako potrdimo hipotezo 1..

### **Hipoteza 2:**

Genotip *P. larvae* določa klinično sliko hude gnilobe čebelje zalege oziroma prizadetost čebelje družine.

## **5.5 Pomen epidemioloških podatkov**

V naši raziskavi smo epidemiološke podatke pridobili s pomočjo anketnega vprašalnika, ki ga je izpolnilo 84 čebelarjev v letu 2019. Na drugi del vprašalnika so v zvezi z dotičnimi čebelarji in namenom obiska odgovarjali tudi veterinarji ZVČ. Sodelovalo je 60 čebelarjev, pri katerih je bila potrjena HGČZ in 24 čebelarjev brez HGČZ. Rezultati naše raziskave kažejo na povezavo med prisotnostjo HGČZ v čebelnjaku in pojavom bolezni v preteklosti ter lovljenjem rojev. Ugotovili smo majhen delež čebelarjev, ki so posojali ali si izposojali čebelarsko opremo, prodajali ter vozili čebele na pašo. Ta čebelarska praksa je pomembna pri širjenju hude gnilobe. Pri oceni higienskih in drugih biovarnostnih razmer smo ugotovili, da so imeli čebelarji z boljšo samooceno, višjo pojavnost hude gnilobe kot čebelarji, ki so te razmere slabše ocenili. Menimo, da je samokritičnost čebelarjev bistveno prispeva k bolj vestnemu čebelarjenju in s tem zmanjšanju najpogostejših vzrokov za prenos bolezni. Veterinarji so iste dejavnike v čebelnjakih ocenili bolj kritično. Čebelarji so v primeru suma na HGČZ, kot je predpisano (Pravilnik, 2020), večinoma poklicali veterinarja specialista za ZVČ. Več kot polovica čebelarjev za prodajo oziroma nakup in kar nekaj čebelarjev za prevoz na pašo ni imelo urejene dokumentacije. Ker so premiki čebeljih družin zelo pomemben način širjenja hude gnilobe na daljše razdalje, predstavlja neurejena dokumentacija oz. in pogosto s tem povezano manj vestno čebelarjenje, precejšnje tveganje.

Dobro poznavanje epidemiološkega statusa čebelarja so, poleg izolacije povzročitelja, najpomembnejše informacije pri proučevanju pojavljanja in širjenja HGČZ.

## **5.6 Povezava klinične slike z genotipom ERIC**

Bakterije različnih genotipov *P. larvae* se fenotipsko razlikujejo tudi v izražanju virulentnih lastnosti. Že dolgo je znano, da so bakterije *P. larvae* genotipa ERIC II »hitri ubijalci«, ki povzročijo smrt ličink, ko satne celice še niso zaprte. *P. larvae* genotipa ERIC II pa so »počasni ubijalci« in povzročijo smrt ličinke v zaprtih satnih celicah (Genersch in sod.; 2005). Pri

okužbah z genotipom ERIC II odrasle čebele zelo učinkovito očistijo odmrlo zalego, praviloma še pred nastankom vlecljive mase, zato nastane manj spor, bolezen se v panju razvija počasneje, in počasneje pride do propada čebelje družine. Pri okužbah z genotipom ERIC I pa je čistilni odgovor čebel manj učinkovit, v vlecljivi masi pod pokrovcem se tvori veliko število spor, kar lahko vodi v prikrito, vendar učinkovito širjenje bolezni znotraj panja in propada čebelje družine. (Rauch in sod.; 2009). V Prilogi 1, Pravilnika o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje HGČZ in OIE so klinični znaki HGČZ opredeljeni kot presledkasta zalega, spremembe na celičnih pokrovcih in spremenjena barva in konzistenca obolelih čebeljih ličink (Pravilnik, OIE). Po podatkih iz literature, ki se opirajo na rezultate poskusov na čebeljih ličinkah, naj bi bili klinični znaki, ki se ugotavljajo pri oboleli čebelji družini odvisni od genotipa ERIC (Rauch in sod., 2009). Vendar na izražanje lastnosti genotipa *P. larvae* vplivajo številni dejavniki, v odvisnosti od celotne čebelje družine in posamezne okužene ličinke. Ključna je čistilna sposobnost družine, ki je sama po sebi odvisna od jakosti družine, zaleganja matice, stresnih dejavnikov zaradi prevozov in prevelike gostote družin na določenem območju in številnih drugih zunanjih dejavnikov. Tako ima lahko genotip ERIC I v čebelji družini z odlično čistilno sposobnostjo zelo podoben učinek kot genotip ERIC II v družini z zelo slabo čistilno sposobnostjo. Tudi obrambna sposobnost posamezne ličinke je odvisna od več dejavnikov kot so genetska odpornost ličink, prehrana in mikrobiota v črevesju ličink.

Doslej so nekateri avtorji že opisovali vse naštetе klinične znake, v nobeni študiji pa še nismo zasledili, da bi določen znak signifikantno povezali z okužbo s *P. larvae* določenega genotipa. V naši raziskavi smo s pomočjo odgovorov anketnega vprašalnika opravili študijo prisotnosti podrobno opisanih posameznih kliničnih znakov v 60 čebelnjakih pozitivnih na HGČZ. Čebelje družine čebelarjev, ki so sodelovali v naši anketi, so imele različne zunanje dejavnike naključno prisotne in jih v naši raziskavi nismo spremljali. S statistično analizo podatkov pa smo kljub vplivu različnih naključnih dejavnikov ugotovili statistično pomembne značilnosti, ki so bile povezane s posameznim genotipom ERIC. Okužbe, povzročene s *P. larvae* genotipa ERIC I, so bile statistično značilno povezane z večjim deležem sprememb na satju. Ugotovili smo tri klinične znake, ki so bili statistično značilno povezani le s tem tipom in sicer mrtve ličinke v obliki mešička, bolezenske spremembe, prisotne na treh ali več satih in odsotnost varoje. Slednja ugotovitev je presenetljiva, ker je prisotnost *P. larvae* ERIC I običajno povezana z varozo, v naši raziskavi pa se je izkazalo ravno obratno. To dejstvo je lahko povezano tudi z drugimi dejavniki, ki jih v naši raziskavi nismo preverjali.

Pri okužbah s *P. larvae* genotipa ERIC II smo ugotovili statistično večji delež sprememb na ličinkah. Izstopalo je dvanajst kliničnih znakov, za katere smo ugotovili statistično značilno povezanost z genotipom ERIC II in sicer: zalega neenakomerne starosti, mrtve ličinke v celicah, ličinke spremenjene barve, vlecljiva vsebina celic belega ali rjavega odtenka, posamezne poapnele ličinke, bolezenske spremembe, prisotne na svetlem in temnem satu, spremembe na enem ali dveh satih, delno oslabela ter izropana čebelja družina. Po nam znanih podatkih je to prva raziskava, kjer so bile razlike v izraženosti bolezni med genotipoma ERIC I in ERIC II statistično ovrednotene tudi na nivoju posameznih kliničnih znakov.

Po podatkih iz literature naj bi bilo pri okužbah z genotipom ERIC II število prizadetih satnih celic manjše zaradi čistilnega nagona čebel; posledično je bolezen ob kliničnem pregledu težje prepoznati (Genersch, 2010). Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da je genotip v povprečni populaciji čebeljih družin dejansko zelo pomemben dejavnik in lahko vpliva na klinično sliko HGČZ, v odvisnosti od številnih dejavnikov pa se v panju izrazi ali ne izrazi. Rezultati naše raziskave kažejo, da lahko hipotezo, da genotip *P. larvae* določa klinično sliko HGČZ oziroma prizadetost čebelje družine, potrdimo.

### 5.7 Protimikrobna aktivnost *P. larvae*

**Hipoteza 3:** Izolati različnih genotipov *P. larvae* bodo izražali različno protimikrobno aktivnost.

V patogenezi HGČZ je po *per oralni* okužbi čebelje ličinke s sporami povzročitelja, vzklitja spor in masovne namnožitve vegetativnih bakterij zelo pomembna nadvlada bakterij *P. larvae* nad ostalo mikrobioto v črevesju ličinke. Z razvojem molekularnih metod so s proučevanjem celotnih genomov ugotovili, da oba genotipa ERIC, ki se pojavljata v kliničnih izbruhih bolezni, vsebujeta skupke genov za multiencimske komplekse, ki proizvajajo sekundarne presnovke s številnimi biološkimi aktivnostmi. Ugotovili so, da lahko delujejo protibakterijsko, protiglivno, protivirusno, celo citotoksično, vendar so bile vse dosedanje raziskave opravljene na omejenem številu referenčnih sevov, ne pa rutinsko pridobljenih izolatov (Poppinga in Genersch, 2015). V naši raziskavi smo pri rednih bakterioloških preiskavah medu ob kolonijah nekaterih izolatov *P. larvae* opazili izrazito veliko cono inhibicije rasti drugih bakterij, ki smo jih sicer obravnavali kot saprofite oz. kontaminante. Kontaminanti so se pojavljali samo pri izolaciji *P. larvae* iz medu, saj v spremenjeni zalegi povzročitelj običajno inhibira vse ostale bakterije in zato praviloma zraste v čisti kulturi. Večina kontaminantov je bila po Gramu pozitivnih bakterij iz rodu *Bacillus*, ki so praviloma sporogeni in (podobno kot spore *P. larvae*) dobro preživijo

ekstremne pogoje z visoko koncentracijo sladkorja v medu in predhodno toplotno obdelavo materiala. Kolonije *P. larvae* na umetnem gojišču sicer rastejo počasneje kot ostale bakterije, vendar že v začetku rasti (podobno kot v satni celici) začnejo v okolico izločati presnovne produkte s protimikrobno aktivnostjo, ki zavrejo rast drugih bakterij v okolici. Cone inhibicije rasti smo opazili pri obeh morfotipih kolonij *P. larvae*, vendar je bila pogostejše izražena pri morfotipu II, ki je značilen za genotip ERIC II. Tudi pri neposrednem nasajanju *P. larvae* ob *B. subtilis* smo ugotovili, da različni klinični izolati izražajo različno stopnjo inhibicije rasti. Z difuzijsko metodo smo šibko protimikrobno delovanje proti po Gramu pozitivnim bakterijam ugotovili samo pri kliničnih izolatih genotipa ERIC I. Posebej spodbudno je bilo protibakterijsko delovanje na proti meticilinu odporen sev *S. pseudintermedius* (MRSP). Zanj je značilno, da je večkratno odporen proti številnim drugim antibiotikom in za zdravljenje nimamo več učinkovitih zdravil, zato je bilo inhibitorno delovanje na njegovo rast še posebej zanimivo in pomembno. Izolacija naravnega metabolita *P. larvae* z učinkovitim protibakterijskim delovanjem bi lahko pomenila dobro osnovo za nadaljnji razvoj učinkovitega antibiotika. Pri našem gojenju *P. larvae* na tekočih gojiščih za pridobivanje metabolitov s protimikrobnim delovanjem smo opazili razlike v izločanju glede na vrsto substrata, kar pomeni, da bi bilo pri nadaljnjih raziskavah potrebno zelo natančno optimizirati način pridobivanja in čiščenja presnovnih produktov.

Nismo pa uspeli izolirati snovi s protimikrobnim delovanjem pri nobenem od petih referenčnih sevov *P. larvae*, niti pri kliničnih izolatih genotipa ERIC II, ki po podatkih iz literature močnejše inhibira rast po Gramu pozitivnih bakterij (Garcia-Gonzales in sod., 2014a). Pri naših kliničnih izolatih genotipa ERIC I smo ugotovili tudi šibko protiglivno delovanje na rast kvasovke *Malassezia pachydermatis*. Nismo pa ugotovili nobene inhibicije rasti po Gramu negativnih bakterij, kar nakazuje, da protimikrobne snovi, ki jih izloča *P. larvae*, verjetno delujejo na celično steno, ali katero od drugih celičnih struktur, ki je značilna le za po Gramu pozitivne bakterije. Po podatkih iz literature večina bakterij, ki so povezane s čebeljo ličinko, a zanje niso patogene, sodi med po Gramu pozitivne bakterije (Gilliam, 1997), zato se naše ugotovitve zdijo smiselne. Zdi se, da *P. larvae* v satni celici med napadom na ličinko potrebuje učinkovito obrambo le proti po Gramu pozitivnim bakterijam.

Pri pregledu in primerjavi gruč genov za sintezo sekundarnih presnovkov v celotnih genomih naših kliničnih izolatov smo pri obeh genotipih ERIC I in II ugotovili prisotnost genov za sevadicin in penilamicin. Za sevadicin je opisano šibko protibakterijsko delovanje (Garcia-

Gonzales in sod., 2014a), penilamicin pa naj bi imel poleg protibakterijskega tudi protiglivni in citotoksični učinek (Garcia-Gonzales in sod., 2014b). Pri izolatih genotipa ERIC I smo ugotovili tudi gručo genov za amilociklicin s 100 % pokritostjo. Gručo za amilociklicin so najverjetneje vsebovali tudi izolati genotipa ERIC II, vendar je bila pokritost genoma nekoliko nižja (85 %). Amilociklicin deluje protimikrobno proti po Gramu pozitivnim bakterijam (Scholz in sod., 2014). Naši rezultati kažejo, da je v genomu zapisno veliko informacij, ni pa nujno, da se vsi zapisi nato fenotipsko izrazijo. V raziskavi smo ugotovili, da sta imela oba genotipa v genomu zapise za sekundarne metabolite, z difuzijsko metodo pa smo protimikrobno delovanje uspeli dokazati samo pri genotipu ERIC I. Na take rezultate je lahko vplivalo premajhno število testiranih izolatov. Ob preverjanju večjega števila izolatov *P. larvae* posameznega genotipa bi mogoče ugotovili protimikrobno delovanje tudi pri izolatih genotipa ERIC II. Poleg tega na fenotipsko izražanje genov za sintezo metabolitov s protimikrobnim delovanjem, podobno kot pri virulenci, vplivajo zunanji dejavniki okolja. Na podlagi dosedanjih rezultatov se zdi, da je izražanje inhibitornih snovi bolj lastnost posameznega izolata kot pa pripadnost določenemu genotipu, kar bi bilo potrebno potrditi z nadaljnjimi raziskavami. Zato smo hipotezo 3, da bodo izolati različnih genotipov izražali različno protimikrobno aktivnost, delno potrdili.

---

## 6 ZAKLJUČKI

Z vpeljavo metode masne spektrometrije MALDI TOF smo posodobili rutinsko laboratorijsko diagnostiko HGČZ ter občutno skrajšali in pocenili bakteriološko preiskavo na prisotnost *P. larvae* v vzorcih spremenjene zalege, medu in drugih čebeljih proizvodov.

V izbruhih HGČZ v Sloveniji smo prvič tipizirali izolate *P. larvae* in potrdili prisotnost genotipov ERIC I in ERIC II. Vpeljava tipizacijske metode ERIC-PCR predstavlja velik doprinos za raziskave *P. larvae* pri nas. Število tipiziranih izolatov je bilo, kljub majhnosti preiskovanega geografskega območja, ki ga predstavlja Slovenija, tudi v svetovnem merilu največje doslej. Genotip ERIC II se je pojavljal pogosteje, tako v medu kot v spremenjeni zalegi. Genotipov ERIC III, IV in V pri nas, podobno kot drugod po svetu, nismo ugotovili.

Ugotovili smo rast kolonij *P. larvae* v dveh morfotipih. Za morfotip I je bila značilna rast sivih hrapavih kolonij, ki se s časom inkubacije in pasažami bakterij na umetnih gojiščih, niso spreminjale. Za morfotip II je bila značilna rast sivih gladkih ali pigmentiranih kolonij, ki se jim je s časom inkubacije obarvanje lahko spreminjalo. Pri kolonijah morfotipa II smo v večini primerov potrdili značilen genotip ERIC II, pri kolonijah morfotipa I pa smo potrdili genotip ERIC I. Rezultati fenotipskih metod za ugotavljanje morfotipa in molekularnih metod za ugotavljanje genotipa ERIC so bili primerljivi, ne pa popolnoma skladni.

Z molekularnimi metodami smo v osmih kužnih krogih, celo v istem čebelnjaku, v zalegi in medu, naključno ugotovili prisotnost obeh genotipov ERIC I in II. Te ugotovitve kažejo, da HGČZ v Sloveniji ob veliki gostoti čebelarstev lahko ostane nediagnosticirana in se tako prenaša med čebelnjaki in kužnimi krogi.

Tipizacija z metodo ERIC-PCR in tudi določanje sekvenčnih tipov z metodo MLST nimata zadostne moči razlikovanja za ugotavljanje sorodnosti med izolati *P. larvae*. Samo z metodo WGS in analizo celotnih genov, z največjo močjo razlikovanja lahko proučujemo filogenijo in klonalnost izolatov *P. larvae* ter ugotavljamo epidemiološke povezave ter načine širjenja HGČZ.

Izražanje kliničnih znakov HGČZ je odvisno od virulence genotipa ERIC, vitalnosti in čistilne sposobnosti čebelje družine in posamezne čebelje ličinke. Kljub vplivu številnih dejavnikov na čebeljo družino in na čebeljo ličinko, smo s statističnimi metodami ugotovili, da so za okužbo z genotipom ERIC I bolj značilne klinične spremembe na satju, za okužbo z genotipom ERIC II pa spremembe na ličinkah.



Izražanje protimikrobne aktivnosti smo ugotovili le pri izolatih genotipa ERIC I, kljub temu, da sta oba genotipa ERIC I in II v genomu vsebovala gene za metabolne produkte s protimikrobno aktivnostjo. Dosedanji rezultati kažejo, da je izražanje inhibitornih snovi verjetno lastnost posameznega izolata, ne pa pripadnost določenemu genotipu *P. larvae*, vendar bi bile za potrditev te domneve potrebne nadaljnje raziskave.

---

## 7 POVZETEK

Huda gniloba čebelje zalege (HGČZ) je najhujša bakterijska bolezen čebelje družine, ki ogroža čebele po celem svetu. Povzroča jo po Gramu pozitivna sporogena bakterija *P. larvae*. Na okužbo so občutljive samo ličinke, ki se okužijo s spori kontaminirano hrano. Spore *P. larvae* so zelo odporne in v okolju ostajajo infektivne več desetletij. *P. larvae* povzroča postopno obolevanje in odmiranje čebelje zalege, kar vodi do oslabitve in propada celotne čebelje družine. Bolezen se ne zdravi. V skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje HGČZ (Uradni list RS, št. 10/20 in 61/20) je vsak sum na bolezen potrebno prijaviti in potrditi z izolacijo povzročitelja. Najučinkovitejši ukrep za nadzor HGČZ je preprečevanje širjenja bolezni.

V naši raziskavi smo v letih 2017 – 2019 iz izbruhov bolezni v Sloveniji pridobili izolate *P. larvae* in zbrali pripadajoče epidemiološke podatke. Izolate smo pridobili iz vzorcev spremenjene zalege in medu iz različnih regij Slovenije, kjer se je HGČZ v teh letih pojavila. V rutinsko diagnostiko HGČZ v Sloveniji smo vpeljali metodo masne spektrometrije MALDI TOF, kar je občutno skrajšalo čas in pocenilo bakteriološko preiskavo na bakterijo *P. larvae*.

S podatki pridobljenimi iz anketnega vprašalnika za epidemiološko poizvedovanje smo pridobili natančen vpogled v vzorec populacije čebelarjev in čebelarske prakse v Sloveniji. Potrdili smo glavne dejavnike tveganja za pojav HGČZ in ugotovili značilne razlike v pojavnosti kliničnih znakov med genotipoma ERIC I in II.

Vpeljali smo molekularno metodo ERIC-PCR za tipizacijo izolatov *P. larvae*. Za prikaz in analizo pomnožkov DNA smo kot prvi uporabili kapilarno elektroforezo, ki omogoča zelo dobro primerjavo genskih profilov ERIC. Z metodo ERIC-PCR smo tipizirali veliko število izolatov ( $n = 506$ ) in tako kot prvi ugotavljali zastopanost posameznih genotipov ERIC v Sloveniji. Ugotovili smo, da za razliko od naših sosednjih držav in večine Evrope ter sveta, pri nas prevladuje genotip ERIC II (70,2 %), sledi pa mu genotip ERIC I (29,8 %). Genotipov ERIC III, IV in V tudi v Sloveniji nismo odkrili, ugotovili pa smo dva nekoliko spremenjena profila ERIC I, ki sta se po WGS tipizaciji sicer razvrstila v genotip ERIC I.

Z metodo sekvenciranja celotnih genomov (WGS) smo genotipizirali 59 izolatov; določili smo jim sekvenčni tip (ST) in jih v povezavi z epidemiološkimi podatki razvrstili v sedem izbruhov HGČZ. Metoda WGS je tipizacijska metoda z največjo močjo razlikovanja, ki omogoča proučevanje poti širjenja bolezni in opredeljevanje izbruhov. Ko smo z metodo wgMLST

primerjali zaporedja lokusov v celotnih genomih z zaporedji dostopnimi v javnih podatkovnih zbirkah ( $n = 179$ ), so se vsi naši izolati filogenetsko razvrstili v klad ERIC I in gručo ERIC I-ST2; analiza je temeljila na 5738 lokusih. Določili smo mejno razliko v alelih (35 AD) za ugotavljanje poti prenosa HGČZ in opredeljevanje izbruhov, t.j. razlikovanje med izolati, ki so del izbruha (klonalni ali genetsko povezani izolati) in tistimi, ki niso. Pri vseh sedmih izbruhih smo potrdili prenos okužbe znotraj kužnega kroga, kar je pričakovano glede na aktivnost čebel. V treh primerih pa smo ugotovili prenos bolezni na daljše razdalje, izven kužnega kroga, kar je posledica aktivnosti čebelarjev. Ker je bilo potrjenih več takih primerov, lahko sklepamo, da je v Sloveniji prenos bolezni z aktivnostjo čebelarjev pomemben dejavnik širjenja HGČZ. V osmih primerih smo v istem kužnem krogu in celo v istem čebelnjaku ugotovili dva ali več nesorodnih sevov povzročitelja. Te okužbe smo odkrili naključno, ker so bile prisotne na lokaciji kliničnih pregledov čebeljih družin v kužnem krogu in izvirno niso bile povezane s prvotno ugotovljenim žariščem bolezni.

Z analizo celotnih genomov smo pridobili tudi podatke o prisotnosti gruč genov za sintezo protimikrobnih substanc. Ugotovili smo, da imata oba genotipa ERIC I in II te gene, njihovo izražanje pa dokazali le pri posameznih izolatih genotipa ERIC I. Ugotovili smo šibko protimikrobno delovanje na po Gramu pozitivne bakterije in kvasovko *Malassezia pachydermatis*. Za dokončno potrditev hipoteze, da izolati različnih genotipov *P. larvae* izražajo različno protimikrobno aktivnost so potrebne nadaljnje raziskave.

---

## 8 SUMMARY

American foulbrood is the most devastating bacterial disease of honeybees worldwide. It is caused by the Gram-positive sporogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. Only larvae are susceptible to infection. They become infected by ingesting spore-contaminated food. *P. larvae* spores are extremely resistant and can remain infectious in the environment for decades. Due to *P. larvae*, the honeybee brood gradually becomes diseased and dies, leading to a severe deficit of the brood until the affected honeybee colonies are completely destroyed. The disease cannot be treated with drugs. Every AFB suspect case has to be reported and confirmed by *P. larvae* isolation in accordance with the Regulations on measures for the detection, control, notification and prevention of American foulbrood (Official Gazette of the Republic of Slovenia, No. 10/20 and 61/20). The most efficient measure for AFB control is to prevent its spread.

In the scope of our study, *P. larvae* and the corresponding epidemiological data were obtained for AFB outbreaks in Slovenia during 2017–2019. *P. larvae* was isolated from the diseased brood and honey obtained from different regions in Slovenia, where AFB outbreaks were reported. MALDI-TOF mass spectrometry was implemented into the routine diagnostics of AFB in Slovenia, significantly reducing the time and costs of *P. larvae* bacteriological examination.

Data obtained from the questionnaire for epidemiological investigation enabled us to gain a detailed insight into the population sample of beekeepers and beekeeping practices in our country. We identified the main risk factors for the occurrence of AFB and found significant differences in the frequency of clinical signs between ERIC genotypes I and II.

We implemented the molecular method ERIC-PCR for the typing of *P. larvae* isolates. For the first time, capillary electrophoresis was used for amplicon analysis, which significantly improved the reliability and comparability of the obtained ERIC profiles. Using ERIC-PCR, we typed a large number of isolates ( $n = 506$ ) and were able to determine the frequency of ERIC genotypes in Slovenia for the first time. Contrary to the neighboring countries and most of the Europe and worldwide, ERIC II was the predominant genotype (70.2 %) in Slovenia, followed by ERIC I (29.8 %). Also in Slovenia, ERIC genotypes III, IV and V were not present, but we discovered two ERIC I profiles with slightly altered banding pattern, but they clustered among the ERIC I genomes after WGS-typing.

Whole-genome sequencing (WGS) was used to genotype 59 isolates; their sequence type (ST) was determined, and we could cluster them into seven AFB outbreaks according to the associated epidemiological data. WGS enables typing with the highest possible resolution, that enables the identification of transmission routes and outbreak delineation. When we compared the whole-genome loci using the wgMLST analysis of the investigated isolates supplemented with all the publicly available *P. larvae* genomes ( $n = 179$ ), all Slovenian isolates fell within the ERIC I clade and phylogenetically clustered with the remaining ERIC I-ST2 genomes; the analysis was based on 5738 loci. We determined the approximate allele-difference threshold (35 AD) to detect the transmission routes and confirm AFB outbreaks, namely differentiate between the genetically closely related (clonal) isolates belonging to an outbreak and other isolates. For all seven outbreaks, we confirmed *P. larvae* transmission inside the AFB zone, which was expected due to the activity of honeybees. However, in three cases we confirmed a longer-distance transmission (outside the AFB zone), resulting from the activity of beekeepers. Since several such cases were confirmed, we can conclude that transportation of diseased honeybees is an important factor for AFB transmission in Slovenia. In eight cases, two or more genetically unrelated *P. larvae* strains were discovered in the same AFB zone or even in the same apiary. These infections were discovered coincidentally since they were present at the location of clinical examination of honeybee colonies inside the confirmed AFB zone and were not initially connected to the AFB outbreak.

Using WGS, in the genomes of *P. larvae* isolates we identified the presence of gene clusters for the synthesis of antimicrobial substances. Both ERIC I and II isolates harbored these genes, but their expression could be confirmed for individual ERIC I isolates. We determined a weak antimicrobial activity against Gram-positive bacteria and the yeast *Malassezia pachydermatis*. Further research is needed to definitively confirm the hypothesis that isolates of different *P. larvae* genotypes exhibit different antimicrobial activity.

## **9 ZAHVALE**

---

## 10 LITERATURA

- Ågren J, Schäfer MO, Forsgren E. Using whole genome sequencing to study American foulbrood epidemiology in honeybees. PLoS One 2017; 12(11): e0187924 (13 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0187924 (11. januar 2022)
- Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Antonie Van Leeuwenhoek 1993/1994; 64(3/4): 253–60.
- Bailey L. *Melissococcus pluton*. the cause of European foulbrood of honeybees (*Apis* spp.). J Appl Bacteriol 1983; 55: 65–9.
- 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, et al. 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; 310: e151394 (11 str.) doi: 10.1016/j.ijmm.2020.151394 (21. februar 2022)
- Bertolotti AC, Forsgren E, Schäfer MO, et al. Development and evaluation of a core genome multilocus sequence typing scheme for *Paenibacillus larvae*, the deadly American foulbrood pathogen of honeybees. Environ Microbiol 2021; 23: 5042–51. doi: 10.1111/1462-2920.15442 (11. januar 2022)
- Biova J, Bzdil J, Dostalkova S, et al. American foulbrood in the Czech Republic: ERIC II genotype of *Paenibacillus larvae* is prevalent. Front Vet Sci 2021; 8: e698976 (5 str.) doi: 10.3389/fvets.2021.698976 (21. februar 2022)
- Cheshire FR, Cheyne WW. The pathogenic history and history undercultivation of a new bacillus (*B. alvei*) the cause of a disease of the hive bee hithertoknown as foul brood. J R Microsc Soc 1885; 5: 581–601.
- de Graaf DC, Alippi AM, Brown M, et al. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. Lett Appl Microbiol 2006; 43(6): 583–90.

- 
- Djukic M, Brzuszkiewicz E, Fünfhaus A, et al. How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. PLoS One 2014; 9(3): e90914 (14 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0090914 (21. februar 2022)
  - Fries I, Lindström A, Korpela S. Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). Vet Microbiol 2006; 114: 269 – 74.
  - Fünfhaus A, Poppinga L, Genersch E. Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. Environ Microbiol 2013; 15: 2951–65.
  - Garcia-Gonzalez E, Genersch E. Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus larvae*, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. Environ Microbiol 2013; 15: 2894–901.
  - Garcia-Gonzalez E, Müller S, Ensle P, Süßmuth RD, Genersch E. Elucidation of sevadicin, a novel non-ribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. Environ Microbiol 2014a; 16: 1297–309.
  - Garcia-Gonzalez E, Muller S, Hertlein G, Heid N, Süßmuth RD, Genersch E. Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. Microbiologyopen 2014b; 3: 642–56 doi: 10.1002/mbo3.195 (21. februar 2022)
  - Garcia-Gonzalez E, Poppinga L, Fünfhaus A, et al. *Paenibacillus larvae* chitin degrading protein PICBP49 is a key virulence factor in American foulbrood of honey bees. PLoS Pathog 2014c; 10(7): e1004284 (12 str.) doi: 10.1371/journal.ppat.1004284 (21. februar 2022)
  - Genersch E, Otten C. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Apidologie 2003; 34: 195–206.
  - Genersch E, Ashiralieva A, Fries I. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the causative agent of American foulbrood disease in honey bees. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 7551–5.



- 
- Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, et al. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 501–11.
  - Genersch, E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* 2010; 103 (Suppl. 1): 10–19.
  - Gilliam M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 155 (1): 1–10.
  - Gregorc A, Bowen ID. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Cell Biol Int* 1998; 22 (2): 137–44.
  - Hertlein G, Muller S, Garcia-Gonzalez E, Poppinga L, Sussmuth R, Genersch E. Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* 2014; 9 (9): e108272 (12 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0108272 (14. januar 2022)
  - Hertlein G, Seiffert M, Gensel S, et al. Biological role of paenilarvins, iturin-like lipopeptide secondary metabolites produced by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* 2016; 11(10): e0164656 (14 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0164656 (21. februar 2022)
  - 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): 1195–99.
  - Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 2018; 3: e124 (20 str.) doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1 (2. marec 2022)
  - Krongdang S, Evans JD, Pettis JS, Chantawannakul P. Multilocus sequence typing, biochemical and antibiotic resistance characterizations reveal diversity of North American strains of the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* 2017; 12(5): e0176831 (16 str.) doi: 10.1371/journal.pone.0176831 (2. marec 2022)
  - Krska D, Ravulapalli R, Fieldhouse RJ, Lugo MR, Merrill AR. C3larvin toxin, an ADP ribosyltransferase from *Paenibacillus larvae*. *J Biol Chem* 2015; 290 (9): 1639–53.
  - Kušar D, Papić B, Zajc U, et al. Novel TaqMan PCR assay for the quantification of *Paenibacillus larvae* spores in bee-related samples. *Insects* 2021; 12: e1034 (18 str.) doi: 10.3390/insects12111034 (18. januar 2022)

- 
- Lončarić I, Derakhshifar I, Oberlerchner JT, Köglberger H, Moosbeckhofer R. Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria. J Invertebr Pathol 2009; 100: 44–6.
  - 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 2015; 17 (4): 1414–24.
  - Müller S, Garcia-Gonzalez E, Mainz A, et al. Paenilamicin: structure and biosynthesis of a hybrid non-ribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *Paenibacillus larvae*. Angew Chem Int Ed Engl 2014; 53 (40): 10821–5.
  - Müller S, Garcia-Gonzales E, Genersch E, Sussmuth RD. Involvement of secondary metabolites in the pathogenesis of American foulbrood of honey bees caused by *Paenibacillus larvae*. Nat Prod Rep 2015; 32: 765–78.
  - Neuendorf S, Hedtke K, Tangen G, Genersch E. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. Microbiology 2004; 150: 2381–90.
  - Papić B, Diricks M, Kušar D. Analysis of the global population structure of *Paenibacillus larvae* and outbreak investigation of American foulbrood using a stable wgMLST scheme. Front Vet Sci 2021; 8: e582677 doi: 10.3389/fvets.2021.582677 (8. marec 2022)
  - Peters M, Kilwinski J, Beringhoff A, Reckling D, Genersch E. American foulbrood of the honey bee: occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). J Vet Med B 2006; 53 (2): 100–4.
  - Poppinga L, Janesch B, Fünfhaus A, et al. Identification and functional analysis of the S-layer protein SplA of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honey bees. PLoS Pathog 2012; 8: e1002716 doi: 10.1371/journal.ppat.1002716 (21. februar 2022)
  - Poppinga L, Genersch E. Molecular pathogenesis of American foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae. Curr Opin Insect Sci 2015; 10: 29–36.
  - Pravilnik o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege. Ur List RS 2020; 30 (10): 1035–6. (21. februar 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: 3344–7.
  - Schäfer MO, Genersch E, Fünfhaus A, et al. Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Vet Microbiol* 2014; 170(3/4): 291–7.
  - Scholz R, Vater J, Budiharjo A, et al. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol* 2014; 196 (10): 1842–52.
  - Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015; 6: e791(16 str.) doi: 10.3389/fmicb.2015.00791
  - Sood S, Steinmetz H, Beims B, et al. Paenilarvins: iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Chem Bio Chem* 2014; 15: 1947–55.
  - Sulimanović Đ, Jenčič V. Čebelja družina in njene bolezni. Ljubljana : Veterinarska fakulteta UL, 1996.
  - Ueno Y, Yoshida E, Misumi W, et al. Population structure and antimicrobial susceptibility of *Paenibacillus larvae* isolates from American foulbrood cases in *Apis mellifera* in Japan. *Environ Microbiol Rep* 2018; 10: 210–6.
  - Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Method Mol Cell Biol* 1994; 5(1): 25–40.
  - Vanengelsdorp M, Meixner MD. A historical review of managed honey bee population in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* 2010; 103 (Suppl. 1): S80–95.
  - Yue D, Nordhoff M, Wieler LH, Genersch E. Fluorescence in situ-hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* 2008; 10: 1612–20.
  - White GF. The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. Washington : U. S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology, 1906: 1–50.

- 
- Wilson WT. Resistance to American foulbrood in honey bees: 12 persistence of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. J Invertebr Pathol 1971; 17 (2): 247–55.
  - World Organisation for Animal Health (OIE). Infection of honey bees with *Paenibacillus larvae* (American foulbrood). In: Terrestrial animal health code. 28<sup>th</sup> ed. (online) Paris : Office International des Epizooties, 2021: Chapter 9.2, 1–4.  
[https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre\\_paenibacillus\\_larvae.htm](https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_paenibacillus_larvae.htm)  
 (10. marec 2022)
  - World Organisation for Animal Health (OIE). American foulbrood of honey bees (Infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*). In: Terrestrial animal health manual. (online) Paris : Office International des Epizooties, 2018: Chapter 3.2.2, 1–17.  
[https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.02.02\\_AMERICAN\\_FOULBROOD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf) (10. marec 2022)
  - Žugelj A, Papić B, Zdovc I, et al. ERIC and WGS typing of *Paenibacillus larvae* in Slovenia: investigation of ERIC I outbreaks. Insects 2021; 12 (4): e362.  
 doi: 10.3390/insects12040362 (11. marec 2022)

## 11 PRILOGE

**Priloga 1:** Posodobljen algoritem ugotavljanja HGČZ – v rutinsko diagnostiko (modra) vpeljana metoda masne spektrometrije MALDI TOF za potrditev *P. larvae*; vpeljeni metodi tipizacije *P. larvae* za uporabo v raziskovalne namene (oranžna)

**Supplementary data 1:** Updated algorithm of AFB detection – mass spectrometry MALDI TOF for *P. larvae* identification is introduced in routine diagnostic (blue); introduced typing methods for *P. larvae* for research purposes (orange)



**Priloga 2:** Anketni vprašalnik  
**Supplementary data 2:** Questionnaire

**VPRAŠALNIK ZA UGOTAVLJANJE POTI ŠIRJENJA  
 HUDE GNILOBE ČEBELJE ZALEGE**

Raziskovalci in veterinarji z Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani anketiramo čebelarje o dejavnikih tveganja povezanih s hudo gnilobo čebelje zalege. Vprašalnik je del Ciljno raziskovalnega projekta: CRP V4 – 1804.

Cilji raziskave so:

- priprava smernic za učinkovitejše preprečevanje širjenja bolezni,
- preučitev smotrnosti trenutno veljavnih predpisov za nadzor bolezni in
- zmanjšanje ekonomskih izgub čebelarjev.

Če imate v zvezi z anketo kakršnokoli vprašanje, se lahko obrnite na vodjo projekta dr. Darjo Kušar (darja.kusar@vf.uni-lj.si, 01 4779 166).

**VAROVANJE PODATKOV**

Zagotavljamo vam, da bodo **VSI ODGOVORI obravnavani ZAUPNO**, v skladu z **veljavno zakonodajo** in bodo skrbno varovani ter namenjeni **LE SKUPNI OBDELAVI PODATKOV** za potrebe omenjene raziskave. Noben odgovor ne bo povezan z vami osebno, niti pri analizi niti v poročilih.

*Vaše osebne podatke potrebujemo izključno za potrditev prejema odgovorov s strani lastnika čebelnjaka in geografske zastopanosti.*

**Ime in priimek:** \_\_\_\_\_

**Naslov:**  
 \_\_\_\_\_

**Številka čebelnjaka SI:** \_\_\_\_\_

**Ali želite prejeti povzetek rezultatov ankete?**

☐ Da → Prosimo, da nam zaupate vaš elektronski naslov:

\_\_\_\_\_

☐ Ne

**IZJAVA ČEBELARJA**

Izjavljam, da se strinjam z obdelavo podatkov iz te ankete izključno za uporabo v raziskavi v okviru projekta CRP V4 – 1804.

\_\_\_\_\_  
(podpis čebelarja)

*V naprej se vam zahvaljujemo za vaš čas in pripravljenost za sodelovanje pri tej pomembni raziskavi.*

**VPRAŠALNIK ZA UGOTAVLJANJE POTI ŠIRJENJA HUDE GNILOBE ČEBELJE ZALEGE**

**1. Koliko čebeljih družin imate trenutno na tej lokaciji in koliko skupno?**

Število čebeljih družin na lokaciji: \_\_\_\_\_

Število lokacij: \_\_\_\_\_ Skupno število čebeljih družin: \_\_\_\_\_

Katere vrste panjev uporabljate? \_\_\_\_\_

**2. Koliko let se ukvarjate s čebelarjenjem? \_\_\_\_\_ let**

**3. Ali se s čebelarjenjem ukvarjate: (Označite en odgovor.)**

- ☐ Popolnoma ljubiteljsko
- ☐ Ljubiteljsko in predstavlja majhen del dohodka
- ☐ Komercialno in predstavlja dodatno dejavnost
- ☐ Komercialno in predstavlja glavni vir dohodka

**4. Zaradi katerih razlogov čebelarite? (Označite vse ustrezne odgovore.)**

- |                                                                    |                                                     |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Med za lastno uporabo                     | <input type="checkbox"/> Darila                     |
| <input type="checkbox"/> Drugi čebelji proizvodi za lastno uporabo | <input type="checkbox"/> Raziskave in izobraževanje |
| <input type="checkbox"/> Prodaja medu                              | <input type="checkbox"/> Pomoč čebelam in okolju    |
| <input type="checkbox"/> Prodaja drugih čebeljih proizvodov        | <input type="checkbox"/> Vzreja matic               |
| <input type="checkbox"/> Apiterapija                               | <input type="checkbox"/> Opraševanje                |
| <input type="checkbox"/> Drugo (prosimo, navedite): _____          |                                                     |

**5. Ali je bila huda gniloba čebelje zalege pri vas že kdaj potrjena od leta 2017 do sedaj?**

- ☐ Da  
☐ Ne

**6. Ali ste od leta 2017 do sedaj izgubili kaj čebeljih družin?**

- ☐ Ne (*Prosimo, pojdite na vprašanje 7.*)  
☐ Da

**6.1. Koliko čebeljih družin ste izgubili?**

| Leto:<br>jesen/zima | Število propadlih čebeljih družin |
|---------------------|-----------------------------------|
| 2016/2017           |                                   |
| 2017/2018           |                                   |
| 2018/2019           |                                   |

**7. Katere druge bolezni ali težave so bile prisotne od leta 2017 do sedaj? (*Označite vse ustrezne odgovore.*)**

- ☐ Varoza  
☐ Nozemavost  
☐ Poapnela zalega  
☐ Lakota  
☐ Težave z maticami (npr. preleganje, izgube matic, trotovke)  
☐ Slabo prezimovanje (npr. premalo hrane, dolga zima, niso se prestavile na hrano)  
☐ Ropanje  
☐ Drugo (prosimo, navedite): \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_



**8. Kaj so po vašem mnenju trije glavni razlogi , da se pojavlja toliko žarišč hude gnilobe čebelje zalege(Označite največ 3 odgovore.)**

- ☐ Nepravilno sanirana žarišča
- ☐ Posojanje opreme
- ☐ Krmljenje čebel z medom
- ☐ Neregistrirana stojišča
- ☐ Opuščeni čebelnjaki
- ☐ Bolezni se ne prijavijo
- ☐ Slaba skrb za higieno v čebelnjaku
- ☐ Ropanje
- ☐ Prevozi na pašo
- ☐ Drugo (prosimo, navedite):\_\_\_\_\_

**9. Kako ocenjujete razmere oziroma okolico, v kateri čebelarite?**

|                                                                   | Zelo slabo               | Slabo                    | Srednje                  | Dobro                    | Zelo dobro               |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>a. Jakost čebeljih družin (živalnost)</b>                      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>b. Razpoložljivost pašnih virov v okolici čebelnjaka</b>       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>c. Ustreznost lokacije čebelnjaka (npr. senčna lega, hrup)</b> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>d. Gostota stacionarnih ali začasnih čebelnjakov v bližini</b> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>e. Sodelovanje s sosednjimi čebelarji</b>                      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>f. Razpoložljivost časa za čebelarjenje</b>                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**10. Kako ocenjujete ustreznost izvajanja preventivnih ukrepov (biovarnost) v svojem čebelnjaku?**

|                                | Zelo slabo               | Slabo                    | Srednje                  | Dobro                    | Zelo dobro               |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>a. Higiena v čebelnjaku</b> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

|                                                             |                          |                          |                          |                          |                          |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>b. Razkuževanje in čiščenje opreme</b>                   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>c. Označevanje satja v primeru premeščanja satja</b>     | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>d. Preprečevanje dostopa drugim osebam do čebelnjaka</b> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>e. Vaše poznavanje vzrokov za širjenje bolezni</b>       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

11. Kolikšen delež satja povprečno zamenjate na leto? \_\_\_\_\_%

12. Ali ste v letu 2018 čebele zdravili?

- ☐ Ne (*Prosimo, pojdite na vprašanje 13.*)  
☐ Da

12.1. Katera zdravila (registrirana ali neregistrirana) ali druga sredstva ste uporabili?  
*(Označite vse ustrezne odgovore.)*

- |                                                           |                                                                    |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Varidol (amitraz)                | <input type="checkbox"/> Api-Bioxal (oksalna kislina)              |
| <input type="checkbox"/> ApiGuard (timol)                 | <input type="checkbox"/> Varromed (mravljinčna in oksalna kislina) |
| <input type="checkbox"/> ApiLife Var (timol)              | <input type="checkbox"/> Bayvarol (flumethrin)                     |
| <input type="checkbox"/> Thymovar (timol)                 | <input type="checkbox"/> Polyvar Yellow (flumethrin)               |
| <input type="checkbox"/> CheckMite (kumafos)              | <input type="checkbox"/> Hops                                      |
| <input type="checkbox"/> Formivar (mravljinčna kislina)   | <input type="checkbox"/> Mlečna kislina                            |
| <input type="checkbox"/> MAQS (mravljinčna kislina)       |                                                                    |
| <input type="checkbox"/> Oxuvar (oksalna kislina)         |                                                                    |
| <input type="checkbox"/> Drugo (prosimo, navedite): _____ |                                                                    |

13. Katero hrano in prehranske dodatke ste uporabili za krmljenje čebeljih družin v letu 2018? *(Označite vse ustrezne odgovore.)*

- ☐ Sladkorno raztopino  
☐ Domače pogače  
☐ Komercialne pogače  
☐ Med  
☐ Invertni sladkor ali sirup  
☐ Cvetni prah  
☐ Apiherb  
☐ BeeStrong

- ☐ Drugo (prosimo, navedite):\_\_\_\_\_

**14. Ali uporabljate izključno samo svojo opremo in pripomočke za čebelarjenje ter svoje opreme ne posojate?**

- ☐ Da (*Prosimo, pojdite na vprašanje 15.*)  
☐ Ne

**14.1. Od koga si izposojate in komu posojate čebelarsko opremo? (*Označite en odgovor.*)**

- ☐ Izposojam si od čebelarskega društva  
☐ Izposojam si od več različnih čebelarjev in/ali posojam več različnim čebelarjem  
☐ Izposojam si le od enega čebelarja in/ali posojam le enemu čebelarju

**14.2. Katero čebelarsko opremo si izposojate ali posojate? (*Označite vse ustrezne odgovore.*)**

- ☐ Točilo  
☐ Topilnik  
☐ Ometalnik  
☐ Drugo (prosimo, navedite):\_\_\_\_\_

**14.3. Ali izposojeno ali posojeno opremo očistite?**

- ☐ Ne (*Prosimo, pojdite na vprašanje 15.*)  
☐ Da

**14.4. Kako izposojeno ali posojeno opremo očistite? (*Označite vse ustrezne odgovore.*)**

- ☐ samo mehansko čiščenje
- ☐ z vodo  
☐ S čistilom  
☐ Z razkužilom  
☐ Potopim v vreli lug  
☐ Obžgem z ognjem  
☐ Drugo (prosimo, navedite):\_\_\_\_\_

**15. Ali matice kupite ali jih vzrejate sami? (*Označite en odgovor.*)**

- ☐ Matice vzrejam sam
- ☐ Matice vedno kupim
- ☐ Matice vzrejam sam in jih tudi kupujem

**16. Ali ste od leta 2017 do sedaj kupili/pridobili kakšno čebeljo družino ali paketne čebele?**

- ☐ Ne (*Prosimo, pojdite na vprašanje 17.*)
- ☐ Da

**16.1. Prosimo, navedite število kupljenih čebeljih družin in paketnih čebel od leta 2017 do sedaj.**

| Leto | Št. čebeljih družin | Št. paketnih čebel |
|------|---------------------|--------------------|
| 2017 |                     |                    |
| 2018 |                     |                    |
| 2019 |                     |                    |

**16.2. Ali ste imeli dokumentacijo urejeno za vse nakupe?**

- ☐ Ne
- ☐ Da

**17. Ali ste od leta 2017 do sedaj prodali kakšno čebeljo družino ali paketne čebele?**

- ☐ Ne (*Prosimo, pojdite na vprašanje 18.*)
- ☐ Da

**17.1. Prosimo, navedite število prodanih čebeljih družin in paketnih čebel od leta 2017 do sedaj.**

| Leto | Št. čebeljih družin | Št. paketnih čebel |
|------|---------------------|--------------------|
| 2017 |                     |                    |
| 2018 |                     |                    |
| 2019 |                     |                    |

**17.2. Ali ste imeli dokumentacijo urejeno za vse prodaje?**

- ☐ Ne

---

☐ Da
**18. Ali ste od leta 2017 do sedaj opravili kakšen prevoz na pašo?**

- ☐ Ne (*Prosim, pojdite na vprašanje 19.*)  
☐ Da

**18.1. Prosim, navedite kam ste od leta 2017 do sedaj vozili čebelje družine na pašo in kakšna je bila paša.**

|     | Leto/a | Lokacija paše (občina) | Vrsta paše |
|-----|--------|------------------------|------------|
| 1.  |        |                        |            |
| 2.  |        |                        |            |
| 3.  |        |                        |            |
| 4.  |        |                        |            |
| 5.  |        |                        |            |
| 6.  |        |                        |            |
| 7.  |        |                        |            |
| 8.  |        |                        |            |
| 9.  |        |                        |            |
| 10. |        |                        |            |

**18.2. Ali ste imeli dokumentacijo urejeno za vse prevoze na pašo?**

- ☐ Ne  
☐ Da

**19. Ali ste od leta 2017 do sedaj ujeli kakšen tuj roj?**

- ☐ Ne (*Prosim, pojdite na vprašanje 20.*)  
☐ Da

**19.1. Kako ravnate z ujetim rojem?**

- ☐ Roj takoj naselim v panj v čebelnjaku

- 
- ☐ Roj je najmanj 24 ur (oz. do pojava prvih mrtvic na dnu boksa) ločen od ostalih čebel
- ☐ Roj je najmanj 30 dni (oz. do pojava pokrite zalege) na ločeni lokaciji
- ☐ Drugo (prosimo, navedite): \_\_\_\_\_

**19.2.        Prosimo, navedite število ujetih rojev.**

| Leto | Število ujetih rojev |
|------|----------------------|
| 2017 |                      |
| 2018 |                      |
| 2019 |                      |

*Nazadnje bi radi izvedeli nekaj več o vas. Zagotavljamo vam, da bodo VSI PODATKI obravnavani ZAUPNO in bodo skrbno varovani ter namenjeni LE SKUPNI OBDELAVI PODTKOV. Noben odgovor ne bo povezano z vami osebno, niti pri analizi niti v poročilih projekta.*

**20. Kakšna je vaša trenutna zaposlitev?**

- ☐ Nezaposlen
- ☐ Upokojenec
- ☐ Kmetovalec
- ☐ Gozdar, ribič, lovec
- ☐ Obrtnik, proizvodni delavec
- ☐ Prodajalec, drug poklic za storitve
- ☐ Samostojni podjetnik
- ☐ Pisarniški delavec, uradnik
- ☐ Strokovnjak
- ☐ Visok uradnik, menedžer
- ☐ Drugo (prosimo, navedite): \_\_\_\_\_

**21. Katerega leta ste bili rojeni? \_\_\_\_\_**

**22. Katerega spola ste?**

- ☐ Moški
- ☐ Ženska

**23. Katera je vaša najvišja dosežena stopnja izobrazbe?**

- 
- ☐ Osnovna šola
  - ☐ Srednja poklicna šola
  - ☐ Gimnazija
  - ☐ Diploma (strokovni ali višješolski programi, 1. bolonjska stopnja)
  - ☐ Magisterij (2. bolonjska stopnja, mag. ZA imenom) ali enoviti magistrski program
  - ☐ Znanstveni magisterij (mag. PRED imenom)
  - ☐ Doktorat

*Najlepša hvala za vaše sodelovanje pri tej pomembni raziskavi.*

Če imate kakršnokoli pripombo ali mnenja, ki jih niste mogli izraziti v anketi, jih prosim navedite tu:

---



---



---



---

## IZPOLNI VETERINAR

**1. Ime in priimek veterinarja:** \_\_\_\_\_

**2. Na ogledu zaradi:**

- ☐ Suma hude gnilobe čebelje zalege
- ☐ Čebelarstvo se nahaja v kužnem krogu (po odločbi)
- ☐ Drugo \_\_\_\_\_

**3. Koliko čebeljih družin je bilo pregledanih? Št. pregledanih čebeljih družin:**

\_\_\_\_\_

**4. Kako je čebelar najprej ukrepal ob sumu na hudo gnilobo čebelje zalege?**

- |                                                          |                                                         |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Ukrepal je sam                  | <input type="checkbox"/> Poklical je čebelarsko društvo |
| <input type="checkbox"/> Poklical je drugega čebelarja   | <input type="checkbox"/> Poklical je veterinarja        |
| <input type="checkbox"/> Drugo (prosim, navedite): _____ |                                                         |

**5. Ali so v čebelnjaku prisotne druge bolezni čebel?**

- ☐ Ne (*Prosim, pojdite na vprašanje 6.*)
- ☐ Da

**5.1. Katere bolezni oz. problemi so prisotni?**

- ☐ Varoza
- ☐ Poapnela zalega
- ☐ Lakota
- ☐ Brezmatičnost
- ☐ Spremenjeno obnašanje
- ☐ Spremembe na nepokriti zalegi
- ☐ Spremembe na pokriti zalegi
- ☐ Spremembe na odraslih čebelah



☐ drugo (prosimo,  
navedite): \_\_\_\_\_

**6. Kakšno je po vašem mnenju stanje naslednjih dejavnikov v tem čebelnjaku?**

|                                                                   | <b>Zelo slabo</b>        | <b>Slabo</b>             | <b>Srednje</b>           | <b>Dobro</b>             | <b>Zelo dobro</b>        |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>g. Jakost čebeljih družin (živalnost)</b>                      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>h. Razpoložljivost pašnih virov v okolici čebelnjaka</b>       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>i. Ustreznost lokacije čebelnjaka (npr. senčna lega, hrup)</b> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>j. Higiena v čebelnjaku</b>                                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>k. Izvajanje biovarnostnih ukrepov v čebelnjaku</b>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

TABELA O KLINIČNIH ZNAKIH ZA K ZAPISNIKU O ODVZEMU VZORCEV

| <b>KLINIČNI ZNAK</b>                                                | <b>Prisoten</b>          | <b>Ni prisoten</b>       |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Večje število mrtvih čebel pred panji</b>                        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Pred panji čebele lazijo, ne morejo leteti</b>                   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Temne, svetleče čebele pred panji</b>                            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Posamezne čebele pred panji drgetajo</b>                         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Čebelje ličinke in bube pred panji</b>                           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Pročelje panjev onesnaženo s fecesom</b>                         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Zalega je neenakomerne starosti</b>                              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Presledkasta čebelja zalega</b>                                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Prisotne samo še posamezne celice pokrite zalege</b>             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Celični pokrovci spremenjene barve in/ali vlažnega videza</b>    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Posamezni celični pokrovci vbočeni</b>                           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Posamezni celični pokrovci z luknjicami (do 5 na sat)</b>        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Večina celičnih pokrovcev naluknjanih</b>                        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Mrtve ličinke v celicah</b>                                      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Ličinke v celicah imajo spremenjeno lego</b>                     | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Ličinke so spremenjene barve</b>                                 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Zalega ima kiselkast vonj</b>                                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Vsebina celic vlecljiva – bel odtenek vlecljive mase</b>         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Vsebina celic vlecljiva – bel odtenek vlecljive mase</b>         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Vsebina celic vlecljiva – svetlo rjav odtenek vlecljive mase</b> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Vsebina celic vlecljiva – temno rjav odtenek vlecljive mase</b>  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

|                                                               |                          |                          |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>V celicah je posušena vsebina (krasta, jeziček)</b>        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Mrtve ličinke v obliki mešička</b>                         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Posušena mrtva ličinka v obliki ladjice</b>                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Posamezne poapnele ličinke</b>                             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Več kot 10% poapnelih ličink</b>                           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Bolezenske spremembe so na svetlem satu/satih*</b>         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Bolezenske spremembe so na temnem satu/satih*</b>          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Bolezenske spremembe so na svetlih in temnih satih*</b>    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Bolezenske spremembe so prisotne na enem satu</b>          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Bolezenske spremembe so prisotne na dveh satih</b>         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Bolezenske spremembe so prisotne na treh ali več satih</b> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Vidne čebele z deformiranimi krili</b>                     | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Vidna varoja na čebelah</b>                                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Vidna varoja pod pokrovčki celic</b>                       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Sati onesnaženi s čebeljimi iztrebki</b>                   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Jakost čebelje družine ni spremenjena</b>                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Čebelja družina je delno oslabela</b>                      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Čebelja družina je močno oslabela</b>                      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>V panju ni več čebel ali jih je le peščica</b>             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Družina je izropana</b>                                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

- Kriterij za opredelitev svetel/temen sat je prosojnost sata obrnjenega proti svetlobi