УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Департман за ветеринарску медицину

Милан Ковач

ЗНАЧАЈ РЕДОВНОГ МОНИТОРИНГА У ПРЕВЕНЦИЈИ И СУЗБИЈАЊУ АМЕРИЧКЕ КУГЕ ПЧЕЛИЊЕГ ЛЕГЛА

Дипломски рад

Нови Сад, 2021.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Департман за ветеринарску медицину

ЗНАЧАЈ РЕДОВНОГ МОНИТОРИНГА У ПРЕВЕНЦИЈИ И СУЗБИЈАЊУ АМЕРИЧКЕ КУГЕ ПЧЕЛИЊЕГ ЛЕГЛА

Кандидат: Ментор:

Милан Ковач Проф. др Нада Плавша

Нови Сад, 2021.

КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ

ДИПЛОМСКОГ РАДА

Др Нада Плавша, редовни професор, ментор

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Ужа научна област, Болести животиња и хигијена анималних производа,

Пољопривредни факултет, Нови Сад

Др Александар Поткоњак, ванредни професор, председник комисије

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Ужа научна област, Ветеринарска микробиологија и заразне болести животиња,

Пољопривредни факултет, Нови Сад

Др Ненад Стојанац, ванредни професор, члан

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Ужа научна област, Болести животиња и хигијена анималних производа,

Пољопривредни факултет, Нови Сад

САДРЖАЈ:

[1. УВОД 1](#_Toc88565053)

[2. ЦИЉ ДИПЛОМСКОГ РАДА 3](#_Toc88565054)

[3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ 4](#_Toc88565055)

[3.1. Историја болести 4](#_Toc88565056)

[3.2. Етиологија болести 5](#_Toc88565057)

[3.3. Епизоотиологија и путеви преношења болести 7](#_Toc88565058)

[3.4. Патогенеза болести 9](#_Toc88565059)

[3.5. Клиничка слика 10](#_Toc88565060)

[3.6. Дијагноза 12](#_Toc88565061)

[3.6.1. Узорковање материјала за преглед 13](#_Toc88565062)

[3.6.2. Паковање и транспорт узорака у лабораторију 14](#_Toc88565063)

[3.6.3. Припрема узорака за култивацију 14](#_Toc88565064)

[3.6.4. Култивација 15](#_Toc88565065)

[3.6.5. Идентификација колонија *Paenibacillus larvae* 16](#_Toc88565066)

[3.6.6. Микроскопска идентификација *Paenibacillus larvae* 17](#_Toc88565067)

[3.6.7. Биохемијски тестови за доказивање *Paenibacillus larvae* 17](#_Toc88565068)

[3.6.8. Ланчана реакција полимеризације (PCR) 18](#_Toc88565069)

[3.7. Диференцијална дијагноза 18](#_Toc88565070)

[3.8. Терапија болести 19](#_Toc88565071)

[3.9. Спречавање болести 19](#_Toc88565072)

[3.10. Законска регулатива 20](#_Toc88565073)

[4. ЗАКЉУЧАК 25](#_Toc88565074)

[5. ЛИТЕРАТУРА 26](#_Toc88565075)

САЖЕТАК

Америчка куга пчелињег легла је бактеријска заразна болест пчела, односно пчелињег легла са фаталним исходом. Јавља се у скоро свим земљама света, као и код нас. Налази се на листи нарочито опасних заразних болести OIE, а према важећим прописима у нашој земљи обавезна је за пријаву. И поред тога не постоје егзактни подаци везани за појављивање америчке куге пчелињег легла у Р. Србији. На основу података из референтних лабораторија и искуства пчелара, може се закључити да је болест у значајној мери присутна.

Инфективне су само споре, вегетативни облици се развијају само у инфицираним ларвама. Споре су изузетнио отпорне на физичко-хемијске агенсе и могу преживети неколико десетина година. Карактерише је тихо уношење, лагано ширење и упорно одржавање у пчелињаку. Клиничка слика болести је у почетку скривена, а видљиви симптоми се откривају тек када је болест узнапредовала, најраније са 25 дана старости процеса. Због тога постоји велика опасност од ширења заразе на здрава друштва. Карактеристичне симптоме представљају промена боје воштаних поклопаца, појава рупица назубљених ивица на њима, као и промене боје и конзистенције ларве унутар ћелије саћа. Болест се преноси на многе начине, преко свих пчелињих производа, преноси је пчелар у току рада на пчелињаку, али и саме пчеле путем грабежи или преко заједничких напајалишта.

Сваку сумњу на америчку кугу пчелињег легла пчелар мора пријавити надлежној ветеринарској инспекцији или надлежном ветеринару. У том случају ће надлежна ветеринарска служба извршити узорковање и слање узорака у референтну лабораторију. У случају потврде болести не спроводи се терапија, већ се према закону оболела друштва са саћем као и заражена опрема нешкодљиво уништавају. Антибиотска терапија не може излечити болест, већ је само прикрива и пролонгира, а третирана друштва постају трајни извор заразе. Поред тога антибиотска терапија чини пчелиње производе потпуно не употребљивим.

Штете које наноси америчка куга легла су значајне. Само континуирано праћење појављивања болести и правовремена дијагностика америчке куге пчелињег легла, могу обезбедити здраву и профитабилну пчеларску производњу. Ово се може остварити једино сталним усавршавањем и подизањем свести о болести пчела, те успостављањем добре сарадње између пчелара и ветеринарске службе.

ABSTRACT

American foulbrood is a fatal bacterial disease of honey bees, that is of honey bee litter. It is found in almost all the country’s worldwide, including Serbia. On the OIE list it is marked as a particularly infectious diseases, and reporting about it is mandatory in our country. Even so, there is no exact data regarding the reporting of American foulbrood in Serbia. According to referent laboratory data and beekeeper experience, it can be concluded that this disease is present in a significant extend.

Only the spores are infectious, vegetative forms develop only in infected larva. Spores are highly resistant to physical and chemical agents and can live for several decades. Quiet intake, slow spread and persistent maintaining are characteristically shown in the apiary. In the beginning, clinical picture is hidden, visible symptoms can be noticed after the disease has advanced, earliest 25 days after the beginning of the process. Because of this there is a great danger of healthy society’s being infected. Characteristic symptoms are color change in the wax lids, toothed holes in the wax lids, as well as larva color and consistency change. Disease can be carried by many ways, through all bee products, by the beekeeper during work, but also by bees during robbing and common fields.

Any doubt about American foulbrood a beekeeper must report to the authorized veterinary inspection or to the authorized veterinarian. In that case the authorized veterinary inspection will take samples and send them to the authorized laboratory. In case of disease confirmation, the infected bees are not treated, but are according to law destroyed together with the honeycombs. Antibacterial therapy can’t cure the diseases, it only disguises and prolong it, the treated bees become a permanent source of disease.

Damages made by Americans foulbrood are significant. Only continuous disease tracking and timed diagnosis of American foulbrood can ensure a healthy and productive beekeeping production. This can only be achieved by continuous improvement and awareness raising about bee diseases and by achieving a healthy cooperation between beekeepers and the veterinary service.

# 

# 1. УВОД

Медоносна пчела (*Apis mellifera L.*) је кроз своју дугу историју постојања побуђивала пажњу човека са својим драгоценим производима и незаменљивим опрашвиањем биљног света. Не постоје поуздани докази о томе када су се на земљи појавиле пчеле ([1](#_ENREF_1)).

Индија се сматра за прадомовину наше медоносне пчеле. Од многобројних фосила који су нађени у разним слојевима земље има само неколико који би се могли сматрати фосилима некадашњих предака пчеле медарице или њених рођака. Већина тих фосила потиче из новијег доба Земљине историје, тзв. терцијерне периоде, из времена пре 15 до 60 милиона година. Најближи сродници данашње медоносне пчеле су осе. Пчеле су у свом развоју, променивши услове живота отишле другим путем од оса, тако да се начином живота, грађом и обликом тела разликују од некадашнјих заједничких предака од којих су постале. Даљи развој мењао је и усавршавао поједине делове тела, а нарочито оне који су служили за пробављање хране.

Прве пчеле живеле су усамљеним животом, то јест свака женка је сакупљала храну за себе и своје легло, а тако живе и садашнје врсте које су остале на нижем ступњу развитка. Међутим, данашња медоносна пчела развила се као друштвена живтиња те живи у великим заједницама са врло сложеним односима између појединих чланова тог друштва ([2](#_ENREF_2)).

Природни услови, умерена континентална клима и богаство биљног света у Србији пружају одличне услове за гајенје пчела. Рани почеци пчеларске производње у Србији се бележе у средњем веку, а данас у нашој земљи има око 30 хиљада пчелара са приближно 1.200.000 хиљада кошница. Само 9 хиљада пчелара је учлањено у 173 удружења која чине савез пчеларских организација Србије. Висина чланарине у Савезу је противредност 3 килограма меда. Медоносни потенцијал земље омогућава гајење око милион и двеста хиљада кошница, уколико су временски услови повољни ([3](#_ENREF_3)).

Добит од пчеларства је вишеструка, поред директне добити у виду пчелињих производа који се пласирају на тржиште једнако је важна и улога пчела у опрашивању биљака. Опстанак и развој пчелиње заједнице зависи од многих фактора, као што су: спољашњи климатски услави, доступност хране, примена пестицида, технике пчеларења и умешност пчелара али и континуирано праћење присуства болести и благовремено реаговање. За стварање неопходног нивоа здравственог стања заштите и превентиве неопходна је заједничка акција пчеларских организација и већи степен опремљености и обучености ветеринарске службе и стриктно придржавање законских прописа, чиме би се створили услови у којима се не би угрожавали највећи приноси пчелињих производа. У пчеларској литератури уобичајена је подела пчелињих болести на болести легла и болести одраслих пчела. Међутим у ветеринарској медицини подела се врши према етиологији. Заразне болести пчела се деле на вирусне, бактеријске, гљивичне и паразитске болести пчела ([4](#_ENREF_4)).

Америчка куга пчелињег легла је контагиозно обољење које представља јадан од највећих здравствених проблема пчелињих заједница. То је болест ларвеног стадијума медоносне пчеле и других подврста пчела, не и одраслих пчела. Узрочник болести је бактерија *Paenibacillus larvae spp. larvae*, која се јавља у вегетативном и спорогеном облику. Спада у групу заразних болести које се по закону, на територији Републике Србије обавезно пријављују. Због великог епизоотиолошког и економског значаја за пчеларство, болест је сврстана на листу нарочито опасних заразних болести животиња Светске канцеларије за епизоотије (ОIE) ([5](#_ENREF_5)).

У случају сумње на појаву америчке куге пчелињег, легла надлежна ветеринарска станица врши клинички прегед и узорковање на пчелињаку. Узорци се испитују у надлежној лабораторији, а у случају потврде болести налажу се законом прописане мере. Лечење оболелих друштава је строго забрањено, већ се према закону спроводе строге мере: затварање пчелињака, уништавања кошница са пчелама, уништавање осталог инфицираног и ризичног материјала, као и дезинфекција пчелињака и пчеларског прибора адекваним методама ([6-8](#_ENREF_6)).

# 2. ЦИЉ ДИПЛОМСКОГ РАДА

Циљ истраживања у оквиру овог дипломског рада је:

* да се на основу доступних података у актуелној литератури утврде фактори који доводе до настанка и ширења болести,
* да се утврде мере превентиве и сузбијања америчке куге пчелињег легла.

# 3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

Америчка куга пчелињег легла (*Pestis apium*) је перзистентно, прогресивно, контагиозно обољење које предстсвља један од највећих здравствених проблема пчелињих заједница. Болест карактеришу промене на поклопљеном леглу док одрасле пчеле не обољевају ([1](#_ENREF_1)). Узрочник болести је бактерија *Paenibacillus larvae spp. larvae*, раније названа *Bacillus larvae White*, која може продуковати и преко билион спора у инфицираној ларви. Споре су веома отпорне на физичко хемијске агенсе и у природним условима једино су споре инфективни облик узрочника.

Америчка куга пчелињег легла је присутна у свим крајевима наше земље, великом броју земаља на свим континентима, иако учесталост појављивања и распрострањеност болести варирају од земље до земље. С обзиром на велику контагиозност, учестало појављивање, брзо и лако ширење честа је појава епизоотија. Имајући у виду ширење болести у светским оквирима, болест је и панзоотског карактера ([5](#_ENREF_5)).

Након заражавања друштва у прво време нема изражених знакова болести. Због тога може проћи и неколико недеља, а да пчелар ни не примети да је друштво заражено. Тек после 25 дана, када се појаве промене на поклопљеном леглу, може се посумњати да је друштво оболело од америчке куге пчелињег легла. Живот пчела је кратак, а измена у друштву је веома брза, па се недостатак младих пчела брзо запажа. Друштво бројчано слаби и тако долази до његовог пропадања ([2](#_ENREF_2)).

У мере чији је циљ спречавање уношења болест спадају сви они општи превентивни поступци, чији је циљ спречавање уношења болести у незаражени пчелињак (редовни прегледи друштава, прегледи друштава код сеобе на пашу, обавезно испитивање купљених друштава, употреба стерилисаних сатних основа, преглед купљеног меда за прихрану пчела и сл.). Први и најважнији корак за сузбијање америчке куге је рано откривање болести од стране пчелара. Болест се не лечи већ се у случају појаве болести предузимају радикалне мере прописане законом ([5](#_ENREF_5)).

## 3.1. Историја болести

Најранији подаци о болестима пчела потичу још из доба пре нове ере, али није сасвим јасно које су то болести биле. Schirach je 1771. године употребио израз ,,куга легла“, за абнормално стање пчелињег легла, али се под овим називом подразумевало више од једне болести. 1882. године Dzierzin је закључио да постоје две врсте куге пчелињег легла. Cheshire је имао исто мишљење до августа 1884. али је до септембра дошао до закључка да постоји само једна. 1885. Cheshiere i Cheyne објавили су чланак који садржи резултате студија о куги пчелињег легла, а као узрочник се наводи *Bacillus alvei*. Након тога је више од једне деценије било опште прихваћено мишљење да постоји само једна врста куге легла чији је узрочник *B. alvei*. Касније је ова болест добила назив европска куга јер је први пут описана у Европи.

1903. године је White приметио да постоји још једна бактерија повезана са појавом куге пчелињег легла и назвао је *Bacillus larvae*, а болест је добила назив америчка куга пчелињег легла јер је истраживање вршено у држави New York у SAD. Каснијом рекласификацијом бактерија *Bacillus larvae* је добила назив *Paenibacillus larvae subspecies larvae* ([9](#_ENREF_9), [10](#_ENREF_10)).

## 3.2. Етиологија болести

Узрочник америчке куге пчелињег легла је бактерија *Paenibacillus larvae subspecies larvae,* чија је таксономска класификација:

Краљевство: *Bacteria*

Класа: *Bacilli*

Ред: *Bacillales*

Фамилија: *Paenibacillacae*

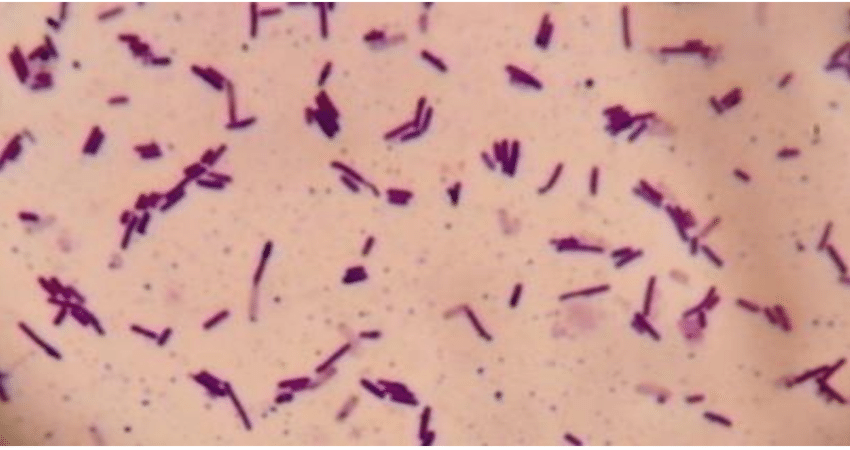
Род: *Panibacillus*

*Paenibacillus larvae* је Грам позитивна, каталаза негативна, спорогена, покретна бактерија. Може имати округао, раван облик са заобљеним крајевима или облик закривљеног штапића (Слика 1). Димензије вегетативног облика бактерије су 0.5-0,8µm ширине и 1,5-6µm дужине, а димензије споре су 0,6-1,3µm ([11](#_ENREF_11)).

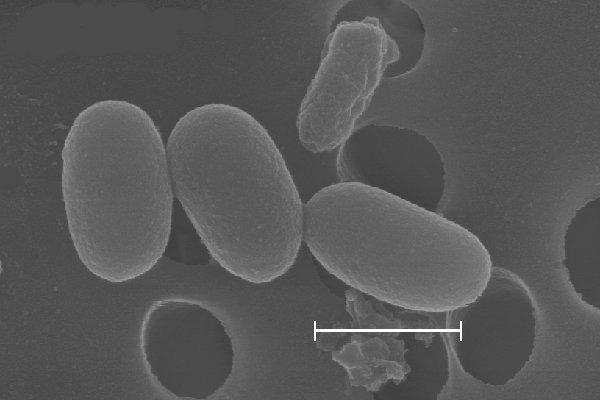
Споре су једини инфективни облик узрочника и њима се инфицирају младе, још не поклопљене ларве. Изузетно су отпорне на физичко-хемијске агенсе. Суспендоване у води издрже на 100ºC 11 минут, а у меду на истој температури пропадају за пола сата. Споре које се налазе у зараженом леглу издрже 8 сати на сувој топлоти од 100ºC, а у воску пропадају за 20 минута на 120ºC. Споре у меду ускладиштеном на прописан начин задржавају инфективну способност и до годину дана. Присутне у прополису, споре су отпорне на присуство алкохола и преко 45 дана. У природним условима у патолошком материјалу (остатци ларви, старо саће) задржавају инфективност и преко 30 дана (Слика 2.) ([5](#_ENREF_5)).

За разлику од спора вегетативни облици *Paenibacillus larvae* су доста осетљивији на дејство физичко-хемијских агенаса, дезифицијенаса и антибиотика ([5](#_ENREF_5)). Вегетативни облици бактерија су покретни захваљујући постојању бројних петрихијалних флагела ([9](#_ENREF_9)).

За микробиолошку култивацију користе се различите обогаћене селективне подлоге, а инкубација траје минимално два до четири дана на 37ºC у атмосфери са 5 до 10% CO2. Након субкултивисања, колоније на PLA подлози су мале , бледо зелене до жуте (исте боје као подлога), благо замућене и храпаве са уздигнутим центром. На MYPGP i J-агру, колоније су мале правилне, углавном храпаве, равне или уздигнуте, беличасте до беж боје. На CSA агру, колоније су мале, правилне, храпаве, жућкасто сивкасте боје, донекле провидне и благо блиставе. Описане су и колоније са наранџастом до црвеном пигментацијом, односно генотипови ERIC II и ERIC III, који продукују црвенкасто или наранџасто пигментисане колоније на MYPGP, CSA и J- агру ([11](#_ENREF_11)).



Слика 1. Вегетативни облици *Paenibacillus larvae subspecies larvae,* бојење по Граму, увеличање 1000 X ([12](#_ENREF_12)).



Слика 2. Споре *Paenibacillus larvae subspecies larvae*, SEM микроскопија, скала 1µm ([13](#_ENREF_13)).

## 3.3. Епизоотиологија и путеви преношења болести

Америчка куга пчелињег легла је заразна болест на листи болести обавезних за пријаву по Прогрму мера здравствене заштите животиња. Налази се на листи нарочито опасних заразних болести животиња Светске канцеларије за епизоотије (OIE). Брзо и лако се шири и одржава у пчелињацима ([1](#_ENREF_1)).

Географско порекло америчке куге пчелињег легла није познато, али је она распрострањена у скоро свим земљама света. Америчка куга пчелињег легла је највирулентнија бактеријска болест пчелињег легла. То је једна од болести које могу уништити цело друштво, а превенција и контрола представљају значајан проблем јер споре бактерија остају инфективне дуги низ година (35 и више) ([14](#_ENREF_14)).

Америчка куга пчелињег легла је већ дуже времена значајно присутна у пчеларству Србије. Права епизоотиолошка слика је практично непозната, али је обољење присутно на терену и има тенденцију даљег ширења. Овоме свакако доприносе недовољна стручна контрола пчелињака и обавезно спровођењ законских мера за откривање, сузбијање и искорењивање болести, а са дриге стране и неконтролисани промет пчелињих производа и меда, неконтролисана сеоба пчелињих друштава на веће пчелиње паше и неконтролисана употреба антибиотика. Сама чињеница да се контрола појаве болести базира на слободној вољи пчелара да заразу пријави, што се релативно ретко дешава, до тога да је рад ветеринара и ветеринарских инспектора на овој проблематици на терену скоро безначајна, као последицу има неповољну епизоотиолошку ситуацију. Појава америчке куге пчелињег легла у Србији у последњих двадесетак година кретала се од 3 до 20% и према званичним налазима дијагностичких лабораторија у Републици Србији болест није попримила значајније размере. Међутим последњих година према информацијама од пчеларских удружења и пчелара појединаца са терена, болест је значајно присутна у готово свим епизоотиолошким подручјима Републике Србије ([15](#_ENREF_15)).

Примарни извор болести су заражене, болесне и угинуле ларве, красте сасушених ларви, матична млеч, мед, полен, саће, рамови и унутрашње површине зидова кошнице. У једној зараженој ћелији саћа пчелињег легла може бити и преко билион спора, па отуда сваки рам саћа са болесним и зараженим леглом представља значајан извор заразе. Средња инфективна доза (доза која је способна да убије 50% ларви) неопходна за почетак инфекције је по неким податцима је само 8,48 спора у 24-48 часова старој пчелињој ларви. У ширењу болести унутар кошнице, примарну улогу имају младе пчеле (неговатељице, хранитељице и чистачице) које негују, хране и на крају чисте ћелије саћа од већ угинулих ларви и припремају их за полагање јаја матице. Вештачка ројења у друштвима где је матица контаминирана спорама, доводе до ширења болести. Иако је ово болест само затвореног легла, пчеле могу бити сејачи клица у току грабежи, а споре се налазе и у измету пчела ([5](#_ENREF_5)).

Болест се шири и сеобом пчела на пашу, купопродајом пчелињих друштава, употребом недезинфикованог пчеларског прибора, напајањем пчела на појилиштима и барицама које могу бити контаминиране изметом пчела са спорама. У ширењу болести значајну улогу играју други инсекти као што су муве, мрави и восков мољац. Неадекватно обрађене сатне основе, где је восак само претопљен без одговарајућег температурног третмана под притиском, нередовна замена саћа и прихрањивање пчела медом који у себи садржи споре *Paenibacillus larvae*, могу довести до ширења болести ([1](#_ENREF_1), [5](#_ENREF_5)).

Пчелар заразу може унети у пчелињак прихрањивањем пчела зараженим медом и стресањем пчела из болесне у здраву кошницу. Трутови такође могу бити преносиоци инфективних спора зато што слободно улазе у све кошнице. Пчеле могу ову болест преносити и када сакупљају мед из зараженог саћа, које се налази на отвореном месту или ако је већ изврцан мед који у себи садржи споре, а налази се на месту приступачном пчелама ([1](#_ENREF_1)).

У табели 1. налазе се податци о лабораторијској дијагностици америчке куге пчелињег легла на Одељењу за клиничку бактериологију, мокологију и паразитологију, Научног института за ветеринарство ,,Нови Сад“ у периоду од 2015. до 2020. године. На основу приложених података може се закључити да је на територији Војводине са које углавном и стижу узорци у ову лабораторију, америчка куга пчелињег легла значајно присутна и да је дијагноза потврђена сваке године у датом периоду. Такође се може закључити да је болест дијагностикована у готово свим месецима у години, али је најчешће дијагностикована у јесењим месецима. Ово се слаже са чињеницом да се у овим месецима активно спроводи јесењи преглед пчелињих друштава и зазимљавање пчела. Такође у овом периоду године матице почињу да смањују лежење јаја, па преостаје заражено легло које се лакше препознаје.

Табела 1. Подаци о лабораторијској дијагностици америчке куге пчелињег легла на Одељењу за клиничку бактериологију, микологију и паразитологију, Научног института за ветеринарство ,,Нови Сад“ у периоду од 2015. до 2020. године.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Година** | **Месец** | **Општина** | **Бр. узорака** | **Налаз** |
| 2015. | јануар | Беочин | 20 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| април | Ниш | 3 | ***P. larvае поз.*** X3 |
| Беочин | 1 | *P. larvеa* нег. |
| јун | Нови Сад | 20 | *P. larvеa* нег. |
| 2016. | март | Нови Сад | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| април | Сремски Карловци | 10 | *P. larvеa* нег. |
| јун | Бачка Паланка | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| Бачка Паланка | 80 | ***P. larvае поз.*** X8 |
| Бачка Паланка | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| Бачка Паланка | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| јул | Нови Сад | 2 | ***P. larvае поз.*** X2 |
|  | Нови Сад | 2 | ***P. larvае поз.*** X2 |
| август | Сремска Митровица | 50 | ***P. larvае поз.*** X5 |
| септембар | Србобран | 12 | ***P. larvае поз.*** X11 |
| 2017. | октобр | Бачка паланка | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| 2018. | април | Бачки Петровац | 40 | *P. larvеa* нег. |
| октобар | Бачка Паланка | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| мај | Нови Сад | 10 | *P. larvеa* нег. |
| август | Ириг | 20 | ***P. larvае поз.*** X2 |
| Нови Сад | 10 | *P. larvеa* нег. |
| Земун | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| Ириг | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| септембар | Ириг | 10 | *P. larvеa* нег. |
| Беочин | 10 | *P. larvеa* нег. |
| децембар | Нови Сад | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| 2019. | фебруар | Нови Сад | 20 | *P. larvеa* нег. |
| Рума | 20 | *P. larvеa* нег. |
| мај | Бачка Паланка | 40 | ***P. larvае поз.*** X4 |
| Бачка Паланка | 230 | ***P. larvае поз.*** X23 |
| јун | Бачка Паланка | 50 | ***P. larvае поз.*** X5 |
| јул | Нови Сад | 20 | *P. larvеa* нег. |
| Нови Сад | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| август | Нови Сад | 100 | ***P. larvае поз.*** X6 |
| Фекетић | 10 | *P. larvеa* нег. |
| Руменка | 10 | *P. larvеa* нег. |
| октобар | Бач | 10 | *P. larvеa* нег. |
| 2020. | август | Петроварадин | 10 | ***P. larvае поз.*** X1 |
| Бачка Паланка | 60 | ***P. larvае поз.*** X6 |
| септембар | Бачка Паланка | 60 | ***P. larvае поз.*** X60 |
| децембар | Нови Сад | 10 | *P. larvеa* нег. |

## 3.4. Патогенеза болести

Споре представљају заразни облик бактерија. Посредством пчела неговатељица споре долазе у храну младих пчела, то јест у матичну млеч за исхарну младих ларви и мешавину меда и полена којим се хране старије ларве у отвореном леглу. Ларве се инфицирају конзумирањем спора присутних у њиховој храни. Повољни услови делују на спору и она почиње да клија у вегетативни облик, расте и размножава се у леглу и доводи до угинућа ларве ([1](#_ENREF_1)).

Милиони спора су потребни да би се инфицирале ларве старије од два дана, али за инфекцију ларви старости до 24 сата довољна је инфективна доза мања од 10 спора, према OIE податцима износи 8,49 ± 1,49 ([11](#_ENREF_11), [14](#_ENREF_14)).

Споре из контаминиране хране којом су храњене ларве клијају у лумену средњег црева. Код старијих ларви је клијање спорије него код млађих па бактерије немају времена да пређу у вегетативни облик и да стигну до епитела, већ бивају избачене са фецесом. Ако споре исиклијају, вегетативне бактеријске ћелије се размножавају у лумену средњег црева и крећу се кроз перитрофичну мембрану. Старије ларве такође имају дебљу перитрофичну мембрану која може да представља већу баријеру за кретање бактерија. Након тога бактерије продитру у епител средњег црева фагоцитозом и одатле се крећу у хемолимфу и остале органе ларве. Ова системска бактеријемија се јавља код ларве старости приближно 234 часова. Након смрти ларве због настанка неповољних услова за вегетативни облик бактерија, поново се стварају бактеријске споре. У једној распаднутој ларви формира се око 2,5 x 109 спора ([10](#_ENREF_10)).

Током инфекције пчелиње ларве излучују екстрацелуларну протеиназу која има карактеристике имуних инхибитора. Ова протеиназа, која се ослабађа током спорулације бактерије, може да инхибира активност апидецина (једног од имуних протеина пчела). Међутим улога протеиназе у патогенези америчке куге пчелињег легла још увек је нејасна ([10](#_ENREF_10)).

Цревни тракт одраслих пчела има микробиом који се састоји од релативно малог и устаљеног броја бактерија. Ове бактерије су потенцијални конкуренти резвоју инфекције са *Paenibacillus larvae.* Код младих ларви коменсални микробиом у дигестивном тракту још није развијен, те су због тога подложније инфекцији ([16](#_ENREF_16)).

Након угинућа ларве, бактерије настављају своју деструктивну активност деградацијом остатка угинуле ларве, до браонкастог, полутечног, колоидног детритуса, налик на лепак. Касније се овај детритус исушује и остаје краста која чврсто пријања уз доњи зид ћелије. Овакви остатци ларви представљају извор инфекције за даље ширење болести ([16](#_ENREF_16)).

## 3.5. Клиничка слика

Клинички занци болести су разноврсни и зависе од присутног генотипа, стадијума болести и јачине пчелињег друштва. Ларве могу угинути у раном добу када се сакупљају у дну ћелија непоклопљеног легла. Одрасле пчеле уклањају угинуе ларве након чега остаје празна, али инфицирана ћелија. Неке ларве могу угинути у каснијем стадијуму развоја, када су у усправном положају и испуњавају већи део челије саћа. Обично ларве или лутке угињавају након затварања легла ([11](#_ENREF_11)).

Нису сва пчелиња друшта једнако осетљива на заразу америчке куге легла, што се објашњава хигијенским понашањем пчела, односно способности пчела радилица да брзо открију и уклоне угинуле ларве из ћелија саћа и тако елиминишу извор заразе и успоре прогресију болести ([17](#_ENREF_17)).

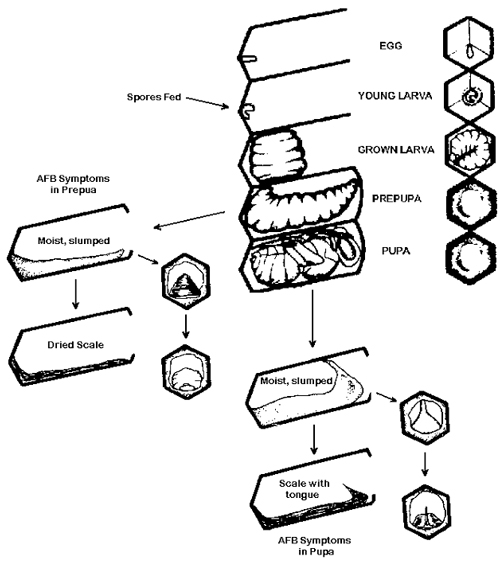
На зараженим ларвама у отвореном леглу не запажају се никакве промене. Кратко време после поклапања саћа настају промене у боји, грађи и конзистенцији ларви. У изгледу саћа запажају се неправилно распоређене, раштркане поклољене ћелије (Слика 3.). С обзиром да је америчка куга искључиво болест поклопљеног легла, први клинички знаци болести се уочавају на поклопљеним ћелијама ([5](#_ENREF_5)).

Најчешће три недеље по заражавању долази до промене боје, распореда легла и целовитости воштаних поклопаца ([5](#_ENREF_5)). Одмах по поклапању ћелија инфицираних ларви и престанку њихове исхране (обично шестог дана), споре исклијавају у вегетативне облике и преко ендотелних ћелија улазе у хемолимфу и остале органе ларве ([1](#_ENREF_1)). Поклопци ларви које су заражене у почетку попримају жућкасту боју лимуна, а већ после неколико дана постају тамнији све до тамно мрке боје. Поклопци постају наквашени, улегнути односно конкавни и перфорирани како инфекција напредује (Слика 4.). Како процес напредује ларва губи седефасти сјај и постепено поприма жићкасту боју. За недељу дана после смрти, ларва добија сувожућкасту боју, све до светлосмеђе боје. У следећих недељу дана ларва пада на доњу страну ћелије, постаје лепљиве конзистенције и могже се растезати у нити дужине око 2-2,5cm помоћу дрвеног штапића (Слика 5.) ([14](#_ENREF_14)). Ова маса има карактеристичан мирис туткала. Три до четири недеље после смрти, остатак ларве има изразито смеђу боју и још више постаје растегљив. На поклопцима се уочавају ситне рупице, неправилних ивица, распоређене обично по ободу, а последица су рада пчела које чисте саће и избацују угинуле ларве. Цео овај процес траје 5 до 8 недеља. У јесен када матица престаје да полаже јаја, промене на поклопцима су најизраженије јер остаје само болесно легло ([5](#_ENREF_5)).

Месец дана или више након што ларва постане растегљива, остатци болесног легла се исушују формирајући типичне тврде, тамне красте које су крхке и снажно пријањају на дну ћелије саћа. Ако се смрт догоди у стадијиуму лутке, осушена маса се у облику језичка протеже до врха ћелије. Истурен језичак је један од карактеристичних знакова америчке куге пчелињег легла, мада се ретко виђа (Слика 6) ([11](#_ENREF_11)).

Слика 3. (лево) Неправилно распоређено поклопљено легло ([18](#_ENREF_18)).

Слика 4. (десно) Улегнути, тамни и перфорирани поклопци на зараженом леглу ([18](#_ENREF_18)).



Слика 5. (лево) Садржај ћелије који се растеже ([19](#_ENREF_19))

Слика 6. (десно) Шематски приказ напретка промена у зараженој ћелији код америчке куге пчелињег легла ([20](#_ENREF_20))

Иако одрасле пчеле не обољевају, пчелиње друштво у целини слаби због поремећаја у замени генерација пчела. Живот пчеле је кратак и у летњим данима износи 42 дана. Старије пчеле изумиру, али истовремено не настају нове генерације младих пчела, због чега долази до сталног слабљења заједнице и на крају угинућа. У таквим друштвима често долази до појаве грабежи, појаве восковог мољца, а све то доприноси даљем ширењу заразе.

## 3.6. Дијагноза

У циљу постизања ефикасне превенције и контроле болести, веома је важна правовремена и тачна дијагноза. Прегледом друштва на основу клиничке слике и анамнестичких података, поставља се сумња на болест. Микробиолошка детерминација узрочника се врши нативним препаратом бојеним по Giemsa и култивисањем на хранљивим подлогама, као и молекуларном дијагностичком PCR методом ([1](#_ENREF_1)).

Дијагноза се поставља након идентификације патогена у присуству клиничких знакова болести. Карактеристични клинички симптоми обухватају раштркано легло са удубљени воштаним поклопчићима тамне боје који су назубљено перфорирани. Остатци ларве формирају колоид карактеристичне боје, конзистенције и мириса. У каснијим стадијумима када дође до исушивања овог колоида формирају се карактеристични језичци и красте. На основу налаза ових симптома, искусан клиничар може да постави дијагнозу. Међутим имајући у виду резлике у вируленцији између различитих генотипова узрочника, постављање тачне дијагнозе само на основу клиничких симптома је упитно. Због тога је неопходно доказивање присуства узрочника у лабораторији ([16](#_ENREF_16)).

На основу правилника о мерама за сузбијање и искорењивање заразних болести пчела, пчелиње легло се сматра зараженим америчком кугом пчелињег легла ако се клиничким преглоедом утврде промене карактеристичне за ту болест, а дијагностичким испитивањем утврди *P. larvae* као узрочник боелсти. Дијагностичком испитивању, које се врши у за то одређеној специјалистичкој организацији , подлежу све пчелиње заједнице за које се посумња на заразу. Контролно дијагностичко испитивање на америчку кугу пчелињег легла врши се у септемру или октобру, у свим пчелињацима у којима је та зараза утврђена ([7](#_ENREF_7)).

### 3.6.1. Узорковање материјала за преглед

У случају проналаска сумњивог легла као узорак за лабораторијско испитивање узима се цео рам са поклопљеним леглом најбоље из плодишта. На овај начин се избегава оштећење саћа и контаминација узорка ([11](#_ENREF_11)). Као алтернативни узорак може се узети и исечак саћа са поклопљеним леглом величине 10x10cm, односно површине око 20cm2 ([1](#_ENREF_1), [11](#_ENREF_11)). Узорак се пакује у папир и затим ставља у картонску кутију. Паковање и слање материјала у пластичним врећицама, алуминијумској фолији, воштаном папиру, лименим и стакленим посудама треба избегавати, јер ови материјали могу оштетити узорак и учинити га неподесним за преглед ([5](#_ENREF_5)). За слање узорка на анализу неопходан је упут Републичког Ветеринарског инспектора или ординирајућег ветеринара. Слање се обавља што хитије у најближу ветеринарску дијагностичку установу ([1](#_ENREF_1)).

Искусна особа може сакупити заражене остатке ларви директно из ћелија саћа помоћу стерилног бриса. На овај начин се значајно смањује величина узорка и олакшава паковање и транспорт узорка у лабораторију. Метода микроскопског прегледа бриса остатка оболелих ларви може се урадити и на самом пчелињаку. Након сушења на ваздуху брисеви се пакују и шаљу у лабораторију на микроскопски преглед и култивацију ([11](#_ENREF_11)).

Осим узорка пчелињег легла, као узорак се може послати мед, полен, одрасле пчеле радилице и восак у којима се могу доказати споре *Paenibacillus larvae.* Узорци се могу сакупити и из ћелија саћа са леглом, помоћу једнократних стерилних кашика како би се спречила унакрсна контаминација међу узорцима. Приликом узорковања меда који би требао бити што ближе леглу, треба имати у виду да је он можда месециима био поклопљен пре момента узорковања, па се због тога могу добити погрешни резултати каснијег испитивања. Узорци одраслих пчела се могу прикупити стресањем или четкањем са рамова у пластичну кесу или посуду. Како би се добили што веродостојнији резултати треба узорковати одрасле пчеле са рамова из плодишта, а не из медишта. Воштани дебрис се може узорковати са дна кошнице, односно подњаче током целе године ([11](#_ENREF_11)).

### 3.6.2. Паковање и транспорт узорака у лабораторију

Узорке саћа треба умотати у лист папира, папирну кесу или новине и ставити у дрвену или чврсту картонску кутију за транспорт. Треба избегавати било који облик пластичне амбалаже како би се спречио развој гљивица. Брисеви остатка ларви се стављају у одговарајуће епрувете са чепом. Размази мртвих ларви на стакленим предметним стаклима стављају се у појединачне држаче који су комерцијално доступни. Узорци одраслих пчела се током транспорта могу држати замрзнути или потопљени у 70% етил алкохолу у непропусним посудама, ипак је сушени узорак пчела адекватнији. Величина узорка не би требала да буде мања од 30 пчела. Узорци меда се стављају у ерпувету, одговарајућу посуду или се заједно са кашиком пакују у пластичне кесице. Мора се спречити цурење и унакрсна контаминација узорака. Ако је могуће, свеж материјал за лабораторијско испитивање треба послати у фрижидеру ([11](#_ENREF_11)).

Остатци кошнице и восак треба умотати у папир или ставити у пластичне посуде и прекрити папиром. Секундарна амбалажа се састоји пластичне кесе као заштите од унакрсне контаминације. У случају великог броја узорака, они се могу чувати и у терцијерном паковању (велике картонске кутије) које штити узорке од механичких оштећења ([11](#_ENREF_11)).

### 3.6.3. Припрема узорака за култивацију

Како је *Paenibacillus larvae* спорогена бактерија, изолацији из биолошких узорака претходи обрада узорка у воденом купатилу како би се убили вегетативни микроорганизми. Овај корак занчајно смањује могућност да изолација *Paenibacillus larvae* буде прикривена растом других бактерија конаминената узорка. Пошто споре *Paenibacillus larvae* исклијавају, а вегетативни облици бактерије се размножавају у пчелињој ларви, већина сојева слабо расте на храљивим подлогама. Због тога су развијене различите хранљиве подлоге за култивацију ове бактерије ([21](#_ENREF_21)).

Узорци се прво припремају у воденој суспензији. Ова суспензија спора подвргава се топлотном шоку на температури од 80ºC током 10 минута или на 95-96ºC током 3-5 минута. Различити генотипови бактерије показују варијације у способности клијања и њиховог одговора на обраду топлотом ([11](#_ENREF_11)).

Могуће је директно засејавање узоркованог материјала ако је у питању брис ларве асептично узет из ћелије саћа без претходне обраде у воденом купатилу. Узорци ларви се сакупљају стакленим штапићм, а затим се суспендују у 5-10ml стерилне воде или стерилног физиолошког раствора (0,01М PBS или 0,9% NaCl). Размази на предметним плочицама се могу расртворити у 2-3 капи стерилне воде ([11](#_ENREF_11)).

Узорци меда се загревају на 45-50 ºC, а затим се протресе како би се распоредиле евентуално присутне споре. Затим се узорци разблажују у размери 1/1 са 0,01М PBS или 0,9% NaCl и преносе у епрувете. Узорци се центрифугирају на 6000g током 40 минута. Супернатант се одбацује остављјући око 3ml у епрувети. Седимент се затим меша магнетном мешалицом да би се поново суспендовао. Након тога се узорак може засејати на хранљиву подлогу. Могуће је и директно засејати узорак меда без претходне обраде, али је осетљивост ове методе значајно инфериорнја ([11](#_ENREF_11)).

Узорак полена у количини од 1g може се распршити у 10ml стерилне воде или 0,01М NaPBS pH 7.2 и филтрирањем кроз Whatman No. 1 папир ([11](#_ENREF_11)).

Ако је узорак одраслих пчела чуван у 70% етил алкохолу, потребно га је пре дробљења декантирати и разредити стерилном водом или физиолошким раствором ([11](#_ENREF_11)).

Узорке воска је потребно растворити у 10ml толуена, хлороформу или диетил етру. Затим се 2ml течног дела расвори у 6ml физиолошког раствора. Након интензивног мешања добијена суспензија се може директно засејати без обраде топлотом. Други протокол подразумева да се восак разреди у води у односу 1/10 и загреје на 90ºC током 6 минута. Након хлађења додаје се водени раствор органског растварача (1/9) и смеса се пажљиво протресе. Након 2 минута стајања ствара се талог воденог раствора који садржи споре *Paenibacillus larvae* ([11](#_ENREF_11)).

### 3.6.4. Култивација

Припремљени узорци се засејавају на хранљиве подлоге и инкубирају у атмосфери са 5-7% CO2 на температури од 37+1ºC 2-4 дана, а у случају узорка меда дуже, најмање 6 до 15 дана. У току инкубације узорци се свакодневно прегледају, а колоније би требале да постану видљиве након најмање два дана ([11](#_ENREF_11)).

Описано је неколико медијума за култивацију *Paenibacillus larvae.* Најбољи резултати су постигнути са **PLA** (Paenibacillus larvae agar), **MYPGP** агар, **BHIT** агар (brain–heart infusion medium supplemented with thiamine), **J**-агар и **CSA** (Columbia sheep-blood agar).

**PLA** агар (Paenibacillus larvae agar) је селективна подлога у чијем саставу се налази комбинација три различита медијума уз додатак антибиотика и жуманцета .

**MYPGP** агар, скраћеница се односи на његов састав: Mueller-Hinton бујон, екстракт квасца (yeast extract), калијум фосфат (potassium phosphate), глукозу и пируват (pH 7.1).

**BHIT** агар (brain–heart infusion medium supplemented with thiamine) се сатоји од инфузионог раствора мозга и срца (pH 6.6 са HCl). након загревања на 50 ºC и хлађења додаје му се стерилни раствор тиамин хидрохлорида.

**J**-агар се сатоји од триптона, екстракта квасца, K2PO4, глукозе и агра (pH7.3-7.5).

**CSA** агар (Columbia sheep-blood agar) састоји се од 39 g Columbia крвног агра (pH 7.3). Након аутоклавирања и хлађења на 50 ºC додаје се 5% стерилне дефибринисане крви.

MYPGP агар се рутински користи за култивацију *Paenibacillus larvae* јер има највећи проценат исклијавања спора, док Ј агар, BHIT и CSA агар имају мањи проценат исклијавања. PLA агар има врхунску селективност јер инхибира већину микроорганизама који су нормално присутни у кошници и пчелињим производима. Ако култивацију отежава појава гљивица у подлогу се може додати антимикотик Amphotericin B у концентрацији од 16.8 μg/ml ([11](#_ENREF_11)).

### 3.6.5. Идентификација колонија *Paenibacillus larvae*

На PLA агру колоније *Paenibacillus larvae* су мале, бледозелене до жуте (исте боје као агар), са благо непрозирном и храпавом површином. Централни део је некад уздигнут.

На MYPGP и Ј агру колоније су мале, правилне, углавном храпаве, равне или уздигнуте, беличасте до беж боје (Слика 6.).

На CSA агру колоније су мале, правилне, храпаве, боје маслачка или сивкасте, помало прозирне и благо светлуцаве (Слика 6.).

Култивација нe може самостално да послужи за постављање дијагнозе, али уз рекултивацију израслих колонија, која на крају даје чисте колоније, представља добру основу за остале методе идентификације *Paenibacillus larvae* ([11](#_ENREF_11)).



Слика 6. Колоније *Paenibacillus larvae* на MYPGP агру (лево) и CSA агру (десно), након 72 сата инкубирања на 37ºC у атмосфери са 5% CO2 ([22](#_ENREF_22)).

### 3.6.6. Микроскопска идентификација *Paenibacillus larvae*

За микроскопију се користе две технике бојења. Бојење по граму, које се ради на размазима бактерија из изолованих колонија. *Paenibacillus larvae* је Gram позитивна бактерија. Бојење карбол фусцином по Ziehl-Neelsen-у се користи на размазима спора на основу чије морфологије се може поставити дијагноза. За детаљније испитивање облика и положаја спора и исклијавања користи се Schaeffer-Fulton метода бојења ([11](#_ENREF_11)).

### 3.6.7. Биохемијски тестови за доказивање *Paenibacillus larvae*

Након култивације се изводи низ биохемијских тестова који служе за сигурно постављање дијагнозе. Бактерије *Paenibacillus larvae*  су каталаза негативне, или слабо позитивне након стајања, имају типичан профил ферментације угљених хидрата са производњом киселине из глукозе и трехалозе, али не из арабинозе и ксилозе. Такође хидрилизују казеин или млеко. Резултати неких испитивања варирају унутар генотипова, као на пример ферментација манитола или салицина ([11](#_ENREF_11)).

### 3.6.8. Ланчана реакција полимеризације (PCR)

PCR метода се може користити за сигурну идентификацију *Paenibacillus larvae*  након култивације на хранљивим подлогама. Ова метода захтева добро опремљену лабораторију, а реагенси потребни за извођење реакције су комерцијално доступни. PCR метода има за циљ да након припреме узорка докаже специфични редослед нуклеинских киселуна у генетском материјалу бактерија. Углавном се користе прајмери за 16S rRNA за које постоје доступне базе података. Прајмер 5' AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC 3' је упоређен са свим познатим базама података и показује 100% хомологију само на *Paenibacillus larvae* ([23](#_ENREF_23)).

## 3.7. Диференцијална дијагноза

У диференцијалној дујагнози треба узети у обзир друге болести легла, као што су мешинасто легло, европску кугу пчелињег легла и варозу ([5](#_ENREF_5)).

Мешинасто легло је болест вирусне етиологије (flaviviridae/flavivirus), углавном бенигног карактера где не долази до преображаја пчелињих ларви у лутке. За разлику од специфичних промена код америчке куге легла, код мешинастог легла се испод поклопаца налази мртва сиво-смеђа ларва, која се лако извлачи из ћелије и има облик мешине. Уколико је процес старији услед исушивања, ларва се претвара у красту, а глава и задњи део тела се савијају па иста има облик чуна ([1](#_ENREF_1), [5](#_ENREF_5)).

Европска куга пчелињег легла је болест и отвореног и затвореног легла, код које се угинућа ларви дешавају и у једном и у другом случају. Ларве су жућкасте боје, често надувене, млитаве до кашасто воденасте конзистенције, приликом извлачења из ћелије кида им се хитински омотач. Услед сушења ларве губе белу боју, седефаст сјај, сегментирност, не трансформишу се у лутке, а пчеле их лако избацују из кошнице ([1](#_ENREF_1), [5](#_ENREF_5)).

Ако се при пролећном прегледу нађе угинуло пчелиње друштво, са затвореним неизлеженим леглом, а у кошници има доста хране, постоји дилема да ли се ради о варози или амричкој куги легла. Међутим детаљним прегледом легла код варозе се по отварању поклопаца у ћелији запажа формирана ларва или лутка са једним или више паразита. Код америчке куге легла нема формираних развојних облика larvi , већ се код млађих процеса проналази аморфна лепљива, растегљива маса светлосмеђе боје до боје чоколаде, док је код старијих процеса маса сасушена и формира красту на дну ћелије (карактеристика процеса старијих од два месеца) ([1](#_ENREF_1), [5](#_ENREF_5)).

## 3.8. Терапија болести

Терапија не постоји, а лечење у нашој земљи је забрањено. Када се обољење потврди, морају се поштовати мере прописане законом. Иако је ово бактеријска болест антибиотска терапија заправо има штетно дејство јер овакав третман неможе да излечи болест, већ само прикрива знакове болести и омогућава даље ширење заразе. Антибиотици се немогу користити ни у превентивне сврхе ([1](#_ENREF_1)).

У појединим земљама је дозвољена употреба антибиотика у превенцији и лечењу америчке куге пчелињег легла. Међутим у новије доба се почео појављивати проблем антимикробне резистенције *Paenibacillus larvae* на тетрациклин. При томе за превентиву болести препоручује се континуирана апликација антибиотика кроз шећерни сируп или погачу ([24](#_ENREF_24)). Овакав третман за последицу има појаву резидуа антибиотика у пчеллињим производима, а нарочито меду који није погодан за исхрану људи. Са друге стране мед који потиче из заражених кошница је неупотребљив и из епизоотиолошких разлога јер ће манипулацијама у току вађења, врцања и конзумирања доћи до ширења инфекције, а споре могу непромењене пасирати живи организам ([5](#_ENREF_5)).

## 3.9. Спречавање болести

У мере чији је циљ спречавање појаве болести спадају сви они општи превентивни поступци, чији је циљ спречавање уношења болести у незаражени пчелињак. Под овим мерама се подразумева:

* редован преглд друштава,
* преглед друштава код сеобе на пашу,
* пчеларење на адекватним просторима и одговарајућим теренима,
* обавезан преглед испитивање купљених друштава, ројева и матица,
* избегавање спајања слабих и јаких друштава
* редовна замена и употреба стерилисаних сатних основа,
* преглед купљеног меда за прихрањивање пчела,
* индивидуално коришћење пчеларског прибора и опреме,
* хигијена напајалишта на пчелињаку,
* текућа дезинфекција
* Придржавање законске регулативе везане за пчеларство

У пчелињацима у којима није била потврђена болест треба извршити детаљан преглед легла у пролеће. Између прегледа друштава треба вршити дезинфркцију прибора. У случају да се пчелињак налази у близини другог пчелињака где је болест потврђена неопходна је редовна и пажљива контрола и преглед друштава. Ако се у једном друштву у пчелињаку открије америчка куга легла морају се прегледати сва друштва, као и друштва у пчелињацима који се налазе у полупречнику од три километра. У случају сумње пчелара на појаву америчке куге пчелињег легла дужан је да без одлагања о томе обавести надлежну ветеринарску службу или ветеринарску инспекцију, те да се у даљем току спроведу законом прописане мере ([5](#_ENREF_5), [8](#_ENREF_8)).

## 3.10. Законска регулатива

Америчка куга пчелињег легла пчеларству наноси велике директне и индиректне штете, па је због тога њено спречавање, сузбијање и искорењивање регулисано законским и подзаконским актима.

Власници и држаоци пчела дужни су да се старају о здрављу и добробити истих, односно предузимају зоосанитарне и биосигурносне мере како из домаће, тако и из европске законске регулативе:

* Закон (Закон о ветеринарству (Сл. гласник РС 91/2005))
* Правилник (Правилник о мерама за сузбијање заразних болести пчела (Сл. лист СФРЈ 6/88))
* Правилник (Правилник о утврђивању програма мера здравствене заштите животиња, који се доноси сваке године за текућу годину)
* Зоосанитарни кодекс (*OIE Manual*) међународне организације за заштиту животиња (*OIE*) са седиштем у Паризу
* Одлуке комисије CE (*Commission Decission*) 2003/881/EC
* Упутство савета CE (*Council Directive*), 92/65/EЕC

Наведени законски акти предвиђају предузимање законом прописаних мера ради сузбијања и искорењивања инфективних и паразитских болести пчела и пчелињег легла у случају следећих болести :

* Акароза (*Acarosis of bees*)
* Америчка куга пчелињег легла (*American foulbrood*)
* Европска куга пчелињег легла (*European foulbrood*)
* Ноземоза (*Nosemosis of bees*)
* Варооза (*Varrosis of bees*)
* Тропилелоза (*Tropilaelaps clareae*) ([5](#_ENREF_5))

**Правилником о мерама за сузбијање и искорењивање заразних болести пчела** предвиђа се следеће:

Члан 2: Пчелиње легло сматра се зараженим америчком кугом пчелињег легла ако се клиничким прегледом утврде промене карактеристичне за ту болест, а дијагностичким испитивањем утврди *B. larvae* као узрочник ове болести.

Члан 3: Дијагностичком испитивању, које се врши у за то одређеној специјалистичкој ветеринарској организацији удруженог рада, подлежу све пчелиње заједнице за које се посумња на заразу из члана 2. овог правилника.

Контролно дијагностичко испитивање на америчку кугу пчелињег легла врши се у септембру или октобру, у свим пчелињацима у којима је та зараза утврђена.

Члан 4: Ако се у пчелињаку утврди америчка куга пчелињег легла, наредиће се следеће мере:

1. затварање зараженог пчелињака;
2. уништавање свих заражених кошница са непокретним саћем, заједно са пчелама и саћем;
3. уништавање свих дотрајалих кошница, без обзира на тип израде, заједно са пчелама и саћем;
4. уништавање зараженог саћа и пчела из заражених кошница спаљивањем и закопавањем, с тим да се прибор и кошнице дезинфикују;
5. забрана држања пчелињих заједница без матица и спречавање ројења пчела у зараженом пчелињаку;
6. дезинфекција пчелињака и пчеларског прибора који се користи при извршавању мера наређених у зараженом пчелињаку одговарајућим дезинфекционим средством или, зависно од материјала, опаљивањем.

Члан 5: У свим пчелињим заједницама, у полупречнику од три километра око зараженог пчелињака, врши се дијагностичко испитивање на америчку кугу пчелињег легла.

Члан 6: Сматра се да је америчка куга пчелињег легла у зараженом пчелињаку престала ако су спроведене све наређене мере из члана 4. овог правилника. У том пчелињаку мора се извршити контролно дијагностичко испитивање два месеца после спровођења наређених мера ([7](#_ENREF_7)).

**Правилник о утврђивању програма мера здравствене заштите животиња за 2021. годину** ( донешен на основу члана 51. став 1. Закона о ветеринарству („Службени гласник РС”, бр. 91/05, 30/10, 93/12 и 17/19 – др. закон)) :

На газдинствима у којима је у 2020. години утврђена америчка куга пчелињег легла, извршиће се активни надзор у току априла 2021. године, који укључује клинички преглед свих пчелињих заједница, као и оних које се налазе у кругу пречника 3 km од зараженог пчелињака. У случају сумње на болест, извршиће се узорковање и дијагностичко испитивање у надлежном институту. Клинички преглед и узорковање врши овлашћења ветеринарска станица.

На газдинствима за узгој и продају матица, овлашћена ветеринарска станица врши клинички преглед свих пчелињих заједница у пролеће и јесен. Ако се утврди постојање сумње на болест, узима се службени узорак из пчелињих заједница и доставља у надлежну лабораторију ради прегледа на америчку кугу пчелињег легла. Свака сумња се потврђује лабораторијским анализама са проценом старости процеса.

На преглед се доставља службени узорак посебно узет из сваке појединачне сумњиве пчелиње заједнице, и то комад саћа са поклопљеним леглом, величине 10 cm x 10 cm на коме су знаци болести добро видљиви, спакован у одговарајућу амбалажу.

Средства за клинички преглед и дијагностичка испитивања из става 1. овог пододељка, средства за накнаду штете која је настала уништавањем кошница после утврђивања америчке куге пчелињег легла у складу са Законом о ветеринарству, ако патолошки процес није старији од два месеца, дезинфекцију зараженог пчелињака и уништавање зараженог роја пчела обезбеђена су у буџету Републике Србиј ([8](#_ENREF_8)).

**Зоосанитарни кодекс** (*OIE Manual*) међународне организације за заштиту животиња (*OIE*) у поглављу 3.2.2. описује америчку кугу пчелињег легла и прописује правила за њену сигурну дијагностику што је већ образложено у оквиру етиологије, паогенезе, клиничке слике и дијагнозе болести. Поред тога у поглављу 9.2. обухвата правила за одређивање статуса земаља и зона у погледу присуства заразе, као и препоруке приликом увоза пчела и пчеларског репроматеријала.

Статус неке земље или зоне у погледу ризика од америчке куге пчелињег легла може се утврдити само након разматрања следећих критеријума:

1. Да је извршена процена ризика којом су идентификовани сви потенцијални фактори за појаву америчке куге легла и њихова историјска перспектива;
2. Америчка куга легла се пријављује у целој земљи или зони, а сви сумњиви случајеви се подвргавају испитивању;
3. Постоји стални програм едукације како би се подстакло пријављивање у свим случајевима који сугеришу на америчку кугу легла;
4. Ветеринарска служба или други надлежни органи имају актуелно знање и ауторитет над свим пчелињим заједницама.

Потребно је да прође 5 година од последњег регистрованог случаја америчке куге легла уз редовно спровођење мониторинга да би нека земља или зона добила статус слободне од болести ([11](#_ENREF_11)).

**Препоруке OIE-а приликом увоза:**

Увоз **живих матица, пчела радилица и трутова са и без легла**, одобрава се након што ветеринарска инспекција утврди у међународној ветерихарској потврди:

1. да пчеле потичу са пчелињака који се налазе у земљи или зони слободној од америчке куге пчелињег легла или
2. да се пошиљка састоји само од пчела без припадајућег легла и да потичу са пчелињака који испуњава услове прописане у члану 4.15.5, те да се пчелињаци са којих потичу налазе у центру подручја у радијусу од три километра где у последњих 30 дана није било избијања америчке куге легла.

Увоз **пчелињих ларви и лутки**, може се одобрити ако се на основу међународне ветринарске потврде утврди да:

* 1. Потичу са пчелињака који се налазе у земљи или зони слободној од америчке куге пчелињег легла или
  2. су изоловани од матица у карантинској станици, а све пчеле радилице које су пратиле матицу или репрезентативан узорак легла буду испитани на присуство *P. larvae* бактериолошком изолацијом или PCR методом у складу са OIE приручником.

Увоз **пчеларске опреме**, може се одобрити ако се на основу међународне ветринарске потврде утврди да:

* 1. потичу са пчелињака који се налазе у земљи или зони слободној од америчке куге пчелињег легла или
  2. је стерилисан под надзором ветеринарске инспекције једним од следећих поступака: зрачењем са 10 килогреја, потапањем у 1% натријум хипохлорит у трајању од најмање 30 минута, потапањем најмање 10 минута у парафински восак загрејан на 160ºC или било којим поступком једнаке ефикасности признатим од старне надлежне ветеринарске службе земље увознице.

Увоз **меда, полена, пчелињег воска, прополиса и матичног млеча за употребу у пчеларству**, може се одобрити ако се на основу међународне ветринарске потврде утврди да:

1. потичу са пчелињака који се налазе у земљи или зони слободној од америчке куге пчелињег легла или
2. су озрачени са 10 килогреја или обрађени неком другом методом еквивалентне ефикасности који признаје надлежна ветеринарска служба земље увознице
3. је утврђено да нема спора *P. larvae* на основу метода препоручених од стране OIE-a.

Увоз **меда, полена, пчелињег воска, прополиса и матичног млеча за људску исхрану**, може се одобрити ако се на основу међународне ветринарске потврде утврди да:

1. потичу са пчелињака који се налазе у земљи или зони слободној од америчке куге пчелињег легла или
2. су обрађени на начин који осугурава уништавање и вегетативних и спорогених облика *P. larvae* или обрађени неком другом методом еквивалентне ефикасности који признаје надлежна ветеринарска служба земље увознице ([25](#_ENREF_25)).

За успешну превенцију , односно сузбијање и искорењивање америчке куге пчелињег легла, неопходно је спровођење биосигурносних, зоотехничких и зоосанитарних мера:

1. пчеларење на адекватни просторима и теренима
2. пчеларење у адекватним кошницама које се пре насељавања пчела морају дрзинфиковати
3. употреба стерилисаних сатних основа
4. лабораторијска контрола сатних основа
5. пчеларење јаким друштвима и са довољно хране
6. обезбеђивање адекватног пчелињег гнезда са добром вентилацијом;
7. пчеларење са младом и плодном матицом
8. присуство појилица на пчелињаку
9. пажња код куповине ројева, матица и меда за прихрану пчела, односно редован преглед истих
10. пажња код прихватања ,,дивљих“ ројева
11. не спајати слаба и јака друштва
12. редован преглед пчелињих друштава и замена саћа
13. текућа дезинфекција у току радова на пчелињаку
14. рано откривање болести
15. лабораторијска дијагностика
16. stamping-out (нешкодљиво уништавање-спаљивање) у случају појаве болести
17. спровођење законске регулативе у пчеларењу ([5](#_ENREF_5)).

# 4. ЗАКЉУЧАК

1. Америчка куга пчелињег легла је заразна, прогресивна болест затвореног пчелињег легла изазвана са Грам позитивном бактеријом *Paenibacillus larvae subspecies larvae*.
2. Раширена је на готово свим просторима где се држе пчеле, а значајно је присутна и у нашој земљи. Наноси велике директне и индиректне штете у пчеларству и обавезна је за пријаву.
3. Сврстана је на листу нарочито опасних заразних болести животиња Светске канцеларије за епизоотије (OIE). Лечење је строго забрањено, а према важећој законској регулативи у случају потврде болести обавезно је уништавање заражених друштава и опреме која адекватним поступцима дезинфекције не може бити оспособљена за даљу употребу.
4. Добра пчеларска пракса и превентивне мере доприносе смањењу појаве америчке куге пчелињег легла.

# 5. ЛИТЕРАТУРА

1. Плавша Н, Павловић И. Болести пчела. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, 2017;43-68.

2. Тодоровић В, Тодоровић Д. Практично пчеларство, седмо допуњено издање. Неолит, Београд, 1990; 374-379.

3. https://pcelarenje.com/wp-content/uploads/2020/09/Pcelarstvo-u-Srbiji-Ivanov.pdf, . Новембар , 2021.

4. Јанковић А. Пчелињи производи као храна и лек, Београд, 1979; 10-15.

5. Матовић К, Жаркоић А, Дебељак З. Америчка куга пчелињег легла. Краљево, 2007; 4-26.

6. Стојанац Н. Законски прописи у ветеринарској медицини. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, 2017; 124-125.

7. Правилник о мерама за сузбијанје и искорењивање заразних болести пчела (,,Сл. лист СФРЈ", бр. 6/88).

8. Правилник о утврђивању програма мера здравствене заштите животиња за 2021. годину (Сл. гласник бр. 36/21).

9. White G.F. American foulbrood. US Department of Agriculture, Washington, D.C., 1920; 2-39.

10. Hensen H, Juul C. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. Bee World 80, 1999; 5-18.

11. OIE manual. American foulbrood of honey bees (infection of honey bees with Paenibacillus larvae). Chapter 3.2.2, 2016; 719-731.

12. https://[www.researchgate.net/figure/Vegetative-form-of-Bacillus-rod-shaped-and-thin-at-1000-magnification-Gram-positive\_fig2\_279854464](http://www.researchgate.net/figure/Vegetative-form-of-Bacillus-rod-shaped-and-thin-at-1000-magnification-Gram-positive_fig2_279854464). Новембар , 2021.

13. <http://www.vetbact.org/popup/image.php?imgtable=vetbact_images&imgid=256>. Новембар , 2021.

14. Alippi A.M. Bacterial deseases. Colin M.E. (ed.), Ball B.V. (ed.), Kilan i M. (ed.). Bee disease diagnosis. Zagoza: CIHEAM, 1999; 31-46.

15. Плавша Н, Стојанов И, Миланов Д, Петровић Ј. Америчкa кугa пчелињег легла-епизоотиолошка ситуација и значај раног откривања болести. Arhiv veterinarske medicine, vol. 1, br. 2, 2008; 43-50.

16. Genersch E. Paenibacillus larve and American Foulbrood - long since know and still surprising. Institute for Bee Research, Hohen Neuendorf, Germany, 2008; 430-433.

17. Аврам З. Пчеларење за 21. вијек - Високопродуктивно пчеларство. Сарајево, 1998; 15-30, 138-244.

18. https://beeaware.org.au/archive-pest/american-foulbrood/#ad-image-0. Новембар , 2021.

19. https://afb.org.nz/ropiness-test/. Новембар , 2021.

20. https://afb.org.nz/infected-development/ Новембар , 2021.

21. Dirk C, Alippi A.M, Antúnez K, AronsteinK, Budge G, Koker D, Smet L, Dingman D, Evans J, Foster L, Fünfhaus A, Garcia-Gonzalez E, Gregore A, Human H, Murray D, Nguyen B, Poppinga L, Spivak M, Engelsdorp D, Wilkins S, Genersch E. Standard methods for American foulbrood research. Journal of Apicultural Research, 2013; 3-13.

22. Osama S. Mahdi, Nathan A Fisher. Growth and Laboratory Maintenance of Paenibacillus larvae. Department of Microbiological Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, Southern Research Institute, Frederick, Maryland, 2018; 4-5.

23. GOVAN V.A, ALLSOPP M.H, DAVISON S. A PCR Detection Method for Rapid Identification of Paenibacillus larvae. Department of Microbiology, University of the Western Cape, Bellville 7535, Plant Protection Research Institute, Agricultural Research Council, Stellenbosch 7599,2 South Africa, 1999; 2243-2245.

24. Plavša N, Stojanović D, Stojanov I, PuvačaN, Stanaćev V, Đuričić B. Evaluation of oxytetracycline in the prevention of American foulbrood in bee colonies. African Journal of Agricultural Research Vol. 6(6), pp. 1621-1626, 18 March, 2011, 2011; 1621-1325.

25. OIE manual. Infestion of honey bee with Paenibacillus larve (American foulbrood). Chapter 9.2., 2021; 1-3.