

Povzročitelj in laboratorijska diagnostika hude gnilobe čebelje zalege

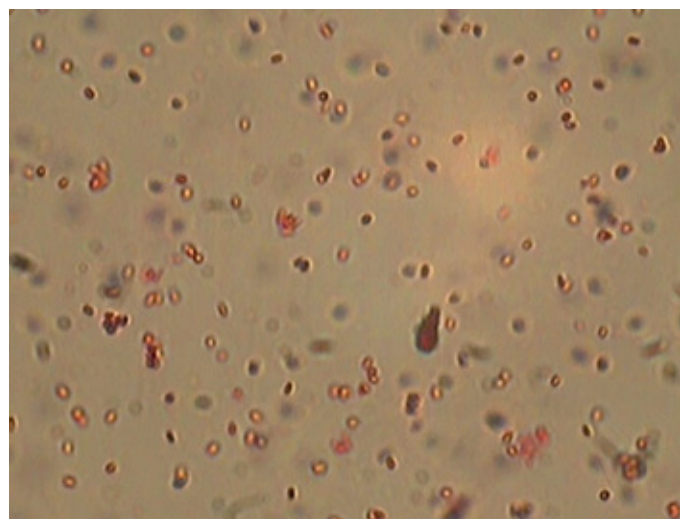
Alenka Žugelj, dr. vet. med.¹ in Jerica Vreček Šulgaj, dr. vet. med.²

¹ VF NVI, enota Maribor-Ptuj, ² Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
alenka.zugelj@vf.uni-lj.si, jerica.vrecekulgaj@vf.uni-lj.si

Huda gniloba čebelje zalege (HGČZ) je najnevarnejša bakterijska bolezen čebel. Povzročajo jo spore Grama pozitivna bakterija *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*). Bakterija ima obliko ravne ali rahlo ukrivljene paličke zaobljenih robov. Z molekularno metodo ERIC PCR so ugotovili, da se povzročitelj bolezni pojavlja v štirih biološko pomembnih genotipih ERIC I, II, III in IV. Genotipi se med seboj razlikujejo tudi v virulenci. V kliničnih izbruhih bolezni po svetu se pojavljata samo genotipa ERIC I in ERIC II, medtem ko genotipov ERIC III in IV ne ugotavljajo v izbruhih bolezni, sta pa shranjena v mednarodni zbirki bakterijskih kultur.

Patogenost različnih genotipov bakterije

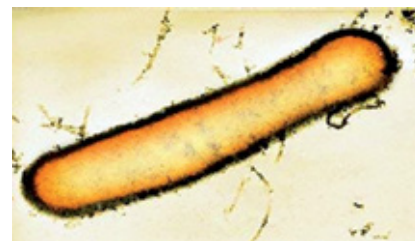
Genotipi ERIC izločajo različne dejavnike patogenosti, s katerimi poškodujejo čebeljo ličinko. Ugotovili so, da *P. larvae* izloča številne biološko aktivne snovi s protibakterijsko, protiglivno in celo protivirusno dejavnostjo. *P. larvae* je obligatorni ubijalec, kar pomeni, da za preživetje v populaciji čebel neizbežno usmrti svojo gostiteljico – čebeljo ličinko. Vse to vodi v slabljenje in propad celotne čebelje



Spore – edina kužna oblika *P. larvae*

družine. Znano je, da so genotipi ERIC II, III in IV hitri ubijalci in povzročijo smrt ličinke v šestih do sedmih dneh po okužbi. So zelo patogeni za posamezno ličinko, vendar čebelja zalega v tem času

še ni pokrita s satnimi pokrovc, kar odraslim čebelam čistilkam omogoča učinkovito čiščenje okuženih in spremenjenih satnih celic. Genotipi ERIC I so na ravni posamezne čebelje ličinke manj patogeni in povzročijo njeno smrt šele v dvanajstih dneh po okužbi. Takrat je čebelja zalega že pokrita in zato so čebele čistilke takrat manj oziroma neučinkovite pri odstranjevanju okužene zalege iz panja. *P. larvae* genotip ERIC I je tako manj patogen na ravni posamezne čebelje ličinke, vendar učinkovitejši na ravni celotne čebelje družine.



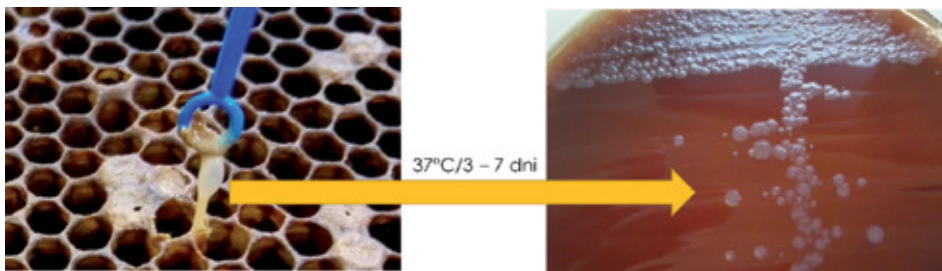
P. larvae – ravna oz. rahlo ukrivljena paličasta bakterija zaobljenih robov

Diagnostika bolezni

V Sloveniji izvajamo diagnostiko hude gnilobe čebelje zalege na več ravneh, odvisno od razpoložljivih anamnestičnih, kliničnih in epidemioloških podatkov o določenem čebelarstvu. Laboratorijsko diagnostiko hude gnilobe čebelje zalege opravimo, kadar je postavljen sum na bolezen v čebelji družini na podlagi značilnih kliničnih znakov. Za potrditev suma bolezni veterinar specialist za zdravstveno varstvo čebel VF NVI odvzame ostanke bolezensko spremenjene zalege, to je vlečljivo maso, iz okužene satne celice. V laboratorijih VF NVI opravimo bakteriološko preiskavo vzorcev. Spremenjeno zalego nasadimo na gojišča in jo inkubiramo na 37 °C za tri do sedem dni. Iz brisa vlečljive mase zraste *P. larvae* dokaj hitro, prve kolonije lahko že po dveh dneh inkubacije. Iz kliničnega materiala večinoma zrastejo v čisti kulturi, kar je posledica izločanja zaviralnih snovi *P. larvae*, ki inhibirajo rast drugih bakterij. Rast *P. larvae* na gojišču ugotavljamo kot prisotnost značilnih kolonij, skupkov bakterijskih celic. Kolonije *P. larvae* se pojavljajo v različnih oblikah, barvah in struktur.

Kolonije *P. larvae*, značilne za genotip ERIC I, so belkasto sive, hrapave z neravnimi robovi. Gladke pigmentirane kolonije so značilne za genotip ERIC II. Pojavljanje različnih genotipov ERIC v izbruhih bolezni v Sloveniji še ni poznano. Naši izolati *P. larvae* kažejo veliko pestrost v morfološki

Foto: Alenka Žugelj



Spremenjene celice čebelje zalege s prizadetimi ličinkami, ki razpadejo v vlečljivo maso (levo), in kolonije *P. larvae* na gojišču po sedmih dneh bakteriološke preiskave (desno).

Foto: Alenka Žugelj



Različne barve in oblike kolonij *P. larvae*

Foto: Alenka Žugelj



Cone zaviranja rasti kontaminantov zaradi antibiotičnih snovi *P. larvae*

zraslih kolonij, zato dopuščamo možnost, da pripadajo različnim tipom ERIC.

V medu ugotavljamo prisotnost spor povzročitelja bolezni. Pregledujemo lahko med posameznih panjev, ki so lahko različno močno okuženi, ali skupni vzorec medu. Pri skupnem vzorcu je rezultat lahko manj natančen, ker se med slabo meša in je število spor v isti posodi lahko neenakomerno razporejeno. Za preiskavo potrebujemo najmanj 50 g medu. Vzorec ustrezno obdelamo in sadimo na gojišča ter inkubiramo na 37 °C za tri do sedem dni. Za razliko od vzorcev iz zalege *P. larvae* iz vzorcev medu večkrat zraste ob prisotnosti drugih bakterij iz okolja, ki tudi ustvarjajo spore. Večkrat tudi ugotavljamo, da kljub intenzivni rasti spirogenih kontaminantov *P. larvae* izloča antibiotične snovi, ki zavirajo njihovo rast, kar se kaže v obliki zaviralne cone.

S sporami onesnažen med predstavlja pomemben vir okužbe za čebeljo družino in se ne uporablja za hranjenje čebel. Za preiskavo medu se odločimo predvsem, ko obstaja možnost prenosa bolezni, bolezen pa klinično še ni izražena, saj lahko spore *P. larvae* v medu dokažemo že pred pojavom kliničnih znakov. Ko se pojavijo klinični znaki, je v medu navadno že več tisoč spor na 1 g medu. Po podatkih iz literatu-

re naj bi na gojiščih vzkli približno vsaka dvatisoča spora. Število spor v medu pa ni vedno v korelaciji z izbruhom bolezni. Izjemoma je v medu lahko prisotnih tudi več milijonov spor brez prisotnosti kliničnih znakov bolezni, kar lahko nakazuje na nedovoljeno uporabo antibiotikov. Ugotovljeno približno število spor v medu je čebelarju lahko v pomoč pri spremljanju bolezni. Pri ugotovljenem velikem številu spor v medu se priporoča posebna skrbnost pri spremljanju zdravstvenega stanja čebelje družine.

Diagnostične metode se izboljšujejo

Značilne bakterijske kulture, ki zrastejo na gojišču, je treba še potrditi oziroma identificirati do vrste *P. larvae*. To lahko naredimo s kombinacijo nekaterih klasičnih mikrobioloških metod, ki so zamudne in manj zanesljive. V zadnjem času jih je že nadomestila metoda masne spektrometrije (MALDI TOF), ki se je izkazala za zelo hitro in zanesljivo.

Z namenom boljšega spremljanja širjenja bolezni v Sloveniji na VF NVI trenutno uvajamo molekularne metode ugotavljanja prisotnosti različnih genotipov ERIC. Pričakujemo, da nam bo prevalenca genotipov ERIC v pomoč pri boljši diagnostiki bolezni tudi v povezavi z genotipsko značilno klinično sliko.



Aparatura MALDI TOF za hitro in zanesljivo identifikacijo *P. larvae*

Foto: www.quilaban.pt/en-us/Company/News/ArticleId/49/
implementation-of-maldi-tof-technology-in-portugal