



Nacionalni veterinarski inštitut

**POROČILO**  
o opravljenem delu v okviru ukrepa

**Uporaba presejalnih laboratorijskih metod za ugotavljanje  
žarišč hude gnilobe čebelje zalege v naključno izbranih  
čebelnjakih za učinkovitejšo sanacijo bolezni**

Julij, 2022

Poročilo se nanaša na opravljeno delo v programskem letu 2022 v okviru ukrepa »Uporaba presejalnih laboratorijskih metod za ugotavljanje žarišč hude gnilobe čebelje zalege v naključno izbranih čebelnjakih za učinkovitejšo sanacijo bolezni«, izvedeno v skladu z Uredbo o izvajanju Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2020-2022 (Uradni list RS, št. 78/19, 85/20 in 110/20) po pogodbi št. 2330-21-000263 z dne 23.12.2021, ki sta jo sklenila Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS in Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta.

Doseženi rezultati so nastali v okviru Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2020-2022, ki je bil financiran iz sredstev državnega proračuna in proračuna Evropske unije.

**Izvajalci:**

Dr. Metka Pisjak Ocepek, dr. vet. med., vodja raziskave

Dr. Lucija Žvokelj, dr. vet. med.

Monika Kozar, dr. vet. med.

Barbara Hočevar, dr. vet. med.

Rene Rus, dr. vet. med.

## **POVZETEK**

Na Nacionalnem veterinarskem inštitutu Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani (UL VF NVI) smo v programskem letu 2022 na osnovi pogodbe št. 2330-21-000263, ki je bila sklenjena na osnovi javnega naročila male vrednosti z Ministrstvom za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano (MKGP), izvajali ukrep »Uporaba presejalnih laboratorijskih metod za ugotavljanje žarišč hude gnilobe čebelje zalege v naključno izbranih čebelnjakih za učinkovitejšo sanacijo bolezni« (Uredba o izvajanju Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2020-2022).

V okviru ukrepa smo na območju Osrednjeslovenske regije v 400 čebelnjakih vzorčili drobir za laboratorijske preiskave na spore povzročitelja hude gnilobe čebelje zalege (*Paenibacillus larvae*). Vzorčenje smo opravili v skladu z določili pogodbe, po 10 družin v skupinski vzorec, in jih preiskali z metodo kvantitativni PCR. Rezultate smo podali kot vrednost Ct (število ciklov PCR, potrebnih za vizualizacijo produkta pomnoževanja) in tudi preračunano na število spor v ml drobirja. Z rezultati smo seznanili čebelarje na način, da smo vsakemu poslali izvid laboratorija ter priložili razlago rezultata z navodili za nadaljnje ravnanje.

Skupno smo v 400 čebelnjakih odvzeli 516 vzorcev/pod-vzorcev. Od tega je bilo 157 (30,43 %) negativnih, 248 (48,06 %) pa je imelo zelo nizko število spor, pod 20.000 /ml drobirja, kar smo oboje uvrstili v kategorijo A – brez tveganja za pojav klinične oblike bolezni. Nekoliko povečano število spor, med 20.000 in 400.000/ml drobirja je imelo 68 (13,18 %) vzorcev, kar smo uvrstili v kategorijo B - kjer še ni tveganja za pojav bolezni v bližnji prihodnosti, vendar se priporočajo nekateri ukrepi za zmanjševanje števila spor v panjih. V kategorijo C, 400.000 do 20.000.000 spor/ml drobirja smo uvrstili 22 (4,26 %) vzorcev – število spor je povečano vendar klinična oblika bolezni najverjetneje še ni prisotna, lahko pa se pojavi v bližnji prihodnosti. V kategorijo D smo uvrstili 21 (4,07 %) vzorcev z več kot 20.000.000 spor/ml drobirja – število spor je močno povečano in obstaja velika možnost, da so v eni ali več družinah že prisotni klinični znaki bolezni oziroma se ti lahko vsak čas izrazijo.

Čebelarji so v ukrepu sodelovali popolnoma prostovoljno in če predvidevamo, da so se v večjem številu vključevali tisti, ki niso pričakovali večjih težav na področju hude gnilobe in ki tudi sicer bolje sodelujejo z veterinarsko stroko, se udeležujejo izobraževanj in podobno, smo kljub temu v kategoriji C in D uvrstili skupno kar 8,33% vzorcev. To potrjuje predvidevanja, da ukrepi zatiranja hude gnilobe čebelje zalege, ki temeljijo na čebelarjevi prijavi suma bolezni zaradi opaženih bolezenskih sprememb pri svojih družinah, niso dovolj uspešni. V prihodnosti bi bilo potrebno preiti na redni monitoring drobirja ter preventivne ukrepe za preprečevanje klinične oblike bolezni.

## 1. UVOD

Huda gniloba čebelje zalege (HGČZ), imenovana tudi ameriška gniloba (ang. american foulbrood) je ena najhujših bolezni čebelje družine, ki v Sloveniji vsako leto povzroči več novih izbruhov. Bolezen je obvezno prijavljiva in se zatira v skladu s pravilnikom. Sedanji sistem zatiranja hude gnilobe je osredotočen na prepoznavanje znakov bolezni in prijavljanje suma s strani čebelarja ter saniranje ugotovljenih žarišč bolezni. Ko je bolezen potrjena, ni več druge možnosti, kot uničenje bolnih družin in opreme, razkuževanje čebelnjaka, vzpostavitev zapore območja v polmeru 3 km okrog žarišča (kužni krog), kjer so prepovedani premiki čebel in opreme ter obvezni klinični pregled vseh čebeljih družin znotraj kužnega kroga. Ti pregledi so dolgotrajni, poleg tega pa je velika večina pregledanih družin zdravih, torej se porablja veliko časa veterinarjev in čebelarjev za pregledne družin, ki nimajo težav.

Izkušnje veterinarjev pri delu na terenu kažejo, da imajo čebelarji premalo znanja za prepoznavanje oziroma so premalo pozorni na osnovne bolezenske spremembe HGČZ v čebelji družini. K temu pripomore tudi večja pogostost genotipa ERIC II v Sloveniji, ki hitreje ubija ličinke, zato jih delavke prej odstranijo iz panja, bolezen pa zato napreduje bolj prikrito. Zato se HGČZ pogosto odkrije šele, ko je že močno napredovala in se razširila po čebelnjaku in okolini, predvsem z ropanjem oslabelih družin. Na večje razdalje se bolezen širi s premiki čebel pri prodaji in prevozu na pašo. Glede na našteto, veterinarji v večji meri naključno odkrijejo žarišča bolezni ob pregledih v kužnem krogu, kot pa zaradi prijave čebelarjev. Iz tega lahko sklepamo, da je v Sloveniji veliko neodkritih žarišč bolezni, ki se tako nenehno širi. Ker imamo v Sloveniji veliko gostoto čebeljih družin in čebelnjakov, so prenosi bolezni še hitrejši.

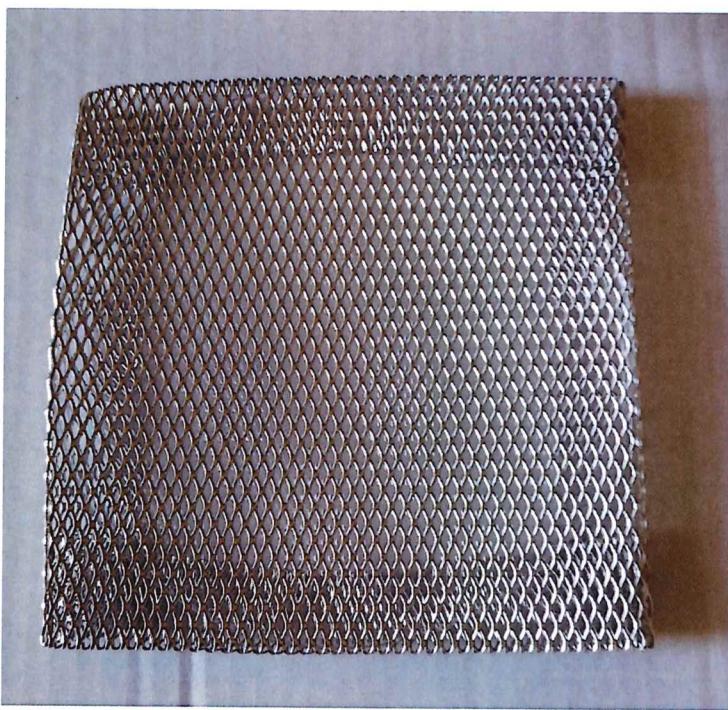
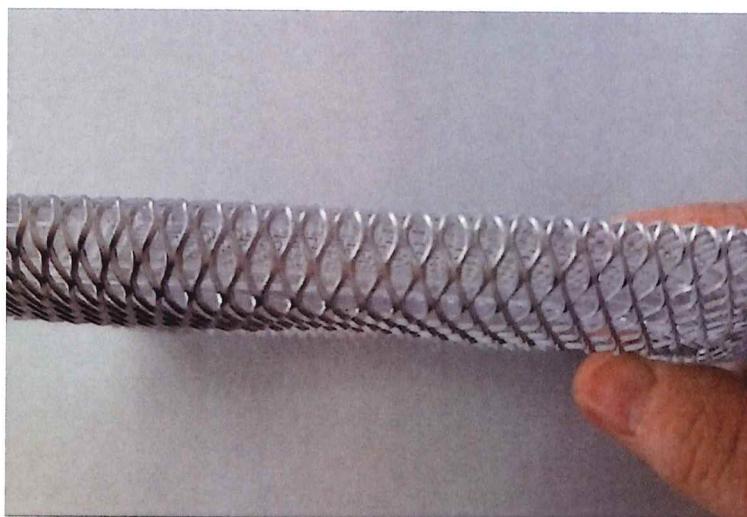
Za zgodnje odkrivanje morebitnih izbruhov HGČZ in preprečevanje širjenja te bolezni imamo sedaj razvito metodo molekularne detekcije in kvantifikacije spor *Paenibacillus larvae* v drobirju, s katero lahko zaznamo večanje števila spor v družini, še preden pride do klinične oblike bolezni. Huda gniloba čebelje zalege se namreč v družini razvija dokaj počasi, ko se z vsako obolelo ličinko povečuje število spor povzročitelja bolezni v panju. Vitalna čebelja družina je sposobna več tednov ali celo mesecev hitro očistiti celice z mrtvimi ličinkami, tako da so bolezenski znaki dalj časa prikriti. Šele, ko se število spor v družini tako poveča in oboli toliko ličink, da jih čebele ne zmorejo odstraniti, lahko te spremembe opazimo in takrat govorimo o klinični obliki bolezni in na tej stopnji je edini ukrep uničenje obolelih družin. Z laboratorijskimi preiskavami pa lahko sedaj določimo število spor v panju in s tem ugotovimo stopnjo nevarnosti, da se bo bolezen v kratkem času razvila v klinično obliko. To nam daje čas in možnost, da z ukrepi, kot so menjava satja in podobno, odstranimo spore iz družine in tako ne pride do razvoja klinične oblike bolezni.

Ker želimo izboljšati obstoječi način nadzora nad hudo gnilobo, predvsem z večjim poudarkom na preprečevanju pojava in širjenja bolezni na osnovi laboratorijskih preiskav, smo pozimi in spomladi 2022 izvedli pilotni projekt vzorčenja in laboratorijskih preiskav drobirja v naključnih čebelnjakih v Osrednjeslovenski regiji, kjer so pojavi HGČZ najpogostejši. S tem smo želeli preveriti, ali lahko na ta način odkrijemo prikrita žarišča bolezni in tako preprečimo njeno nadaljnje širjenje oziroma preveriti izvedbo metode in njen uporabno vrednost v praksi.

## 2. MATERIAL IN METODE

### Organizacija dela in priprava materiala

Pred začetkom izvedbe naloge smo pripravili ustrezne mrežaste vložke za zbiranje drobirja v družinah, kjer drobir na dnu panja ne bi bil prisoten zaradi aktivnosti čebel, ki razen v zimskem času, panje stalno čistijo. V ta namen smo uporabili pokrov petrijevk premera 15 cm, preko katerega smo zavihali aluminijasto mrežico, ki je preprečevala čebelam dostop do odpadlega drobirja (slika 1). Za sam postopek vzorčenja smo preizkusili več možnosti embalaže za vzorce, kot so lončki in vrečke, pri čemer so se večje laboratorijske PVC vrečke z 'zip' zapiranjem izkazale za najprimernejše (slika 2). Z osebjem v laboratoriju smo se tudi dogovorili glede shranjevanja vzorcev do preiskave in načina dostave vzorcev v laboratorij.



Slika 1: Mrežasti vložek za zbiranje drobirja



*Slika 2: Vzorec drobirja v vrečki za vzorčenje*

V skladu s pogodbo smo pripravili tudi izjave za čebelarje, da se strinjajo s sodelovanjem v ukrepu in obdelavo osebnih podatkov za namen izvedbe ukrepa ter da je bilo vzorčenje v njihovem čebelnjaku dejansko izvedeno. Obrazec za te izjave je v prilogi 1 tega poročila.

### **Obveščanje čebelarjev o ukrepu in vabilo k sodelovanju**

Sodelovanje čebelarjev v ukrepu je bilo popolnoma prostovoljno, zato smo veliko pozornosti in časa namenili obveščanju izbranih čebelarskih društev ter čebelarjev o izvajanju ukrepa. V skladu s pogodbo smo vzorčili naključno, predvsem na območjih z večjim tveganjem za hudo gnilobo čebelje zalege, zato smo najprej kot tako področje določili Ljubljano z okolico. V prvem koraku smo poklicali predsednike čebelarskih društev, ki geografsko pokrivajo področje Ljubljane in okolice. Skupaj smo organizirali 2 sestanka preko aplikacije Zoom in sicer, 13. in 17. januarja 2022. Po predstavitvi ukrepa smo pričakovali večji odziv, ki je običajno precej odvisen od vzpodbude predstavnikov društev. Nadaljevali smo z obveščanjem predsednikov čebelarskih društev preko elektronske pošte izven Ljubljane in organizirali sestanek s predsedniki društev s tega področja, da svojim članom prenesejo informacijo o ukrepu. Vendar se je izkazalo, da to ni bila dobra rešitev, saj do prenosa informacij v večini primerov ni prišlo. Zato smo pristopili individualno in začeli s telefonskimi klici čebelarjem, preko katerih smo jih seznanili z ukrepom in povabili k sodelovanju. Obvestilo o namenu in poteku ukrepa z vabilom k sodelovanju smo pošiljali tudi na poznane elektronske naslove čebelarjev na tem področju. Težava pri telefoniranju vsakemu posamezniku je bila velika poraba časa in manjkajoče

telefonske številke v registru čebelnjakov. Problem je bil tudi, da je veliko čebelarjev zavrnilo sodelovanje, predvidevamo da iz strahu, da bi odkrili nova žarišča, kar bi imelo za posledico nove kužne kroge (zaprta območja). Zato smo morali neprestano širiti področje obveščanja in vzorčenja ter iskati čebelarje, ki bi žeeli sodelovati. Poleg individualnih telefonskih klicev čebelarjem smo organizirali tudi sestanke s člani posameznih čebelarskih društev, kjer smo jim predstavili namen in potek ukrepa ter jih poskusili čim več prepričati k sodelovanju. Da smo za vzorčenje z veliko težavo sploh pridobili 400 čebelnjakov, smo na koncu vzorčili bolj ali manj po vsej Osrednjeslovenski regiji, izvzeta so bila področja že obstoječih kužnih krogov.

## Vzorčenje drobirja na terenu

Vzorčenje smo opravili na način, da smo v čebelnjaku z do vključno 10 čebeljimi družinami vzorčili vse čebelje družine v en skupinski vzorec, v čebelnjaku z več kot 10 čebeljimi družinami pa smo vzorčili vsaj polovico čebeljih družin, ki so bile v času vzorčenja v čebelnjaku, vendar ne manj kot 10. V pomoč smo si pripravili shemo, ki je priloga 2 tega poročila. V primeru več kot enega skupinskega vzorca smo oblikovali pod-vzorce od največ desetih čebeljih družin. V družinah, kjer je bil drobir prisoten na dnu panja, smo ga vzorčili direktno v PVC vrečko na način, da se prepreči navzkrižna kontaminacija. Kadar drobirja ni bilo ali ga ni bilo dovolj, ker so ga čebele očistile, smo vstavili mrežasti vložek za zbiranje drobirja na dno panja pod sate v tistem delu panja, kjer je bilo središče gnezda in čebelnjak ponovno obiskali čez nekaj tednov, ko se je nabralo dovolj drobirja za vzorčenje (slika 3). Iz teh vložkov smo drobir nato stresli v PVC vrečke in oblikovali skupinske vzorce/pod-vzorce, kot je opisano zgoraj. Ob vzorčenju smo čebelarja prosili za podpis izjave, da se strinjajo s sodelovanjem v ukrepu in obdelavo osebnih podatkov za namen izvedbe ukrepa. Čebelar in izvajalec vzorčenja sta tudi podpisala izjavo, da je bilo vzorčenje dejansko izvedeno. Vsak sodelujoči čebelar je podpisal eno izjavo, tudi če smo pri njem vzorčili na več stojščih. Podpisane izjave smo pridobili pri vseh čebelarjih, ki so sodelovali v projektu. V skenirani obliki jih prilagamo poročilu. Vsa vzorčenja smo vnesli v Sistem za spremljanje, poročanje in obveščanje o boleznih živali (EPI). Vzorce smo do preiskave shranili v zamrzovalniku, saj so bila v drobirju pogosto prisotna jajčeca in ličinke voščene vešče, ki smo jih z zamrzovanjem uničili.



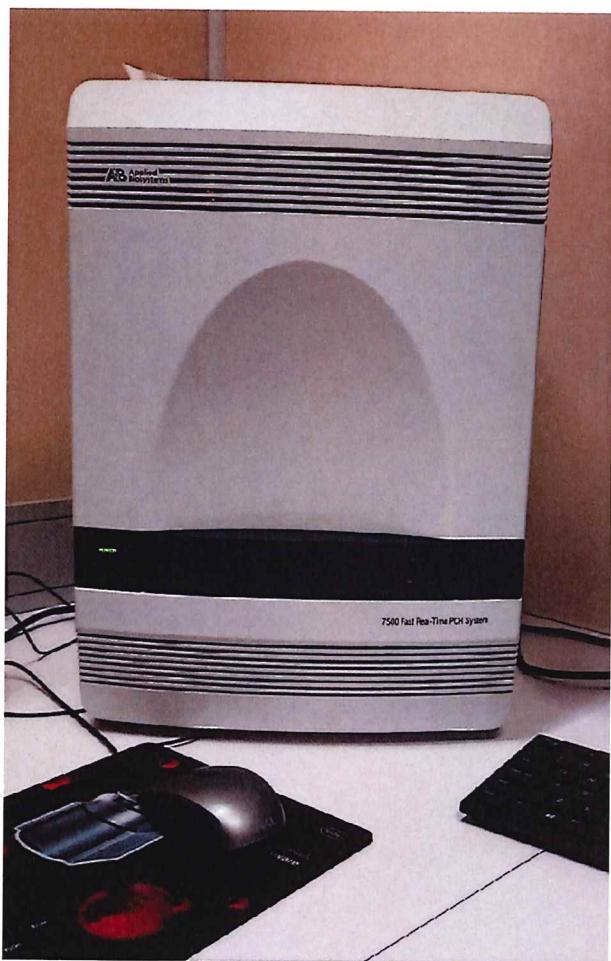
Slika 3: Zbran drobir v posodici mrežastega vložka (odstranjena mrežica)

## Laboratorijske preiskave

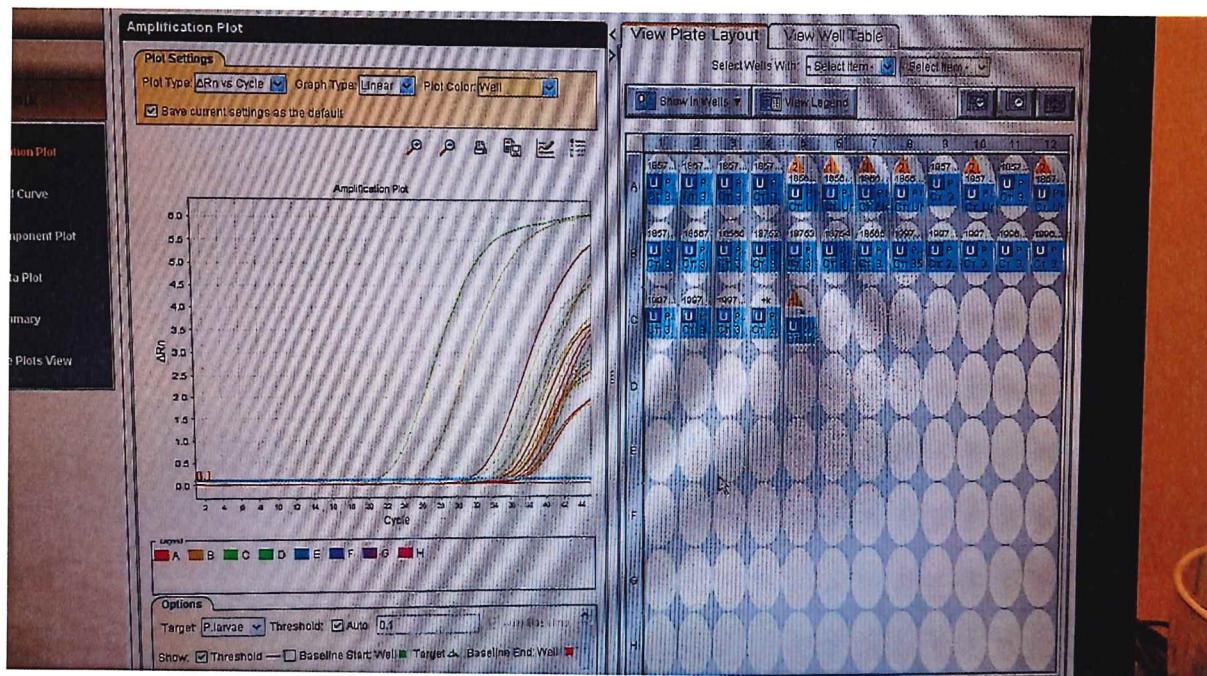
V laboratoriju smo vsak vzorec/pod-vzorec odmerili na 5 ml, mu dodali 45 ml sterilne destilirane vode ter ga stresali 2h pri 37 °C. Iz 1ml suspenzije smo izvedli postopek izolacije DNA in nato vsakega preiskali z metodo pomnoževanja nukleinskih kislin v realnem času (qPCR) po predhodno opisani in validirani metodi za detekcijo in kvantifikacijo spor *Paenibacillus larvae* v drobirju (Kušar in sod., <https://www.mdpi.com/2075-4450/12/11/1034>), (slika 4). Opisani q PCR ima postavljeno mejo detekcije (LOD) pri 188 sporah /ml drobirja in kvantifikacije (LOQ) pri 707 sporah /ml drobirja, kar je zelo občutljivo. Rezultat laboratorijskih preiskav (qPCR) je bil podan kot vrednost Ct (število ciklov PCR, potrebnih za vizualizacijo produkta pomnoževanja. Dobljeno Ct vrednost smo uporabili za izračun števila spor *P. larvae* v ml drobirja. Rezultate preiskave drobirja smo vnesli v Sistem za spremljanje, poročanje in obveščanje o boleznih živali (EPI).

The screenshot shows the homepage of the journal 'Insects'. At the top, there is a logo with a magnifying glass icon and the word 'insects'. Below the logo are buttons for 'Submit to this Journal', 'Review for this Journal', and 'Edit a Special Issue'. The main title of the article is 'Novel TaqMan PCR Assay for the Quantification of *Paenibacillus larvae* Spores in Bee-Related Samples'. The authors listed are Darja Kušar, Bojan Papić, Urška Zajc, Irena Zdovc, Majda Golob, Lucija Žvokej, Tanja Knific, Jana Avberšek, Matjaž Ocepek, and Metka Pisnik Ocepek. Below the title, there is a note about the Institute of Microbiology and Parasitology, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, and another note about the Institute of Pathology, Wild Animals, Fish and Bees, Veterinary Faculty, University of Ljubljana. There is also a note about the Institute of Food Safety, Feed and Environment, Veterinary Faculty, University of Ljubljana. The academic editors are Ivana Tlak Gajger and Franco Mutinelli. The DOI of the article is https://doi.org/10.3390/insects12111034.

Slika 4: Posnetek zaslona naslova objavljenega znanstvenega članka o validaciji metode za PCR kvantifikacijo spor *P. larvae* v čebeljih vzorcih.



Slika 5: Pomnoževalnik za izvedbo metode kvantitativni PCR



Slika 6: Izpis rezultatov pomnoževanja na zaslonu aparature

## **Vrednotenje rezultatov laboratorijskih preiskav**

Na podlagi naših prejšnjih izkušenj, ki smo jih pridobili s preiskavami drobirja iz čebeljih družin z različnim statusom glede HGČZ (klinično pozitivne družine, klinično negativne družine v pozitivnih čebelnjakih, negativne družine v negativnih čebelnjakih...) smo vzorce razdelili v štiri kategorije, od A do D. Kategorija A vključuje negativne vzorce in vzorce z do 20.000 sporami/ml drobirja ( $\log <4,3$ ). V kategorijo B smo uvrstili vzorce, ki vsebujejo od 20.000 do 400.000 spor/ml drobirja ( $\log 4,3$  in 5,6), v kategorijo C vzorce, ki vsebujejo od 400.000 do 20.000.000 spor/ml drobirja ( $\log 5,6$  in 7,3) ter v kategorijo D vzorce, ki vsebujejo nad 20.000.000 spor/ml drobirja ( $\log >7,3$ ).

Za vsako kategorijo smo naredili oceno glede tveganja za prisotnost ali skorajšnji pojav klinične oblike bolezni. Za čebelnjake v kategoriji A ni verjetnosti za izbruh bolezni v bližnji prihodnosti. V čebelnjakih v kategoriji B je število spor sicer povišano, vendar brez pomembne verjetnosti izbruha bolezni v bližnji prihodnosti. V čebelnjakih v kategoriji C je število spor znatno povečano in obstaja verjetnostjo izbruha bolezni v bližnji prihodnosti. V čebelnjakih, ki smo jih uvrstili v kategorijo D obstaja velika verjetnost, da so klinični znaki hude gnilobe čebelje zaleže že prisotni v eni ali več čebeljih družinah ali pa se taka oblika bolezni lahko vsak čas pojavi.

## **Obveščanje čebelarjev o rezultatu preiskave**

V laboratoriju so po končani preiskavi za vsako stojišče pripravili izvid (Poročilo o preskušanju), na katerem so navedli podatke o čebelarju, podatke o vzorčevalcu, datume vzorčenja, sprejema v laboratorij in zaključka preiskav, podatke za identifikacijo vzorca, uporabljeni metodo ter rezultate preiskave v obliki števila spor/ml drobirja. Originalni izvidi so bili poslani čebelarjem po pošti, kopije pa hranimo na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele. Vsakemu izvidu smo v kuverto priložili tudi razLAGO rezultata za čebelarja, v kateri smo navedli, v katero kategorijo se posamezen vzorec uvršča, kakšna je verjetnost/tveganje, da je v kateri od družin že prisotna klinična oblika bolezni ali da se ta v bližnji prihodnosti lahko pojavi ter napotke, kako naj čebelar ravna v prihodnje. Primer razlage rezultata je v prilogi 3 tega poročila. V primeru, ko je bil vzorec uvrščen v kategorijo C ali D, smo izvidu in razLAGI rezultata priložili tudi navodilo za pretresanje čebeljih družin z namenom zmanjšanja števila spor *P. larvae* v panjih. Primer navodila za pretresanje je v prilogi 4 tega poročila. Na list z razLAGO rezultatov smo dodali tudi kontaktne podatke veterinarjev za zdravstveno varstvo čebel na področju Osrednjeslovenske regije z informacijo, da se o vseh vprašanjih lahko posvetujejo z veterinarjem. V skladu s pogodbo naj bi izvajalec o rezultatih laboratorijske preiskave obvestil Nacionalni veterinarski inštitut (NVI), kar pa v primeru, ko je izvajalec ukrepa NVI, ni smiselno, saj smo z rezultati že tako seznanjeni.

### 3. REZULTATI

Skupno smo na spore *P. larvae* preiskali 516 vzorcev iz 400 čebelnjakov. Od tega je bilo 157 (30,43 %) negativnih, pod 20.000 spor /ml drobirja je imelo 248 (48,06 %) vzorcev, kar smo oboje uvrstili v kategorijo A. Med 20.000 in 400.000 spor /ml drobirja je imelo 68 (13,18 %) vzorcev, kar smo uvrstili v kategorijo B. V kategorijo C, 400.000 do 20.000.000 spor/ml drobirja, smo uvrstili 22 (4,26 %) vzorcev. V kategorijo D smo uvrstili 21 (4,07 %) vzorcev z več kot 20.000.000 spor/ml drobirja. Vsi rezultati so po ID številki vzorca navedeni v tabeli 1 (brez osebnih podatkov). Seznam vseh vzorcev s podatki o vzorčevalcu, laboratorijsko število preiskave, številko EPI zapisnika, ID oznako vzorca, SI številko čebelnjaka, imenom, priimkom, naslovom in kontaktno številko čebelarja, številom čebeljih družin v čebelnjaku v času vzorčenja, številom družin, iz katerih smo vzorčili drobir, datumom vzorčenja, rezultatom preiskave PCR v obliki Ct vrednosti, rezultatom preračunanim na število spor/ ml drobirja, stopnjo /kategorijo glede na tveganje za pojav klinične oblike bolezni ter datumom pošiljanja izvida čebelarju je priloga 5 tega poročila (vsebuje osebne in zaupne podatke).

Ker je bilo med 400 čebelnjaki 91 takih, pri katerih smo odvzeli več kot en skupinski vzorec, v seznamu navajamo zaporedno številko vzorca in zaporedno številko čebelnjaka. Med čebelnjaki, kjer smo vzorčili več kot en skupinski vzorec, je bilo 69 takih z dvema pod-vzorcema, 19 s tremi pod-vzorci in 3 s štirimi pod-vzorci.

Zap. št. vzorca	Zap. št. stojišča	ID oznaka vzorca	Št. vzorčenih družin	Datum vzorčenja	Rezultat preiskave PCR (Ct)	Št. spor/ml drobirja	Stopnja tveganja za HGČZ
1	1	115730555	3	10.02.2022	neg.	0	A
2	2	115730562	2	10.02.2022	neg.	0	A
3	3	115730570	4	9.02.2022	37,2156	137	A
4	4	115730588	6	9.02.2022	neg.	0	A
5	5	115730595	2	9.02.2022	neg.	0	A
6	6	115730607	5	9.02.2022	35,7047	397	A
7	7	115730615	1	10.02.2022	neg.	0	A
8	8	115730622	2	10.02.2022	neg.	0	A
9	9	115730630	2	10.02.2022	neg.	0	A
10	10	115730648	3	10.02.2022	neg.	0	A
11	11	115730656	4	10.02.2022	neg.	0	A
12	12	115730420	1	16.02.2022	neg.	0	A
13	13	115730663	10	16.02.2022	neg.	0	A
14	14	115730671	2	16.02.2022	neg.	0	A
15	15	115730413	3	16.02.2022	neg.	0	A
16	16	115735041	4	23.02.2022	neg.	0	A
17	17	115734773	10	24.02.2022	34,9513	675	A
18	18	115735066	4	24.02.2022	neg.	0	A
19	19	115734631	6	24.02.2022	neg.	0	A
20	20	115735059	2	24.02.2022	35,1860	572	A
21	21	115734926	4	3.03.2022	neg.	0	A
22	22	115735074	6	3.03.2022	34,6243	849	A
23	23	115735082	5	3.03.2022	36,1819	284	A
24	24	115735099	6	3.03.2022	neg.	0	A

25	25	115735119	10	3.03.2022	30,5614	14.811	A
26	26	115734649	4	4.03.2022	neg.	0	A
27	27	115734781	4	4.03.2022	neg.	0	A
28	28	115734934	4	4.03.2022	30,8936	11.724	A
29	29	115734798	7	4.03.2022	23,2088	2.613.897	C
30	30	115735126	2	8.03.2022	36,1676	287	A
31	31	115735134	3	8.03.2022	neg.	0	A
32	32	115735142	5	8.03.2022	neg.	0	A
33	33	115735150	7	8.03.2022	neg.	0	A
34	34	115734800	2	9.03.2022	31,0356	10.609	A
35	35	115734818	3	9.03.2022	29,3567	34.570	B
36	36	115734942	15	9.03.2022	30,5733	14.688	A
37	36	115734950	15	9.03.2022	36,7017	197	A
38	37	115734967	7	9.03.2022	24,6013	981.271	C
39	38	115734975	10	9.03.2022	20,3728	19.225.226	C
40	39	115734983	9	10.03.2022	neg.	0	A
41	40	115734990	9	11.03.2022	27,5493	123.306	B
42	41	115735018	10	11.03.2022	19,8182	28.401.282	D
43	42	115735025	8	11.03.2022	35,4306	482	A
44	43	115734664	19	14.03.2022	32,6098	3.505	A
45	43	115734657	19	14.03.2022	30,0216	21.654	B
46	44	115734672	5	16.03.2022	37,1173	147	A
47	45	115735033	8	17.03.2022	neg.	0	A
48	46	115734680	2	21.03.2022	neg.	0	A
49	47	115734833	1	21.03.2022	35,8387	361	A
50	48	115734841	9	21.03.2022	neg.	0	A
51	49	115734859	2	22.03.2022	34,5241	911	A
52	50	115734709	19	22.03.2022	neg.	0	A
53	50	115734717	19	22.03.2022	neg.	0	A
54	51	115734874	16	22.03.2022	36,1081	299	A
55	51	115734866	16	22.03.2022	neg.	0	A
56	52	115734882	10	22.03.2022	36,6546	204	A
57	53	115734899	10	22.03.2022	35,0703	621	A
58	54	115734724	10	23.03.2022	neg.	0	A
59	55	115734732	4	23.03.2022	35,3252	519	A
60	56	115734901	10	23.03.2022	24,7661	873.839	C
61	57	115734919	3	23.03.2022	28,9386	46.394	B
62	58	115736813	6	24.03.2022	36,9555	165	A
63	59	115736820	10	24.03.2022	34,0849	1.241	A
64	60	115736854	10	24.03.2022	neg.	0	A
65	61	115736861	6	29.03.2022	29,8567	24.318	B
66	62	115736879	10	29.03.2022	18,3765	78.319.763	D
67	63	115736887	5	29.03.2022	36,9820	162	A
68	64	115736894	10	29.03.2022	30,4739	15.752	A
69	65	115736906	6	29.03.2022	36,9740	163	A
70	66	115736914	8	29.03.2022	neg.	0	A
71	67	115736947	6	29.03.2022	27,2464	152.594	B
72	68	115736962	28	30.03.2022	33,6378	1.700	A
73	68	115736955	28	30.03.2022	neg.	0	A
74	68	115736970	28	30.03.2022	neg.	0	A
75	69	115736988	24	30.03.2022	35,3319	516	A
76	69	115736995	24	30.03.2022	neg.	0	A
77	69	115737005	24	30.03.2022	neg.	0	A
78	70	115737013	3	6.04.2022	34,2775	1.084	A
79	71	115737147	6	6.04.2022	neg.	0	A
80	72	115737155	10	6.04.2022	20,1928	21.821.622	D
81	73	115737162	1	6.04.2022	34,0790	1.247	A
82	74	115737188	4	6.04.2022	28,9219	46.941	B

83	75	115737195	13	6.04.2022	31,4314	8.031	A
84	75	115737207	13	6.04.2022	27,6515	114.751	B
85	76	115737215	6	6.04.2022	27,7695	105.605	B
86	77	115737222	13	6.04.2022	30,3825	16.798	A
87	77	115737230	13	6.04.2022	31,2339	9.228	A
88	78	115737248	13	6.04.2022	29,4585	32.181	B
89	78	115737364	13	6.04.2022	29,9661	22.516	B
90	79	115737372	3	6.04.2022	24,7893	859.708	C
91	80	115737380	10	6.04.2022	34,2019	1.143	A
92	81	115737397	10	6.04.2022	32,0290	5.274	A
93	82	115737409	10	7.04.2022	31,5902	7.182	A
94	83	115737424	13	7.04.2022	31,3750	8.356	A
95	83	115737417	13	7.04.2022	28,9878	44.814	B
96	84	115737432	10	7.04.2022	29,6476	28.172	B
97	85	115737440	6	7.04.2022	29,2684	36.785	B
98	86	115737458	5	7.04.2022	neg.	0	A
99	87	115737473	4	7.04.2022	33,6557	1.679	A
100	88	115737481	8	7.04.2022	32,8075	3.050	A
101	89	115737498	22	13.04.2022	neg.	0	A
102	89	115737500	22	13.04.2022	neg.	0	A
103	89	115737518	22	13.04.2022	neg.	0	A
104	90	115737559	11	13.04.2022	neg.	0	A
105	90	115737566	11	13.04.2022	neg.	0	A
106	91	115737599	1	13.04.2022	31,8327	6.055	A
107	92	115737256	5	14.04.2022	36,6301	207	A
108	93	115737263	10	14.04.2022	28,4232	66.671	B
109	94	115737289	10	21.04.2022	30,4527	15.988	A
110	95	115737296	10	21.04.2022	19,9954	25.072.743	D
111	96	115737308	9	21.04.2022	33,6280	1.712	A
112	97	115737316	13	22.04.2022	34,4448	964	A
113	97	115737323	13	22.04.2022	35,9296	339	A
114	98	115737331	10	29.04.2022	33,5766	1.775	A
115	99	115737349	10	29.04.2022	35,2892	532	A
116	100	115737357	10	4.05.2022	31,7946	6.220	A
117	101	115737667	10	4.05.2022	26,5152	255.251	B
118	102	115737690	8	6.05.2022	neg.	0	A
119	103	115737683	10	6.05.2022	34,3389	1.038	A
120	104	115737727	10	11.05.2022	37,3009	129	A
121	105	115737735	10	13.05.2022	20,3118	20.068.317	D
122	106	115737751	10	13.05.2022	36,3266	256	A
123	107	115737776	13	13.05.2022	31,2720	8.984	A
124	107	115742838	13	13.05.2022	29,6887	27.369	B
125	108	115742846	2	13.05.2022	11,6039	9.190.572.217	D
126	109	115742879	10	19.05.2022	36,2065	279	A
127	110	115742861	3	19.05.2022	25,9906	369.205	B
128	111	115742854	10	19.05.2022	37,1666	142	A
129	112	115742906	30	19.05.2022	30,8638	11.973	A
130	112	115742894	30	19.05.2022	31,0360	10.606	A
131	112	115742887	30	19.05.2022	28,7975	51.236	B
132	113	115742914	8	24.05.2022	35,6573	411	A
133	114	115742921	10	24.05.2022	36,2475	271	A
134	115	115742939	10	24.05.2022	28,5450	61.197	B
135	116	115742947	10	24.05.2022	33,4876	1.890	A
136	117	115742955	6	24.05.2022	27,6427	115.463	B
137	118	115742704	16	24.05.2022	31,8389	6.029	A
138	118	115742962	16	24.05.2022	32,1039	5.003	A
139	119	115742970	6	24.05.2022	36,1706	286	A
140	120	115742988	10	24.05.2022	20,5747	16.679.301	C

141	121	115742737	36	24.05.2022	32,7316	3.217	A
142	121	115742745	36	24.05.2022	33,4229	1.978	A
143	121	115742712	36	24.05.2022	35,2569	544	A
144	121	115742729	36	24.05.2022	neg.	0	A
145	122	115742995	10	24.05.2022	35,7543	384	A
146	123	115742692	5	25.05.2022	neg.	0	A
147	124	115743005	8	25.05.2022	36,3647	250	A
148	125	115742753	30	1.06.2022	36,2906	263	A
149	125	115742760	30	1.06.2022	neg.	0	A
150	125	115742778	30	1.06.2022	neg.	0	A
151	126	115742786	6	3.06.2022	34,0056	1.313	A
152	127	115742805	15	3.06.2022	34,4421	966	A
153	127	115742793	15	3.06.2022	neg.	0	A
154	128	115742813	5	3.06.2022	26,2612	305.198	B
155	129	115742820	10	3.06.2022	33,5131	1.856	A
156	130	115742551	20	3.06.2022	neg.	0	A
157	130	115742568	20	3.06.2022	neg.	0	A
158	131	115742576	8	10.06.2022	18,5601	68.826.921	D
159	132	115742584	8	13.06.2022	37,4667	115	A
160	133	115742281	4	13.06.2022	neg.	0	A
161	134	115742298	10	13.06.2022	34,5564	891	A
162	135	115742300	2	13.06.2022	36,5137	225	A
163	136	115742318	30	13.06.2022	33,0607	2.552	A
164	136	115742333	30	13.06.2022	33,7310	1.592	A
165	136	115742325	30	13.06.2022	29,1351	40.403	B
166	137	115742628	7	16.06.2022	12,4904	4.925.709.248	D
167	138	115910356	10	1.02.2022	35,2466	548	A
168	139	115910363	10	3.02.2022	neg.	0	A
169	140	115910371	10	3.02.2022	neg.	0	A
170	141	115910389	10	9.02.2022	neg.	0	A
171	142	115910396	10	9.02.2022	33,3926	2.021	A
172	143	115910416	8	9.02.2022	neg.	0	A
173	144	115910423	10	10.02.2022	35,5821	433	A
174	145	115910449	10	11.02.2022	37,2055	138	A
175	146	115730438	4	17.02.2022	neg.	0	A
176	147	115730446	4	17.02.2022	neg.	0	A
177	148	115730479	24	17.02.2022	32,7151	3.255	A
178	148	115730454	24	17.02.2022	neg.	0	A
179	148	115730461	24	17.02.2022	neg.	0	A
180	149	115730494	4	17.02.2022	37,2731	132	A
181	150	115730506	2	17.02.2022	31,3812	8.319	A
182	151	115910457	8	11.03.2022	31,4211	8.089	A
183	152	115910464	18	11.03.2022	30,1734	19.460	A
184	152	115910472	18	11.03.2022	33,2256	2.272	A
185	153	115730547	35	15.03.2022	34,5487	896	A
186	153	115730539	35	15.03.2022	35,8681	354	A
187	153	115730521	35	15.03.2022	neg.	0	A
188	153	115910480	35	15.03.2022	neg.	0	A
189	154	115910517	19	16.03.2022	neg.	0	A
190	154	115910524	19	16.03.2022	neg.	0	A
191	155	115910497	13	16.03.2022	30,2208	18.822	A
192	155	115910509	13	16.03.2022	37,2695	132	A
193	156	115910532	15	16.03.2022	neg.	0	A
194	156	115910540	15	16.03.2022	neg.	0	A
195	157	115931532	7	21.03.2022	35,3967	493	A
196	158	115931524	10	21.03.2022	36,1495	290	A
197	159	115737046	15	23.03.2022	33,5602	1.796	A
198	159	115737038	15	23.03.2022	35,8430	360	A

199	160	115931573	17	23.03.2022	33,5127	1.857	A
200	160	115931581	17	23.03.2022	neg.	0	A
201	161	115931558	20	23.03.2022	32,2942	4.376	A
202	161	115931565	20	23.03.2022	34,7887	757	A
203	162	115931540	10	23.03.2022	35,0005	652	A
204	163	115737087	40	23.03.2022	34,7073	801	A
205	163	115737079	40	23.03.2022	36,8987	171	A
206	163	115737054	40	23.03.2022	neg.	0	A
207	163	115737061	40	23.03.2022	neg.	0	A
208	164	115737114	10	24.03.2022	neg.	0	A
209	165	115737121	10	24.03.2022	neg.	0	A
210	166	115737106	7	24.03.2022	neg.	0	A
211	167	115737094	8	24.03.2022	31,0060	10.833	A
212	168	115737139	10	28.03.2022	22,3341	4.836.891	C
213	169	115736712	25	28.03.2022	31,0130	10.779	A
214	169	115736692	25	28.03.2022	29,9035	23.530	B
215	169	115736704	25	28.03.2022	30,0877	20.670	B
216	170	115736729	11	28.03.2022	30,7163	13.282	A
217	170	115736737	11	28.03.2022	32,0713	5.119	A
218	171	115736778	27	29.03.2022	35,3083	525	A
219	171	115736753	27	29.03.2022	neg.	0	A
220	171	115736760	27	29.03.2022	neg.	0	A
221	172	115931928	23	29.03.2022	35,4966	460	A
222	172	115736793	23	29.03.2022	neg.	0	A
223	172	115736805	23	29.03.2022	neg.	0	A
224	173	115931868	10	29.03.2022	neg.	0	A
225	174	115738339	4	1.04.2022	37,1982	139	A
226	175	115738597	10	6.04.2022	27,7436	107.550	B
227	176	115738609	10	6.04.2022	29,8647	24.181	B
228	177	115738617	10	6.04.2022	29,5329	30.539	B
229	178	115738624	6	6.04.2022	34,7135	798	A
230	179	115738632	3	6.04.2022	16,1004	388.486.828	D
231	180	115738640	6	6.04.2022	35,1419	590	A
232	181	115738658	10	6.04.2022	29,7085	26.990	B
233	182	115738665	12	6.04.2022	neg.	0	A
234	182	115738673	12	6.04.2022	neg.	0	A
235	183	115738681	12	6.04.2022	neg.	0	A
236	183	115738698	12	6.04.2022	neg.	0	A
237	184	115738700	6	7.04.2022	31,8099	6.153	A
238	185	115738205	1	7.04.2022	30,4706	15.788	A
239	186	115738220	10	7.04.2022	33,6615	1.672	A
240	187	115738238	7	7.04.2022	33,7705	1.549	A
241	188	115738246	10	7.04.2022	neg.	0	A
242	189	115738254	5	7.04.2022	31,5553	7.360	A
243	190	115738261	7	7.04.2022	26,8586	200.468	B
244	191	115738279	10	11.04.2022	28,6004	58.857	B
245	192	115738287	10	11.04.2022	33,6380	1.700	A
246	193	115738294	10	12.04.2022	33,2433	2.244	A
247	194	115738077	14	12.04.2022	14,9126	895.992.520	D
248	194	115738085	14	12.04.2022	18,7667	59.517.200	D
249	195	115738092	14	12.04.2022	32,2262	4.591	A
250	195	115738104	14	12.04.2022	32,5654	3.616	A
251	196	115738153	3	12.04.2022	28,5097	62.735	B
252	197	115738178	13	12.04.2022	32,6809	3.334	A
253	197	115738160	13	12.04.2022	34,5128	919	A
254	198	115738314	10	13.04.2022	15,8418	466.005.952	D
255	199	115738321	3	13.04.2022	34,2601	1.097	A
256	200	115738186	6	13.04.2022	29,4400	32.603	B

257	201	115738193	6	13.04.2022	27,1022	168.887	B
258	202	115737953	13	13.04.2022	31,4945	7.682	A
259	202	115737945	13	13.04.2022	34,2948	1.071	A
260	203	115737601	10	14.04.2022	28,6977	54.962	B
261	204	115737619	10	15.04.2022	34,0140	1.305	A
262	204	115737626	10	15.04.2022	36,7867	185	A
263	205	115737634	10	15.04.2022	29,1799	39.149	B
264	206	115737978	12	15.04.2022	34,1162	1.214	A
265	206	115737960	12	15.04.2022	36,6510	204	A
266	207	115738028	15	15.04.2022	30,1398	19.926	A
267	207	115738011	15	15.04.2022	31,2571	9.078	A
268	208	115737993	29	15.04.2022	32,5571	3.637	A
269	208	115738003	29	15.04.2022	34,0424	1.279	A
270	208	115737986	29	15.04.2022	34,3068	1.062	A
271	209	115738044	20	21.04.2022	32,8004	3.065	A
272	209	115738036	20	21.04.2022	33,7510	1.570	A
273	210	115738052	10	21.04.2022	37,1414	145	A
274	211	115738069	10	21.04.2022	33,7871	1.531	A
275	212	115741579	10	26.04.2022	neg.	0	A
276	213	115741614	5	10.05.2022	22,8935	3.263.121	C
277	214	115741796	6	16.06.2022	28,6013	58.819	B
278	215	115741808	14	16.06.2022	29,7142	26.883	B
279	215	115741816	14	16.06.2022	29,7420	26.362	B
280	216	115734608	22	23.02.2022	34,8179	741	A
281	216	115734616	22	23.02.2022	neg.	0	A
282	216	115734623	22	23.02.2022	neg.	0	A
283	217	115734169	10	24.02.2022	neg.	0	A
284	218	115734177	10	24.02.2022	30,1546	19.719	A
285	219	115734185	6	24.02.2022	30,9889	10.964	A
286	220	115734192	7	1.03.2022	neg.	0	A
287	221	115734204	2	1.03.2022	34,8288	736	A
288	222	115734212	3	1.03.2022	30,4630	15.873	A
289	223	115734596	4	7.03.2022	31,4424	7.969	A
290	224	115734571	12	8.03.2022	27,4499	132.238	B
291	224	115734589	12	8.03.2022	29,6143	28.840	B
292	225	115734563	10	9.03.2022	31,3020	8.796	A
293	226	115734556	14	11.03.2022	34,1589	1.178	A
294	226	115734548	14	11.03.2022	28,1321	81.827	B
295	227	115734530	9	14.03.2022	32,2903	4.388	A
296	228	115734522	4	14.03.2022	30,6108	14.305	A
297	229	115734515	3	14.03.2022	25,2972	601.376	C
298	230	115734447	1	22.03.2022	37,1202	147	A
299	231	115734439	18	22.03.2022	33,3460	2.088	A
300	232	115931472	20	23.03.2022	35,3919	495	A
301	232	115931464	20	23.03.2022	neg.	0	A
302	233	115931480	6	23.03.2022	33,9223	1.392	A
303	234	115931517	16	23.03.2022	neg.	0	A
304	235	115931497	6	23.03.2022	neg.	0	A
305	236	115734421	5	23.03.2022	37,0163	158	A
306	237	115734414	6	23.03.2022	neg.	0	A
307	238	115734406	16	23.03.2022	34,6248	849	A
308	239	115736483	11	25.03.2022	36,9689	163	A
309	239	115736475	11	25.03.2022	neg.	0	A
310	240	115736490	10	25.03.2022	neg.	0	A
311	241	115736510	14	25.03.2022	31,8490	5.986	A
312	241	115736502	14	25.03.2022	32,5185	3.737	A
313	242	115736527	4	25.03.2022	33,3855	2.031	A
314	243	115736535	6	25.03.2022	36,2579	269	A

315	244	115734229	26	28.03.2022	neg.	0	A
316	244	115734237	26	28.03.2022	neg.	0	A
317	244	115734245	26	28.03.2022	neg.	0	A
318	245	115734260	25	28.03.2022	32,4185	4.010	A
319	245	115734278	25	28.03.2022	34,1246	1.207	A
320	245	115734253	25	28.03.2022	18,6354	65.277.050	D
321	246	115736745	10	29.03.2022	35,0700	621	A
322	247	115736677	12	29.03.2022	neg.	0	A
323	247	115736685	12	29.03.2022	neg.	0	A
324	248	115736652	15	29.03.2022	32,4098	4.034	A
325	248	115736644	15	29.03.2022	neg.	0	A
326	249	115736636	11	29.03.2022	31,1888	9.525	A
327	249	115736628	11	29.03.2022	36,9422	166	A
328	250	115736584	23	29.03.2022	neg.	0	A
329	250	115736591	23	29.03.2022	neg.	0	A
330	250	115736786	23	29.03.2022	neg.	0	A
331	251	115931884	15	29.03.2022	32,8290	3.004	A
332	251	115931891	15	29.03.2022	neg.	0	A
333	252	115931775	15	29.03.2022	neg.	0	A
334	252	115931783	15	29.03.2022	neg.	0	A
335	253	115734394	8	6.04.2022	30,7260	13.192	A
336	254	115734346	4	6.04.2022	34,3612	1.022	A
337	255	115734354	6	6.04.2022	34,3345	10.422	A
338	256	115734361	7	6.04.2022	37,0804	151	A
339	257	115734379	9	6.04.2022	33,8923	1.422	A
340	258	115734387	10	6.04.2022	30,9955	10.913	A
341	259	115931625	10	6.04.2022	28,0583	86.188	B
342	260	115931598	23	6.04.2022	34,6776	818	A
343	260	115931600	23	6.04.2022	34,8546	722	A
344	260	115931618	23	6.04.2022	37,1042	148	A
345	261	115738362	5	6.04.2022	21,9486	6.343.831	C
346	262	115738355	11	6.04.2022	18,3119	81.959.752	D
347	263	115738347	10	6.04.2022	23,0891	2.843.544	C
348	264	115737869	16	7.04.2022	neg.	0	A
349	264	115737877	16	7.04.2022	neg.	0	A
350	265	115737929	23	7.04.2022	neg.	0	A
351	265	115737937	23	7.04.2022	neg.	0	A
352	265	115738370	23	7.04.2022	neg.	0	A
353	266	115738388	10	7.04.2022	neg.	0	A
354	267	115738395	8	7.04.2022	37,1430	144	A
355	268	115738407	19	7.04.2022	neg.	0	A
356	268	115738415	19	7.04.2022	neg.	0	A
357	269	115738422	3	7.04.2022	neg.	0	A
358	270	115739808	11	13.04.2022	neg.	0	A
359	270	115739816	11	13.04.2022	neg.	0	A
360	271	115739849	15	13.04.2022	neg.	0	A
361	271	115739857	15	13.04.2022	neg.	0	A
362	272	115739864	3	14.04.2022	neg.	0	A
363	273	115739707	10	14.04.2022	37,6054	104	A
364	274	115739748	13	14.04.2022	neg.	0	A
365	274	115739756	13	14.04.2022	neg.	0	A
366	275	115739981	10	14.04.2022	neg.	0	A
367	276	115739973	10	14.04.2022	36,7104	196	A
368	277	115739965	5	15.04.2022	34,2706	1.089	A
369	278	115739958	2	15.04.2022	neg.	0	A
370	279	115739940	5	15.04.2022	36,6796	200	A
371	280	115739932	10	15.04.2022	32,8245	3.014	A
372	281	115739924	10	15.04.2022	29,8043	25.231	B

373	282	115739621	10	15.04.2022	neg.	0	A
374	283	115739639	5	15.04.2022	30,5377	15.061	A
375	284	115739647	15	15.04.2022	36,6671	202	A
376	285	115740002	10	21.04.2022	neg.	0	A
377	286	115740010	10	21.04.2022	33,3262	2.117	A
378	287	115740027	20	21.04.2022	36,3862	246	A
379	287	115740035	20	21.04.2022	37,1329	145	A
380	288	115740051	12	21.04.2022	30,4749	15.741	A
381	288	115740043	12	21.04.2022	32,4870	3.821	A
382	289	115740068	5	21.04.2022	neg.	0	A
383	290	1157396	10	3.05.2022	37,1541	143	A
384	291	115740076	3	3.05.2022	36,2068	279	A
385	292	115739670	11	16.05.2022	26,6889	225.887	B
386	292	115739662	11	16.05.2022	25,4929	524.019	C
387	293	115740144	13	16.05.2022	neg.	0	A
388	293	115740152	13	16.05.2022	neg.	0	A
389	294	115739909	9	16.05.2022	32,8610	2.937	A
390	295	115737811	17	16.05.2022	36,1534	290	A
391	295	115737828	17	16.05.2022	neg.	0	A
392	296	115737803	2	18.05.2022	28,9772	45.151	B
393	297	115737784	14	18.05.2022	37,0525	154	A
394	297	115737791	14	18.05.2022	neg.	0	A
395	298	115740136	10	18.05.2022	19,8619	27.541.320	D
396	299	115739460	7	18.05.2022	29,5323	30.552	B
397	300	115739486	19	18.05.2022	23,0988	2.824.234	C
398	300	115739478	19	18.05.2022	18,9044	54.021.106	D
399	301	115740169	14	18.05.2022	26,0729	348.433	B
400	301	115740177	14	18.05.2022	23,9810	1.518.207	C
401	302	115740185	7	23.05.2022	27,8544	99.484	B
402	303	115740192	10	23.05.2022	27,0335	177.253	B
403	304	115740204	10	23.05.2022	31,7626	6.361	A
404	305	115740212	4	23.05.2022	28,7357	53.513	B
405	306	115740229	7	31.05.2022	33,1139	2.458	A
406	307	115740237	6	31.05.2022	31,8287	6.072	A
407	308	115739688	5	31.05.2022	neg.	0	A
408	309	115739695	1	31.05.2022	36,2460	271	A
409	310	115739493	10	31.05.2022	31,1146	10.036	A
410	311	115739505	12	3.06.2022	25,1748	655.482	C
411	312	115739445	20	9.06.2022	29,8425	24.561	B
412	313	115739437	15	9.06.2022	30,9770	11.056	A
413	314	116109354	10	18.02.2022	34,7044	803	A
414	315	116109177	14	18.02.2022	neg	0	A
415	315	116109185	14	18.02.2022	neg	0	A
416	316	116109346	6	18.02.2022	neg.	0	A
417	317	114070303	8	18.03.2022	28,2829	73.590	B
418	318	115414879	12	14.04.2022	35,3001	528	A
419	318	115414887	12	14.04.2022	35,7883	374	A
420	319	115414894	13	14.04.2022	34,5016	926	A
421	319	115414906	13	14.04.2022	neg.	0	A
422	320	115740488	10	14.04.2022	37,0382	155	A
423	321	115740507	13	14.04.2022	32,7424	3.193	A
424	321	115740495	13	14.04.2022	36,6790	200	A
425	322	115740548	3	14.04.2022	neg.	0	A
426	323	115740556	10	14.04.2022	35,0706	620	A
427	324	115740571	11	14.04.2022	36,7615	189	A
428	324	115740563	11	14.04.2022	36,8854	173	A
429	325	115740589	13	14.04.2022	neg.	0	A
430	325	115740596	13	14.04.2022	neg.	0	A

431	326	115744733	10	3.06.2022	22,4705	4.394.184	C
432	327	11570709	10	28.04.2022	36,8654	176	A
433	328	115740697	6	28.04.2022	36,5074	226	A
434	329	116109204	3	5.05.2022	neg.	0	A
435	330	116109192	1	5.05.2022	35,3391	514	A
436	331	116109338	10	3.06.2022	32,9199	2.818	A
437	332	115744826	10	13.05.2022	35,4572	473	A
438	333	115744819	4	13.05.2022	35,3412	513	A
439	334	116109320	10	13.05.2022	36,7151	195	A
440	335	116109313	12	13.05.2022	31,2756	8.961	A
441	335	116109305	12	13.05.2022	29,6625	27.878	B
442	336	116109293	2	13.05.2022	30,6995	13.440	A
443	337	116109212	7	13.05.2022	36,8874	173	A
444	338	116109229	4	13.05.2022	neg.	0	A
445	339	116109237	5	13.05.2022	32,3478	4.214	A
446	340	116109253	18	13.05.2022	16,6500	263.894.150	D
447	340	116109245	18	13.05.2022	18,8361	56.680.488	D
448	341	116109260	10	13.05.2022	25,9623	376.630	B
449	342	115744801	12	13.05.2022	36,9494	165	A
450	342	115744799	12	13.05.2022	neg.	0	A
451	343	115744213	10	18.05.2022	33,8825	1.431	A
452	344	116109278	5	25.05.2022	neg.	0	A
453	345	115744220	10	25.05.2022	33,3349	2.104	A
454	346	115744238	10	25.05.2022	37,2917	130	A
455	347	115744681	10	25.05.2022	neg.	0	A
456	348	115744782	7	25.05.2022	31,1390	9.865	A
457	349	115744774	10	24.05.2022	27,8759	97.993	B
458	350	115744759	6	24.05.2022	23,7711	1.759.775	C
459	351	115742341	7	17.06.2022	32,4728	3.859	A
460	352	110616229		4.05.2022	neg.	0	A
461	353	115744508	10	6.06.2022	neg	0	A
462	354	115744496	4	6.06.2022	30,3457	17.238	A
463	355	115744741	5	6.06.2022	neg.	0	A
464	356	115744489	10	6.06.2022	31,9355	5.633	A
465	357	115744725	3	3.06.2022	neg	0	A
466	358	115744246	10	23.06.2022	33,4051	2.003	A
467	359	115744254	20	23.06.2022	29,5069	31.103	B
468	359	115744261	20	23.06.2022	26,5628	246.844	B
469	360	115744279	4	23.06.2022	27,6374	115.894	B
470	361	115744539	10	23.06.2022	17,5932	135.900.365	D
471	362	115742419	3	17.06.2022	30,5909	14.507	A
472	363	115741857	8	20.06.2022	neg.	0	A
473	364	115741823	25	17.06.2022	23,4987	2.131.552	C
474	364	115741831	25	18.06.2022	20,7507	14.736.913	C
475	364	115741849	25	19.06.2022	14,7678	992.143.464	D
476	365	115741872	15	22.06.2022	27,5221	125.688	B
477	365	115741880	15	23.06.2022	28,9352	46.505	B
478	366	115741897	3	22.06.2022	34,8879	706	A
479	367	115741909	6	22.06.2022	22,2193	5.243.789	C
480	368	115741437	10	22.06.2022	24,7148	905.956	C
481	369	115741445	10	22.06.2022	28,4493	65.460	B
482	370	115741453	10	29.06.2022	neg.	0	A
483	371	115741460	10	29.06.2022	32,1121	4.974	A
484	372	115741478	6	29.06.2022	34,7482	778	A
485	373	115741486	3	29.06.2022	37,2651	132	A
486	374	115741493	3	29.06.2022	32,2208	4.608	A
487	375	115741503	10	29.06.2022	30,6872	13.557	A
488	376	115741513	5	29.06.2022	33,2727	2.198	A

489	377	115741520	6	29.06.2022	32,2999	4.359	A
490	378	115741538	10	29.06.2022	34,7717	766	A
491	379	115741546	1	29.06.2022	28,8163	50.563	B
492	380	115741311	1	29.06.2022	29,4330	32.763	B
493	381	115741328	9	30.06.2022	27,2835	148.663	B
494	382	115744287	10	4.07.2022	33,7027	1.624	A
495	383	115744294	22	4.07.2022	31,0952	10.174	A
496	383	115744306	22	4.07.2022	31,906	5.751	A
497	383	115744314	22	4.07.2022	27,4036	136.617	B
498	384	115744321	8	4.07.2022	17,6574	129.898.260	D
499	385	115744430	10	4.07.2022	neg.	0	A
500	386	115744448	5	4.07.2022	neg.	0	A
501	387	115744456	5	4.07.2022	32,5970	3.537	A
502	388	115744665	15	5.07.2022	30,8503	12.087	A
503	388	115744422	15	5.07.2022	28,5876	59.390	B
504	389	115744415	10	5.07.2022	neg.	0	A
505	390	115744463	20	5.07.2022	neg.	0	A
506	390	115744471	20	5.07.2022	37,1690	142	A
507	391	115744407	10	5.07.2022	37,2116	138	A
508	392	115744395	10	5.07.2022	34,8431	728	A
509	393	115744388	4	5.07.2022	36,2145	277	A
510	394	115739412	7	20.06.2022	36,7159	195	A
511	395	115740406	1	4.07.2022	neg.	0	A
512	396	115739284	1	4.07.2022	neg.	0	A
513	397	115739276	6	4.07.2022	37,0890	150	A
514	398	115739268	4	30.06.2022	21,8826	6.645.521	C
515	399	115740387	3	23.06.2022	neg.	0	A
516	400	115740394	4	23.06.2022	26,4337	270.316	B

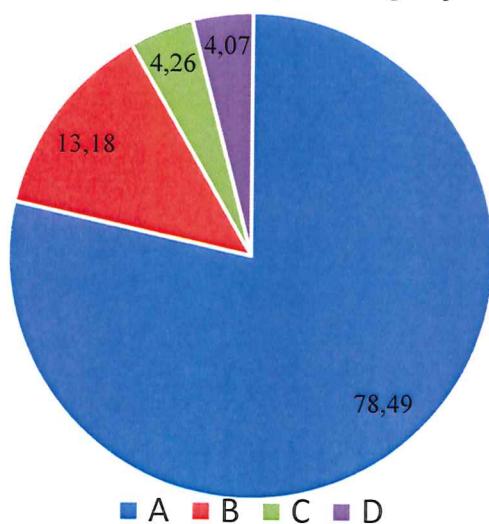
Tabela 1: Seznam rezultatov preiskav vzorcev drobirja na spore *P. larvae*, glede na ID oznako vzorca.

Število vzorcev glede na število spor / ml drobirja je prikazano v tabeli 2 in razporeditev vzorcev glede na uvrstitev v kategorije A do D je prikazano v grafikonu 1.

Število spor / ml drobirja	Število vzorcev	% vzorcev
negativno	157	30,43
do 20.000	248	48,06
20.000 - 400.000	68	13,18
400.000 - 20.000.000	22	4,26
več kot 20.000.000	21	4,07
Skupaj	516	100

Tabela 2: Število in odstotek vzorcev, razporejenih v posamezne kategorije glede na število spor *P. larvae* / ml drobirja

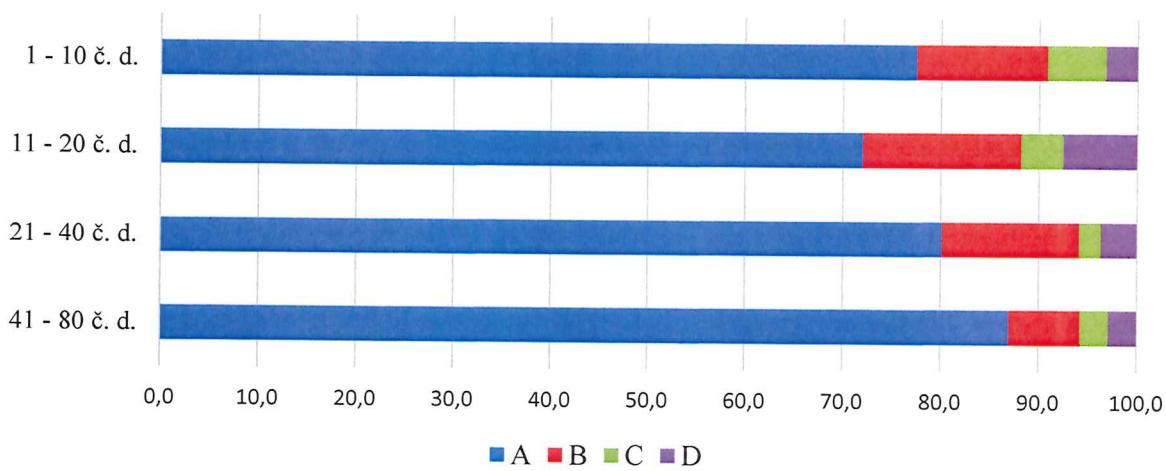
Odstotek vzorcev po kategorijah



Grafikon 1: Razporeditev vzorcev glede na uvrstitev v kategorije A do D, prikazano v odstotkih.

Rezultate preiskave vzorcev drobirja smo analizirali tudi glede na število čebeljih družin na stojišču. Ugotovili smo, da je delež vzorcev, ki smo jih uvrstili v kategoriji C in D, ki pomenita večje tveganje, da je bolezen že prisotna v eni ali več družin, ali pa se lahko pojavi v bližnji prihodnosti, znatno višji v čebelnjakih z do 20 čebeljimi družinami, v primerjavi s čebelnaki z 21 do 80 čebeljimi družinami. Najslabši rezultat je v čebelnjakih z 11 do 20 čebeljimi družinami in najboljši v čebelnjakih z 41 do 80 družinami. Iz tega rezultata bi morda lahko sklepali, da večji čebelarji v povprečju bolje poznajo in upoštevajo ukrepe za preprečevanje širjenja bolezni v primerjavi z manjšimi. Podatki so prikazani v grafikonu 2.

Odstotek vzorcev po kategorijah glede na število čebeljih  
družin na stojišču



Grafikon 2: Odstotek vzorcev v posameznih kategorijah (A – D) v primerjavi s številom čebeljih družin na stojišču

Na koncu smo se osredotočili še na vzorce, ki so bili razvrščeni v kategorijo D, saj gre pri teh za veliko verjetnost, da se je bolezen v eni ali več družinah na stojišču že pojavila v klinični obliki. Skupno je bilo takih vzorcev 21, z razponom v številu spor od 20.068.317 pa vse do 9.190.572.217 spor / ml drobirja. V grafikonu 3 je prikazana razporeditev vzorcev glede na število spor v kategoriji D.



Grafikon 3: Razporeditev vzorcev v kategoriji D glede na število spor *P. larvae* v 1 ml drobirja

#### 4. SPLOŠNE UGOTOVITVE

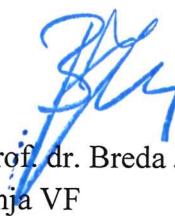
V okviru ukrepa »Uporaba presejalnih laboratorijskih metod za ugotavljanje žarišč hude gnilobe čebelje zalege v naključno izbranih čebelnjakih za učinkovitejšo sanacijo bolezni« smo na območju Osrednjeslovenske regije v 400 čebelnjakih vzorčili 516 vzorcev/pod-vzorcev drobirja za laboratorijske preiskave z metodo molekularne detekcije in kvantifikacije spor *P. larvae* v drobirju (kvantitativni PCR). Rezultate smo podali kot vrednost Ct in preračunano na število spor v ml drobirja. Izvide z rezultati preiskav smo poslali čebelarjem na dom ter priložili razlago rezultata z navodili za nadaljnje ravnanje.

Od skupno 516 vzorcev/pod-vzorcev je bilo 157 (30,43 %) negativnih. Pod 20.000 spor /ml drobirja smo ugotovili v 248 (48,06 %) vzorcev, kar smo skupaj z negativnimi uvrstili v kategorijo A – brez tveganja za pojav klinične oblike bolezni. Nekoliko povečano število spor, to je med 20.000 in 400.000 spor /ml drobirja smo ugotovili v 68 (13,18 %) vzorcih, kar smo uvrstili v kategorijo B - kjer še ni tveganja za pojav bolezni v bližnji prihodnosti, vendar se priporočajo nekateri ukrepi za zmanjševanje števila spor v panjih. V kategorijo C, 400.000 do 20.000.000 spor /ml drobirja smo uvrstili 22 (4,26 %) vzorcev – število spor je povečano vendar klinična oblika bolezni najverjetneje še ni prisotna, lahko pa se pojavi v bližnji prihodnosti. V

kategorijo D smo uvrstili 21 (4,07) vzorcev z več kot 20.000.000 spor/ml drobirja – število spor je močno povečano in obstaja realna možnost, da so v eni ali več družinah že prisotni klinični znaki bolezni ali se ti lahko vsak čas izrazijo.

Čebelarji so v ukrepu sodelovali popolnoma prostovoljno in če predvidevamo, da so se v večjem številu vključevali tisti, ki niso pričakovali večjih težav na področju hude gnilobe in ki tudi sicer bolje sodelujejo z veterinarsko stroko, smo kljub temu v kategoriji C in D uvrstili skupno kar 8, 33% vzorcev. Torej bi lahko rekli, da ima vsaj 8 % čebelarjev v Osrednjeslovenski regiji težave s hudo gnilobo čebelje zalege, saj se je pri njihovih čebeljih družinah ta že odrazila v klinični obliki ali pa se bo zelo verjetno v bližnji prihodnosti. In samo sklepamo lahko, kakšni bi bili ti rezultati, če čebelarji ne bi sodelovali zgolj prostovoljno, ampak bi vzorčili naključno večje število čebelnjakov na osnovi statističnega vzorca. Poleg tega smo na posameznih stojiščih ugotovili izjemno visoko število spor. Pri družinah s klinično obliko bolezni je edini izhod neškodljivo uničenje, pri vseh ostalih pa lahko še ukrepamo, v koliko poznamo stopnjo tveganja (količino spor), saj lahko z nekaterimi tehnološkimi ukrepi zmanjšamo število spor v družinah in s tem preprečimo razvoj klinične oblike bolezni. Zato menimo, da je vključitev laboratorijskih preiskav vzorcev drobirja na spore *P. larvae* v redni monitoring te bolezni nujen ukrep za zmanjšanje števila žarišč hude gnilobe v Sloveniji.

Na osnovi podatkov veterinarjev za zdravstveno varstvo čebel v Osrednjeslovenski regiji ter rezultatov laboratorijskih preiskav poročilo pripravila dr. Metka Pislak Ocepek (vodja projekta).



Izr. prof. dr. Breda Jakovac Strajn  
Dekanja VF