

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2021/8



ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra	V4-1804		
Naslov	Ugotavljanje poti širjenja hude gnilobe čebelje zalege z genetsko tipizacijo sevov povzročitelja bolezni		
Vodja	24296 Darja Kušar		
Naziv težišča v okviru CRP	1.2.2. Ugotavljanje poti širjenja hude gnilobe čebelje zalege z genetsko tipizacijo sevov povzročitelja bolezni		
Obseg efektivnih ur raziskovalnega dela	939		
Cenovna kategorija	C		
Obdobje trajanja	11.2018 - 10.2020		
Nosilna raziskovalna organizacija	510	Univerza v Ljubljani	
	406	Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta	
Raziskovalne organizacije - soizvajalke			
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4	BIOTEHNIKA	
	4.04	Veterina	
	4.04.02	Animalna patologija in epizootiologija	
Družbeno-ekonomski cilj	08.	Kmetijstvo	
Raziskovalno področje po šifrantu FORD	4	Kmetijske vede in veterina	
	4.03	Veterina	

2. Sofinancerji

	Sofinancerji		
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP)	
	Naslov	Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Huda gniloba čebelje zalege (HGČZ) sodi med najhujše bolezni čebel. Povzroča jo sporogena bakterija *Paenibacillus larvae*. Za uspešno zatiranje HGČZ je najučinkovitejši ukrep uspešno preprečevanje širjenja bolezni. Okoli na novo odkritega žarišča bolezni se uvede zapora v polmeru 3 km (kužni krog), dokler se klinično ne pregledajo vse čebelje družine in se žarišče sanira. Če se ugotovi novo žarišče, se kužni krog ustrezno razširi.

V okviru projekta smo analizirali retrospektivno (iz let 2017 in 2018) in prospektivno (iz leta 2019) pridobljene izolate *P. larvae* iz izbruhov HGČZ v Sloveniji; izvirali so iz medu in zalege. Doprinosi projekta so: (i) podatki pridobljeni iz **anketnega vprašalnika** z a čebelarje in veterinarje, s katerim smo pridobili natančen vpogled v čebelarsko prakso pri nas; (ii) vpeljava masne spektrometrije **MALDI-TOF** za identifikacijo izolatov *P. larvae*, kar je znatno skrajšalo čas bakteriološke preiskave; (iii) razvoj molekularnega testa **qPCR** (PCR v realnem času) za zanesljivo štetje spor *P. larvae* v čebeljih vzorcih, ki smo ga umerili z digitalnim PCR, da omogoča absolutno kvantifikacijo. Klinično pozitivne družine so imele značilno več spor kot klinično negativne. Primerjava rezultatov s števeno gojiščno preiskavo je pokazala na slabo (0,52%) in nekonsistentno (0,04–6,05%) kalitev spor *P. larvae*; (iv) vpeljava metode **ERIC-PCR** za tipizacijo *P. larvae*, tipizacija velikega števila izolatov ($n=583$) ter uporaba kapilarne elektroforeze za analizo pomnožkov. Ugotovili smo, da v Sloveniji prevladuje tip ERIC II (70,2%); (v) vpeljava metode **WGS** (sekvenciranje celotnih genomov) za opredelitev izbruhov HGČZ. Razvili smo stabilno shemo wgMLST (tipizacija na osnovi zaporedij lokusov celotnega genoma) za *P. larvae*, ki je sedaj implementirana v programu BioNumerics in omogoča standardizirano bioinformacijsko obdelavo podatkov WGS. Določili smo okvirno mejo med genetsko povezanimi (klonalnimi) izolati *P. larvae* (≤ 35 alelov wgMLST) in odkrili nov sekvenčni tip (ST30). Z obsežnim sekvenciranjem izolatov *P. larvae* ($n=202$) smo znatno povečali število genomskih zaporedij v javno dostopnih podatkovnih bazah.

V okviru projekta smo ugotovili, da je velikost kužnega kroga ustrezna, če iščemo prenose *P. larvae* zaradi naravne aktivnosti čebel. Prenos istih klonov na razdaljah, ki močno presegajo preletno razdaljo čebel, pa je bila posledica prevozov, najverjetneje bolnih čebeljih družin. Ker je bilo potrjenih več takih primerov, predlagamo uvedbo veterinarskih kliničnih pregledov družin pred prevozom. Ker smo na posameznih področjih ugotovili na razdalji, ki je bistveno manjša od 3 km, dva ali več nesorodnih klonov povzročitelja, ki jih ne bi odkrili brez uvedbe zapore in pregleda vseh čebelnjakov, predlagamo uvedbo rednega monitoringa za odkrivanje in sanacijo žarišč HGČZ še pred pojavom ali prijavo kliničnih znakov.

ANG

American foulbrood (AFB) is one of the most devastating honeybee diseases. It is caused by the spore-forming bacterium *Paenibacillus larvae*. The most efficient measure for AFB control is to prevent its spread. A 3-km embargo zone (AFB zone) is established around a newly detected AFB outbreak, until all honeybee colonies are clinically inspected and the outbreak sanitized. If a new outbreak is detected, the zone is expanded accordingly.

In the scope of the project, we analyzed *P. larvae* isolates collected retrospectively (2017, 2018) and prospectively (2019) from AFB outbreaks in Slovenia; they originated from honey and brood. Contributions of the project are: (i) **questionnaire** data obtained from beekeepers and veterinarians, giving a detailed insight into the beekeeping practices; (ii) implementation of **MALDI-TOF** mass spectrometry for the identification of *P. larvae* isolates, making bacteriological examination much faster; (iii) development of molecular **qPCR** (real-time PCR) assay to reliably enumerate *P. larvae* spores in bee-related samples. To enable absolute quantification, qPCR was calibrated by digital PCR. AFB-positive colonies had significantly higher spore counts than AFB-negative. Comparison of the results with plate counting revealed poor (0.52%) and inconsistent (0.04–6.05%) *P. larvae* spore germination; (iv) implementation of **ERIC-PCR** for the typing of *P. larvae*, typing of a large set of isolates ($n=583$) and the use of capillary electrophoresis for amplicon analysis. In Slovenia, ERIC II (70.2%) was shown to predominate; (v) implementation of the whole-genome sequencing (**WGS**) for *P. larvae*, enabling delineation of AFB outbreaks. We developed a stable whole-genome multilocus sequence typing (wgMLST) scheme for *P. larvae*, which is now implemented in BioNumerics software and enables standardization of WGS data bioinformatic analysis. We determined the approximate threshold (≤ 35 alleles wgMLST) to detect clusters of genetically closely related (clonal) isolates and discovered a novel sequence type (ST30). By sequencing a large set of *P. larvae* isolates ($n=202$), we considerably increased the number of genomic sequences deposited in the publicly available databases.

The size of AFB zone was shown as large enough to detect transmission of *P. larvae* due to honeybee activities. Detection of the same clones at distances far beyond the flight distance of honeybees resulted from transportation, most probably of the diseased honeybee colonies. Since several such cases were confirmed, we suggest introducing veterinary clinical examinations of colonies before transport. Since we identified the presence of two or more unrelated *P. larvae* clones in some areas at distance much less than 3 km, which would not be discovered without the establishment of embargo zones and inspection of corresponding apiaries, we suggest introducing regular monitoring to detect and sanitize AFB outbreaks already before the appearance or reporting the clinical symptoms.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta²

Projekt V4-1804 (1.11.2018–30.11.2020) je bil razdeljen v štiri delovne sklope (DS1: Pregled stanja v Sloveniji glede hude gnilobe čebelje zalege [HGČZ] in evidentiranje posameznih izbruhov, DS2: Bakteriološka preiskava zalege in medu, DS3: Tipizacija izolatov *P. larvae* in molekularna kvantifikacija *P. larvae* v medu, DS4: Priprava smernic), časovno pa v štiri faze (1–4).

V prvi fazi (DS1+DS2) smo v okviru **epizootiološkega poizvedovanja o vplivih različnih dejavnikov na pojavnost HGČZ** (i) pripravili anketni vprašalnik za čebelarje in veterinarje specialiste za zdravstveno varstvo čebel; (ii) vzpostavili podatkovno bazo (Excel) za izolate *P. larvae* in pripadajoče epizootiološke podatke, ki smo jih dopolnili z geografskimi koordinatami čebelnjakov za namen prikaza izbruhov HGČZ v Sloveniji (s programom Microreact); ter (iii) izvedli vzorčenje za leto 2019 skupaj z anketiranjem. Vzorčenje je potekalo v skladu z nadzorovanjem HGČZ v Sloveniji, nabor izolatov pa smo v nekaterih primerih razširili. Pri anketnem poizvedovanju so sodelovali tako čebelarji s HGČZ-pozitivnimi čebelnjaki kot čebelarji z negativnimi. Veterinarji so razmere čebelarjenja ocenili, podobno kot čebelarji, kot dobre ali srednje v približno polovici primerov, medtem ko so higieno in izvajanje biovarnostnih ukrepov v čebelnjaku ocenili nekoliko slabše kot čebelarji. Veterinarji so ocenjevali tudi prisotnost različnih kliničnih znakov. Ugotavljali smo statistično značilne razlike med HGČZ-pozitivnimi in negativnimi čebelnjaki in tudi glede na ugotovljeni tip ERIC.

Iz pridobljenih vzorcev smo **izolirali povzročitelja *P. larvae***, izolate pa smo identificirali do vrste in shranili v interni zbirki pri -70°C . Za identifikacijo *P. larvae* smo **vpeljali masno spektrometrijo MALDI-TOF**. Po validaciji z referenčnimi sevi tipov ERIC I–IV smo večje število slovenskih izolatov iz let 2017 in 2018 identificirali tako po klasični fenotipski metodi kot z MALDI-TOF. Ker so bili rezultati skladni, MALDI-TOF sedaj rutinsko uporabljamo tudi za *P. larvae*, kar je močno skrajšalo preiskavo.

V projekt smo zajeli izolate *P. larvae* iz let 2017 ($n=120$), 2018 ($n=146$) in 2019 ($n=247$). K naboru smo dodali še 70 izolatov iz posebej odbranega pozitivnega medu iz HGČZ-pozitivnega čebelarstva s tremi čebelnjaki za proučevanje raznolikosti *P. larvae* na različnih nivojih (med/čebelja družina, čebelnjak, čebelarstvo). Nabor je skupno vseboval 583 (513+70) izolatov *P. larvae* (ob prijavi predvidenih vsaj 500). Izolati so pripadali kužnim krogom, nekateri pa so bili odbrani glede na lokacijo (da je analiza pojavljanja tipov ERIC v grobem zajela celotno Slovenijo) ali pridobljen tip ERIC (da so bili v projekt zajeti vsi ugotovljeni tipi ERIC v zadostnem številu, vključno s tistimi ERIC I, ki so izkazovali nekoliko spremenjen profil prog) in so torej pripadali sporadičnim primerom.

V drugi fazi (DS3) smo **vpeljali metodo qPCR (PCR v realnem času) za kvantifikacijo *P. larvae* v vzorcih medu (in drobirja)**, ker tak test za zanesljivo kvantifikacijo še ni bil na voljo. Najprej smo izdelali specifične začetne oligonukleotide in sonde; kot tarčo smo izbrali gen za metaloproteinazo, ki se pojavlja v eni kopiji na genom *P. larvae*. Nato smo optimizirali sestavo reakcijske mešanice in program pomnoževanja. Metoda je izkazovala 100% ekskluzivnost in inkluzivnost, tako *in silico* kot *in vitro*. Za namen validacije smo iz pozitivnega medu (in dodatno drobirja) izolirali DNA v treh bioloških replikatih ter pripravili 5-kratno redčitveno vrsto, vsako redčitev pa s qPCR analizirali v treh tehničnih replikatih. Validacija je pokazala na odsotnost vpliva inhibitorjev na pomnoževanje tarčne DNA. Za podajanje vrednosti LOD (meja detekcije) in LOQ (meja kvantifikacije) v številu spor *P. larvae* na enoto vzorca smo metodo qPCR umerili z metodo dPCR (digitalni PCR), ki temelji na podobnem principu, omogoča pa absolutno kvantifikacijo tarče. Za *P. larvae* je bila metoda dPCR prvič uporabljena. Po umerjanju smo ugotovili, da je LOD testa qPCR 8 spor/g medu ali 188 spor/ml drobirja, LOQ pa 58 spor/g medu ali 707 spor/ml drobirja, kar kaže na zelo dobre lastnosti testa.

Za **ugotavljanje povezave med številom spor v medu in klinično slike HGČZ v panju** smo z novo metodo qPCR analizirali 69 vzorcev medu, ki so izvirali iz družin z različno izraženimi kliničnimi znaki ($n=41$) ter klinično negativnih družin ($n=28$). Vse vzorce smo kvantificirali tudi s števno gojiščno preiskavo. Primerjava je pokazala, da metoda qPCR omogoča zanesljivo štetje spor *P. larvae* v medu, štetje na gojiščih pa je primerno predvsem za potrjevanje prisotnosti *P. larvae*; faktor kalitve spor je bil nizek (0,52%) in je imel širok razpon (0,04–6,05%). Metoda qPCR je vedno pokazala večje število spor: med iz klinično pozitivnih družin je vsebovali >10 spor/g po števni metodi in >1000 spor/g s qPCR. Med iz klinično negativnih družin je vsebovali značilno manjše število spor. Čeprav se je pri obeh metodah kazal trend večjega števila spor z večjo intenziteto kliničnih znakov, te razlike niso bile značilne. V prihodnje bomo metodo preizkusili še na vzorcih odraslih čebel negovalk (del prijave podoktorskega projekta B. Papića).

Za namen tipizacije smo vpeljali **metodo ERIC-PCR za *P. larvae***. Med vpeljavo smo primerjali dva načina za izolacijo DNA iz kultur *P. larvae* ter ugotovili, da hitra izolacija s segrevanjem, ki je sicer v splošni rabi za bakterijske kulture, ni ustrezna za ERIC-tipizacijo. Izkazalo se je tudi, da morfologija kolonij ni dovolj zanesljiva za določanje tipa ERIC. Metodo smo povzeli po objavljenem protokolu, potrebna pa je bila optimizacija (koncentracija reagentov, tip polimeraze). Za detekcijo produktov smo kot prvi uporabili kapilarno elektroforezo (Qiaxcel), ki za razliko od agarozne elektroforeze omogoča zelo dobro razlikovanje med profili ERIC in njihovo primerjavo.

za namen ugotavljanja tipov ERIC v slovenskem tipiranem celotnem naboru izolatov *P. larvae* iz let 2017–2019 ($n=583$). Proti pričakovanjem se je izkazalo, da v Sloveniji prevladuje tip ERIC II (70,2%), sledi pa mu ERIC I. Zaradi velikega števila analiziranih izolatov in dobre detekcije s kapilarno elektroforezo smo odkrili dva nekoliko spremenjena profila ERIC I, za katera pa se je po tipizaciji z WGS izkazalo, da ne predstavljata novih (pod)tipov ERIC. Njun biološki pomen ostaja neraziskan (del prijave podoktorskega projekta B. Papića). Po analizi 70 izolatov *P. larvae* iz medu in 16 izolatov iz spremenjene zalege iz izbranega čebelarstva s tremi HGČZ-pozitivnimi čebelnjaki smo ugotovili, da so vsi pripadali tipu ERIC II. Izbrane izolate (26 iz medu, 14 iz zalege) smo za ugotavljanje raznolikosti *P. larvae* na različnih nivojih zato tipizirali še z metodo WGS.

V tretji fazi projekta (DS3) smo vpeljali **tipizacijo WGS za *P. larvae*** (sekvenciranje celotnih genomov). Zaradi cenejše izvedbe sekvenciranja (v sekvencijskem centru) in zaradi pridobitve dodatnega vira financiranja (raziskovalni program P4-0092) smo nabor izolatov *P. larvae* za tipizacijo z WGS (202/583) lahko iz predvidenih 100 povečali na 202, kar je velikega pomena za opredeljevanje izbruhov HGČZ. Izbrali smo več izbruhov, za katere so bili na voljo dobri epidemiološki podatki, in znotraj teh odbrali izolate za tipizacijo WGS, sekvencirali pa smo tudi izolate iz omenjenega HGČZ-pozitivnega čebelarstva za ugotavljanje genetske raznolikosti *P. larvae* na različnih nivojih. V nabor izolatov smo zajeli vse statistične regije, celotno obdobje (2017–2019), oba tipa vzorcev (med in zalega), čim večje število čebelnjakov znotraj kužnega kroga in vse ugotovljene profile tipov ERIC.

Za namen analize rezultatov WGS smo skupaj s podjetjem Applied Maths, ki vzdržuje program BioNumerics, **izdelali bioinformacijsko shemo wgMLST** (whole-genome multilocus sequence typing) za *P. larvae*. Program že uporabljamo za tipizacijo drugih bakterijskih patogenov (z WGS, prej PFGE), omogoča pa celovito analizo WGS, če je na voljo shema za proučevani organizem. Shema za *P. larvae* je sedaj na voljo vsem uporabnikom programa BioNumerics (med NRL-ji v splošni uporabi/obvezen) ter zaradi harmonizacije analize omogoča primerjavo rezultatov. V razvoj sheme smo vključili 51 slovenskih izolatov ter vsa javno dostopna zaporedja genomov *P. larvae* ($n=128$), s čimer smo pridobili vpogled v genetsko raznolikost vrste, ki je bila do sedaj slabo poznana. S sekvenciranjem večjega števila izolatov *P. larvae* ($n=202$) smo znatno dopolnili tudi število genomskih sekvenc *P. larvae* v javno dostopnih podatkovnih bazah. Ugotovili smo, da iz podatkov WGS lahko zanesljivo napovemo tudi tip ERIC in sekvenčni tip; odkrili smo nov tip ST30. Na podlagi velikega števila analiziranih izolatov smo določili okvirno genetsko mejo med izolati (≤ 35 alelov wgMLST), s katero lahko zanesljivo zamejimo gruče genetsko povezanih (klonalnih) izolatov ter s tem opredelimo izbruhe in poti prenosa HGČZ. Ko smo analizirali raznolikost izolatov *P. larvae* znotraj istega čebelarstva, smo ugotovili, da raznolikost znotraj čebelarstva dosežemo že v posameznem čebelnjaku ter da je genetska raznolikost *P. larvae* dokaj visoka na vseh preiskovanih nivojih, kar je potrebno vzeti v ozir pri interpretaciji rezultatov WGS.

Ob koncu projekta smo lahko **analizirali izbruhe HGČZ** v Sloveniji z vsemi pridruženimi podatki epizootiološkega poizvedovanja. Ugotovili smo 16 različnih gruč (klonov) bakterije *P. larvae*. Večina gruč je bila geografsko omejenih, nekatere pa so poleg geografsko bližnjih izolatov vključevale tudi izolate iz zelo oddaljenih regij. Za vsakega od ugotovljenih klonov *P. larvae* smo identificirali prvi čebelnjak, pri katerem je bila HGČZ potrjena, od tega pa izračunali razdalje do sosednjih čebelnjakov s klinično potrjeno boleznijo, ki so se nahajali v polmeru <10 km in imeli isti klon *P. larvae*; največja razdalja do sosednjega čebelnjaka je bila 2632 m. To kaže, da 3-km kužni krog uspešno zaobjame naravni prenos HGČZ z aktivnostjo (preletom) čebel, prenos na večje razdalje pa je posledica človeške aktivnosti kot je prevoz okuženih čebeljih družin na oddaljeno pašo ali zaradi prodaje. Ker smo znotraj kužnih krogov odkrili tudi nesorodne seve *P. larvae*, smo potrdili možnost mešanih (multiklonalnih) izbruhov HGČZ; ker smo slednje odkrili zaradi odrejenega pregleda čebelnjakov znotraj zapore, to kaže na prisotnost čebelnjakov s prikrito, neprepoznano ali neprijavljeno HGČZ.

V četrti fazi (DS4) smo pripravili **priporočila za omejitev širjenja HGČZ**:

- (i) spremeniti izdajanje dovoljenj za premike čebel z uvedbo občasnih veterinarskih kliničnih pregledov prevoznih čebel in okrepiti uradni nadzor nad premiki v skladu z veljavnim pravilnikom (tako bi bolne čebele hitro izločili iz prometa, hkrati pa motivirali čebelarje, da si pridobijo ustrezno znanje in sami izvajajo redne preglede čebeljih družin);
- (ii) uvesti redni monitoring medu (ali drobirja/čebel negovalk) na prisotnost spor *P. larvae* ter klinični pregled čebeljih družin na osnovi pozitivnih rezultatov na celotnem ozemlju Slovenije za zgodnje odkrivanje HGČZ in s tem preprečevanje njenega širjenja (možnost zmanjšanja kužnega kroga);
- (iii) strogo upoštevati načela dobre čebelarke prakse, predvsem izvajanje tehnoloških ukrepov za izločanje spor *P. larvae* iz panjev (menjava satja, pretresanje čebel, čiščenje in razkuževanje) in preprečevanje širjenja okužbe (higienski ukrepi pri delu v čebelnjaku, pravilno ravnanje z roji, premiki zdravih čebeljih družin, uporaba lastne opreme in orodja).

Rezultate smo predstavili: (i) objavili smo dva znanstvena članka (povzeto v točki 7) ter s prispevki sodelovali na več znanstvenih kongresih (povzeto v točkah 8 in 9). En znanstveni članek (raznolikost *P. larvae* na različnih nivojih) je v recenziji, en pa pred oddajo (qPCR za kvantifikacijo spor *P. larvae* v vzorcih medu in drobirja); (ii) povzetke rezultatov smo predstavili strokovni in laični javnosti na 'zoom' zaključni predstavitvi projekta v januarju

2021 ter na več strokovnih srečanjih (povzeto v točki 8, dosežek št. 5).
--

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Cilji projekta so bili realizirani v celoti, določene pa smo tudi nadgradili (cilja iii in v):

(i) **Cilj:** Za **izolate *P. larvae*** (vsaj 500) iz let 2017–2019 iz celotne Slovenije sestaviti **podatkovno zbirko** s pridruženimi epizootiološkimi podatki ter za izolate iz leta 2019 pripraviti tudi **anketni vprašalnik** za pridobivanje usmerjenih podatkov.

Doprinos: V projekt smo vključili 583 izolatov *P. larvae*, s pripadajočimi metapodatki zbranimi v interni Excelovi bazi. Z anketnim poizvedovanjem smo pridobili veliko relevantnih podatkov.

Realizacija: v celoti

(ii) **Cilj:** V bakteriološko diagnostiko vpeljati identifikacijo *P. larvae* z masno spektrometrijo **MALDI-TOF**.

Doprinos: Za determinacijo *P. larvae* smo vpeljali MALDI-TOF, kar je znatno skrajšalo čas bakteriološke preiskave.

Realizacija: v celoti

(iii) **Cilj:** Izdelati test in vpeljati metodo **qPCR** za hitro in zanesljivo **kvantifikacijo** spor *P. larvae* v vzorcih medu, metodo umeriti z **dPCR** ter ugotoviti morebitno **povezavo med številom spor in kliničnimi znaki HGČZ** v čebeljih družinah.

Doprinos: Razvili smo specifičen test qPCR za kvantifikacijo spor *P. larvae* v medu (vpeljali tudi za vzorce drobirja), ki smo ga umerili z dPCR. Med iz klinično pozitivnih družin je imel značilno več spor (>1000/g medu s qPCR), ni pa bilo značilnih razlik glede na jakost izražene klinične slike. Ugotovili smo nizek faktor kalitve spor (0,52%) z velikim razponom (0,04–6,05%).

Realizacija: v celoti (več: metoda vpeljana za vzorce drobirja)

(iv) **Cilj:** Vpeljati tipizacijo *P. larvae* z metodo **ERIC-PCR** ter tipizirati večje število izolatov (vsaj 500) iz let 2017–2019 za ugotavljanje pojavnosti tipov ERIC v Sloveniji.

Doprinos: Vpeljali smo ERIC-PCR za *P. larvae*, kapilarno elektroforezo za analizo pomnožkov ter tipizirali 583 izolatov *P. larvae*. Odkrili smo, da v Sloveniji prevladuje tip ERIC II, zato ga je bilo več tudi med izolati iz izbruhov.

Realizacija: v celoti

(v) **Cilj:** Vpeljati metodo **WGS** za tipizacijo *P. larvae*, ugotoviti poti širjenja klonov *P. larvae* v Sloveniji ter postaviti genetsko mejo za opredelitev genetsko povezanih (klonalnih) izolatov, ki so udeleženi v izbruhih.

Doprinos: Vpeljali smo WGS za bakterijo *P. larvae*, WGS-tipizirali 202 izolata *P. larvae* in na novo razvili shemo wgMLST, ki je sedaj vključena v BioNumerics in omogoča standardizirano bioinformacijsko analizo. Opredelili smo globalno populacijsko strukturo *P. larvae* in določili okvirno genetsko mejo za ugotavljanje klonalnih izolatov (≤ 35 alelov wgMLST). Znatno smo povečali število genomov *P. larvae* v javno dostopnih podatkovnih bazah.

Realizacija: v celoti (več: sekvenciranje 202 izolatov namesto predvidenih 100, postavitev bioinformacijske sheme wgMLST)

(vi) **Cilj:** Posodobiti **priporočila** za omejitev širjenja HGČZ.

Doprinos: Ugotovili smo, da je velikost kužnega kroga zaenkrat ustrezna, predlagali priporočila ter uvedbo rednega monitoringa čebeljih vzorcev na prisotnost spor *P. larvae*.

Realizacija: v celoti

6. Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine⁴

Cilji projekta so bili doseženi v celoti, v nekaterih delih tudi preseženi, prav tako smo dopolnili projektno skupino s štirimi člani, ena članica (Mateja Pate) pa je skupino zapustila zaradi zamrznitve statusa o zaposlitvi. V zadnjem letu trajanja projekta smo v skupino vključili Tanjo Knific (evidenčna številka ARRS 38142), ki je raziskovalka na Veterinarski fakulteti (VF) in strokovnjak za statistične analize. Še pred vključitvijo v skupino je sodelovala pri pripravi anketnega vprašalnika za čebelarje in veterinarje, ob koncu projekta pa pri statistični obdelavi pridobljenih anketnih rezultatov, kar bi brez vključitve v skupino znatno preseglo njeno neformalno sodelovanje. V zadnjem letu projekta smo v skupino kot tehnične sodelavke vključili tudi Anito Vraničar Novak (54378), Alenko Jurić (54379) in Suzano Skerbiš (54415), zaposlene na VF–NVI na področju zdravstvenega varstva čebel, da so pomagale pri pridobivanju epidemioloških podatkov in interpretaciji projektnih rezultatov; ugodno je bila razrešena tudi naša prošnja, da se zaradi zamude, ki jo je povzročila koronavirusna zapora, obdobje trajanje projekta podaljša (za en mesec, tj. do 30.11.2020). Tekom trajanja projekta se je tudi spremenil status enemu članu skupine (Bojan Papić; sprememba iz MR v R, ker je tekom projekta uspešno zagovarjal doktorsko disertacijo in se nato na VF zaposlil kot raziskovalec z doktoratom).

Program dela se tekom trajanja projekta ni spremenil, prišlo pa je do nekaterih razširitev/dopolnitev:

(i) Za tipizacijo WGS smo izbrali več izolatov ($n=202$) kot predvideno na začetku ($n=100$). Zaradi izvedbe sekvenciranja, ki je v komercialnih sekvencijskih centrih znatno cenejša, ter zaradi možnosti pridobitve dopolnilnega vira financiranja smo nabor izolatov za WGS lahko razširili. Tipizacijska metoda WGS namreč izkazuje največjo možno moč razlikovanja med proučevanimi izolati, zato je bistvena za opredelitev izbruhov hude gnilobe čebelje zalege (HGČZ). Povečanje nabora izolatov predstavlja pomemben doprinos za opredeljevanje izbruhov.

(ii) Postavili smo stabilno wgMLST bioinformacijsko shemo za *P. larvae* v sodelovanju s podjetjem AppliedMaths, ki razvija uveljavljen programski paket BioNumerics (za tipizacijo bakterijskih patogenov in vzpostavitev podatkovne baze izolatov). Shema wgMLST za *P. larvae* do izvajanja projekta še ni bila na voljo; brez nje bi bila bioinformacijska analiza zaporedij WGS tudi možna, a z uporabo programov, ki temeljijo na uporabi Linux ukazne vrstice, pridobljeni rezultati pa se ne bi mogli primerjati z rezultati drugih študij, ker uporaba poenotene nomenklature genotipov in analitskih algoritmov ne bi bila možna. Shema je olajšala delo tako za projekt kot za druge raziskovalce; pripravili smo znanstveno objavo glede postavitve in uporabo sheme. Shema omogoča primerjavo *P. larvae* v globalnem merilu.

(iii) Metodo qPCR za kvantifikacijo spor *P. larvae* smo validirali tudi za vzorce drobirja (v planu so bili samo vzorci medu). V teku je priprava znanstvene objave, ki bo opisala pripravljen test qPCR ter kvantifikacijo tako v medu kot drobirju.

(iv) Za namen statističnih analiz (anketni vprašalnik) smo k analizi dodali tudi 17 brisov zalege, ki so bili pridobljeni iz čebelnjakov brez kliničnih znakov HGČZ ter bili potrjeni kot negativni tudi v bakteriološki preiskavi.

(v) Pri rutinskih preiskavah čebelje zalege smo v posameznih primerih ugotovili prisotnost bakterije *Morganella morganii* v velikem številu in v čisti kulturi. V literaturi je zelo malo podatkov o njeni vlogi pri čebelah, pri drugih živalskih vrstah pa je znana kot enterobakterija z visoko stopnjo odpornosti proti antibiotikom. Čeprav ugotavljanje drugih bakterij poleg *P. larvae* ni bil neposredni cilj projekta, je izolacija takih bakterij lahko pomemben pokazatelj prehranskih in zdravstvenih značilnosti čebelje družine.

7. Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju⁵

	Dosežek		
1.	COBISS ID	53310723	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO Analiza globalne populacijske strukture bakterije <i>Paenibacillus larvae</i> in preiskava izbruhov hude gnilobe čebelje zalege z uporabo stabilne sheme	

	Dosežek		
			wgMLST
		ANG	Analysis of the global population structure of <i>Paenibacillus</i> larvae and outbreak investigation of American foulbrood using a stable wgMLST scheme
	Opis	SLO	Primeri uporabe sekvenciranja celotnega genoma (WGS) za preučevanje epidemiologije bakterije <i>P. larvae</i> so redki. V tem delu smo izdelali stabilno shemo za tipizacijo bakterije <i>P. larvae</i> na osnovi zaporedij lokusov celotnega genoma (wgMLST), ki je obsegala 5745 lokusov, za kar smo uporabili 125 genomov <i>P. larvae</i> . Za oceno epidemiološke uporabnosti razvite sheme wgMLST smo uporabili 51 izolatov <i>P. larvae</i> iz izbruhov hude gnilobe v Sloveniji. Poleg tega smo pristop wgMLST primerjali z analizo zaporedij lokusov osrednjega genoma (cgMLST) in polimorfizmi posameznega nukleotida na ravni celotnega genoma (wgSNP). Vsi trije pristopi so uspešno identificirali gruče genetsko sorodnih sevov, povezanih z izbruhi, ki so se tudi jasno ločili od epidemiološko nepovezanih izolatov. Ugotovili smo dobro primerljivost WGS-analiz s konvencionalnimi tipizacijskimi metodami (ERIC-PCR in MLST), vendar nobena od konvencionalnih metod ni imela zadostne moči razlikovanja, da bi zanesljivo opredelila gruče genetsko povezanih izolatov. Razvita shema wgMLST vodi v boljše razumevanje genetske raznovrstnosti bakterije <i>P. larvae</i> znotraj in med izbruhi ter predstavlja pomemben napredek na področju genomske epidemiologije tega pomembnega patogena čebel.
		ANG	Whole-genome sequencing (WGS) has been rarely applied to study the epidemiology of <i>P. larvae</i> . In this study, we used 125 <i>P. larvae</i> genomes to construct a stable whole-genome multilocus sequence typing (wgMLST) scheme consisting of 5745 loci. A total of 51 <i>P. larvae</i> isolates originating from outbreaks of American foulbrood in Slovenia were used to assess the epidemiological applicability of the developed wgMLST scheme. In addition, wgMLST was compared with the core-genome MLST (cgMLST) and whole-genome single nucleotide polymorphism (wgSNP) analyses. All three approaches successfully identified clusters of outbreak-associated strains, which were clearly separated from the epidemiologically unlinked isolates. High levels of backward comparability of WGS-based analyses with conventional typing methods (ERIC-PCR and MLST) were revealed; however, both conventional methods lacked sufficient discriminatory power to separate the outbreak clusters. The developed wgMLST scheme provides an improved understanding of the intra- and inter-outbreak genetic diversity of <i>P. larvae</i> and represents an important progress in unraveling the genomic epidemiology of this important honeybee pathogen.
	Objavljeno v		Frontiers in veterinary science, 2021, vol. 8, art. 582677, str. 1-15. doi: 10.3389/fvets.2021.582677. Kategorija: 1A1 (Z, A', A1/2); Impact Factor: 2.245; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.331; Avtorji / Authors: Papić Bojan, Diricks Margo, Kušar Darja
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID		60749571 Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	ERIC- in WGS-tipizacija izolatov <i>Paenibacillus</i> larvae v Sloveniji: preiskava izbruhov ERIC I
		ANG	ERIC and WGS typing of <i>Paenibacillus</i> larvae in Slovenia: investigation of ERIC I outbreaks
			V tej raziskavi smo analizirali 506 izolatov <i>P. larvae</i> iz let 2017–2019, ki so izvirali iz medu ali zalege ter iz različnih geografskih regij v Sloveniji. V prvem delu smo izolate tipizirali z metodo ERIC-PCR, da bi ugotovili pogostnost tipov ERIC v Sloveniji. Prevladoval je tip ERIC II (70,2%), sledil je tip ERIC I (29,8%). S kapilarno elektroforezo smo ugotovili dva nekoliko spremenjena vzorca pasov ERIC I, ki se nista izkazala kot relevantna za razlikovanje med tipi ERIC. Očitnega prostorskega ali časovnega

Dosežek		
Opis	SLO	razvrščanja tipov ERIC nismo ugotovili. Za opredelitev klonalnosti izolatov P. larvae tipa ERIC I, povezanih z izbruhom hude gnilobe čebelje zalege, smo 59 izolatov ERIC I določili zaporedja celotnih genomov (WGS). Tipizacija na osnovi zaporedij lokusov celotnega genoma (wgMLST) je razkrila sedem gruč genetsko povezanih izbruhov ERIC I-ST2 (≤ 35 razlik v alelih). V vseh gručah smo ugotovili prenos klona P. larvae znotraj okuženega območja (kužnega kroga s polmerom 3 km), kar lahko razložimo z aktivnostjo čebel. V treh gručah smo ugotovili prenos klona med geografsko oddaljenimi čebeljniki, kar lahko razložimo z aktivnostjo čebelarjev, kot je prevoz čebel na pašo in trgovanje s čebeljimi družinami. Zbrane ugotovitve kažejo na pomen čebelarskih aktivnosti pri prenosu sevov P. larvae. Metoda WGS bi morala biti referenčna metoda za ugotavljanje poti prenosa sevov P. larvae.
	ANG	In this study, we obtained 506 P. larvae isolates originating from honey or brood samples and from different geographic regions of Slovenia in the period 2017–2019. In the first part of the study, we conducted ERIC-PCR typing to assess the frequency of ERIC types in Slovenia. ERIC II was the predominant type (70.2%), followed by ERIC I (29.8%) Capillary electrophoresis revealed two slightly altered ERIC I banding patterns, which were not considered relevant for the discrimination of ERIC types. No evident spatiotemporal clustering of ERIC types was observed. To assess the clonality of the outbreak-related P. larvae ERIC I isolates, 59 isolates of this type underwent whole-genome sequencing (WGS). Whole-genome multilocus sequence typing (wgMLST) revealed seven ERIC I-ST2 outbreak clusters (≤ 35 allele differences). In all seven clusters, the transmission of P. larvae outbreak clone within the restricted area with a 3-km radius was observed, which could be explained by the activity of honeybees. In three clusters, the transmission of the outbreak clone between geographically distant apiaries was revealed, which could be explained by the activities of beekeepers such as migratory beekeeping and trading of bee colonies. The present findings reinforce the importance of beekeeping activities in the transmission of P. larvae. WGS should be used as a reference typing method for the detection of P. larvae transmission clusters.
Objavljeno v		Insects, 2021, vol. 12, no. 4, art. 362, str. 1-11. doi: 10.3390/insects12040362. Kategorija: 1A1 (Z, A', A1/2); Impact Factor: 2.220; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.564; Avtorji / Authors: Žugelj Alenka, Pappič Bojan, Zdovc Irena, Zajc Urška, Golob Majda, Avberšek Jana, Kušar Darja
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši dosežek projektne skupine na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti⁶

Dosežek		
1.	COBISS ID	4881530 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Huda gniloba čebelje zalege pri čebeljih družinah: kvantifikacija spor Paenibacillus larvae v medu z metodo PCR
		ANG American foulbrood in honeybee colonies: PCR-based quantification of Paenibacillus larvae spores in honey
		Števena gojiščna preiskava je zelo nezanesljiva za kvantifikacijo spor Paenibacillus larvae v čebeljih vzorcih. Da bi premostili to omejitev, smo razvili nov kvantitativni test PCR (qPCR) za detekcijo in kvantifikacijo spor P. larvae v vzorcih medu, ki je potencialno uporabna z vidika napovedi zdravstvenega stanja pripadajočih čebeljih družin. Test qPCR temelji na tehnologiji TaqMan in pomnožuje gen za metaloproteinazo, ki je v genomu

Dosežek		
Opis	SLO	P. larvae prisoten v eni kopiji, kar omogoča zanesljivo molekularno detekcijo in kvantifikacijo omenjene bakterije. Da bi omogočili absolutno kvantifikacijo, smo standardno umeritveno krivuljo qPCR umerili z digitalnim PCR. Za test qPCR je meja kvantifikacije (LOQ) znašala 13 spor na gram medu, meja detekcije (LOD) pa 3 spore na gram medu. Pripravljeni test qPCR predstavlja pomemben prispevek k zgodnji diagnostiki hude gnilobe čebelje zalege z molekularno kvantifikacijo spor P. larvae v vzorcih medu.
	ANG	Plate counting is highly unreliable for quantification of Paenibacillus larvae in bee-related samples. To overcome this limitation, we designed a novel quantitative PCR (qPCR) assay for the detection and quantification of P. larvae spores in honey samples, which may be predictive of the AFB health status of corresponding honeybee colonies. The assay is based on the TaqMan technology and amplifies a single-copy metalloproteinase gene of P. larvae, enabling its reliable molecular detection and quantification. To enable absolute quantification, the qPCR standard curve was calibrated by digital PCR. For qPCR, the observed limit of quantification (LOQ) was 13 spores of P. larvae per gram of honey, and the limit of detection (LOD) 3 spores per gram. The developed qPCR assay represents an important contribution to the early diagnostics of American foulbrood by molecular quantification of P. larvae spores in honey samples.
Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
Objavljeno v	European College of Veterinary Microbiology; Abstract book; 2019; Str. 121; Avtorji / Authors: Zajc Urška, Zdovc Irena, Žugelj Alenka, Papić Bojan, Avberšek Jana, Pirš Tina, Pislak Metka, Ocepek Matjaž, Kušar Darja	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
2.	COBISS ID	44930307 Vir: COBISS.SI
Opis	Naslov	SLO Primerjava tipizacije na osnovi zaporedij osrednjega genoma (cgMLST) in polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP) za tipizacijo bakterije Paenibacillus larvae ANG Comparison of core genome multilocus sequence typing (cgMLST) and genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) approach for typing of Paenibacillus larvae
	SLO	V tej raziskavi smo ugotavljali epidemiološko uporabnost tipizacije na osnovi zaporedij lokusov osrednjega genoma (cgMLST) in na osnovi polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP) za tipizacijo bakterije Paenibacillus larvae. Skupno smo določili zaporedja celotnih genomov (tehnologija Illumina) 42 izolatov ERIC II in devetim izolatov ERIC I iz Slovenije. Pristop cgMLST smo izvedli z orodjem chewBBACA, medtem ko smo za pristop SNP uporabili orodje Snippy. Primerjava obeh pristopov (cgMLST in SNP) je pokazala 100% skladnost med tremi ugotovljenimi gručami ERIC II in eno gručo ERIC I; vse gručice so bile dobro podprte tudi s pripadajočimi vrednostmi zanesljivosti vejanja in epidemiološkimi podatki. Mediana genetske raznolikosti znotraj gručice za vse štiri ugotovljene gručice je bila 24 alelov cgMLST (razpon 2–46) in 30 SNP (razpon 1–60). Obe metodi sta se izkazali kot primerni za zamejitev gruč genetsko povezanih izolatov P. larvae. Zbrani rezultati predstavljajo doprinos k razumevanju genetske raznovrstnosti izolatov P. larvae, povezanih z izbruhi hude gnilobe čebelje zalege, in so pomembna osnova za določitev mejne vrednosti (razlike v alelih/SNP) za zamejitev klonalnih izolatov P. larvae.
	ANG	In this study, we assessed the epidemiological applicability of core genome multilocus sequence typing (cgMLST) and genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) typing for Paenibacillus larvae. A total of 42 ERIC II and nine ERIC I isolates from Slovenia underwent whole-genome sequencing with Illumina technology. cgMLST was performed using ChewBBACA, whereas SNP typing was performed using Snippy.

Dosežek		
	ANG	Comparison of cgMLST and SNP typing showed 100% concordance between the three observed ERIC II clusters and a single ERIC I cluster; all clusters were also well supported by the bootstrap values and the corresponding epidemiological data. Median genetic diversity within a single cluster for all four identified clusters was 24 cgMLST alleles (range 2–46) and 30 SNPs (range 1–60). Both methods proved suitable for outbreak cluster delineation. This study improves our understanding of the genetic diversity of <i>P. larvae</i> isolates obtained during outbreak investigation and represents an important basis for establishing an allele/SNP threshold to delineate <i>P. larvae</i> outbreak clones.
Šifra	B.03	Referat na mednarodni znanstveni konferenci
Objavljeno v	Serbian Society of Microbiology; FEMS online conference on microbiology; 2020; str. [1]; Avtorji / Authors: Papić Bojan, Kušar Darja	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
3.	COBISS ID	32901379 Vir: COBISS.SI
Opis	Naslov	SLO Raznolikost izolatov <i>Paenibacillus larvae</i> znotraj istega čebelarstva
		ANG Diversity of <i>Paenibacillus larvae</i> within a single beekeeping operation
	SLO	Genetska raznolikost izolatov <i>P. larvae</i> znotraj istega vzorca, čebelnjaka ali čebelarstva je slabo poznana. V tej raziskavi smo ugotavljali genetsko raznolikost izolatov iz enega čebelarstva s tremi čebelnjaki. Isole smo pridobili jeseni 2019 iz vzorcev bolne zalege in pripadajočega medu, v sklopu preiskave izbruha hude gnilobe. Pri treh vzorcih medu smo tipizirali po pet izolatov, iz zalege pa po enega. Vse isolate (n=40) smo tipizirali z metodo ERIC-PCR in na osnovi polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP) v celotnem genomu z orodjem Snippy. Vsi izolati so pripadali tipu ERIC II. Povprečna raznolikost znotraj čebelarstva je bila 13 polimorfizmov SNP (razpon 0–27); največja raznolikost (27 SNP) je bila dosežena že znotraj enega čebelnjaka. Filogenetsko drevo ni pokazalo jasnega razvrščanja izolatov glede na pridružene podatke (vrsta vzorca, čebeljak ali panj). Potrdili smo monoklonalno naravo izbruha, kar potrjuje prenos seva <i>P. larvae</i> znotraj čebelarstva. Pri preiskavah izbruhov hude gnilobe čebelje zalege z metodo WGS moramo upoštevati tudi genetsko raznolikost izolatov <i>P. larvae</i> znotraj vzorca, čebelnjaka in čebelarstva. Zbrani rezultati predstavljajo pomemben doprinos k razumevanju genetske raznolikosti mikrobiološko in epidemiološko povezanih izolatov <i>P. larvae</i> .
	ANG	Genetic diversity of <i>P. larvae</i> isolates within the same sample, apiary or beekeeping operation remains poorly understood. In this study, we assessed the genetic diversity of <i>P. larvae</i> from a single beekeeping operation with three apiaries. Isolates were obtained in autumn 2019 from samples of diseased brood and the associated honey, as part of the investigation of an outbreak of American foulbrood. Five isolates were typed per each of the three investigated honey samples and one from each brood sample. All isolates (n=40) were typed using ERIC-PCR and genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs) using Snippy. All isolates belonged to type ERIC II. The average diversity within the operation was 13 SNPs (range 0–27); the maximum diversity (27 SNPs) was already detected within a single apiary. The phylogenetic tree did not show clear clustering of isolates according to the associated data (sample type, apiary or hive). The monoclonal nature of the outbreak was confirmed, which confirms the transmission of the <i>P. larvae</i> strain within the operation. In the WGS-based investigation of outbreaks of American foulbrood, the genetic diversity of <i>P. larvae</i> isolates at the sample, apiary and beekeeping operation levels should be taken into account. The collected results represent an important contribution to our understanding of the genetic diversity of microbiologically and epidemiologically related <i>P. larvae</i> isolates.

	Dosežek	
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	Slovensko mikrobiološko društvo; Knjiga povzetkov; 2020; Str. 69; Avtorji / Authors: Kušar Darja, Papić Bojan, Žugelj Alenka, Jenko-Rogelj Mira, Zajc Urška, Avberšek Jana, Golob Majda, Lepen Maja, Pislak Metka, Ocepek Matjaž, Zdovc Irena
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
4.	COBISS ID	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	<i>SLO</i> Postavitev bioinformacijske sheme wgMLST za P. larvae in znatna dopolnitev genomske baze za P. larvae
		<i>ANG</i> Development of P. larvae wgMLST bioinformatic scheme and significant improvement of P. larvae genomic database
	Opis	<i>SLO</i> Za namen bioinformacijske analize podatkov WGS smo na novo razvili stabilno shemo wgMLST za bakterijo P. larvae z 5745 lokusi, ki je sedaj implementirana v splošno uporabljeni programske opreme BioNumerics. S tem smo omogočili harmonizirano (usklajeno) analizo podatkov WGS in izmenjavo podatkov med laboratoriji v svetovnem merilu, kar bo prispevalo k epidemiološkim raziskavam tega pomembnega patogena čebel. Poleg tega smo v okviru projekta sekvencirali (WGS) veliko število izolatov P. larvae (n=202) in s tem znatno dopolnili javno dostopno podatkovno bazo genomov, ki omogoča delo raziskovalcem s področja epidemiologije P. larvae in opredeljevanja izbruhov hude gnilobe čebelje zalege; pred dopolnitvijo je bilo v bazi 128 genomov P. larvae. Izdelava in uporaba sheme je opisana v znanstveni objavi (COBISS-ID 53310723), poleg tega pa je bilo delo predstavljeno tudi na dveh znanstvenih kongresih (COBISS-ID 52607747, on-line workshop MIC-Phy 2021; 44928515, kongres FEMS 2020). Shema je bila uporabljena tudi v okviru dela, katerega izsledke smo opisali v znanstvenem članku »Using whole-genome sequencing to assess the diversity of Paenibacillus larvae within an outbreak and a beekeeping operation« (avtorji: Bojan Papić, Majda Golob, Irena Zdovc, Jana Avberšek, Metka Pislak Ocepek, Darja Kušar); članek smo 5.5.2021 oddali v revijo Microbial Genomics (IF= 4.632).
		<i>ANG</i> For the purpose of bioinformation analysis of WGS data, we developed a stable wgMLST scheme for P. larvae consisting of 5745 loci, which is now implemented in the widely used BioNumerics software. This has enabled a harmonized analysis of WGS data and the exchange of data between laboratories worldwide, which will contribute to epidemiological research on this important honeybee pathogen. In addition, in the scope of the project we sequenced (WGS) a large dataset of P. larvae isolates (n=202) and thus significantly supplemented the publicly available genomic database, which enables studies on P. larvae epidemiology and delineation of American foulbrood outbreaks; prior to supplementation, there were 128 P. larvae genomes in the database. The construction and use of the scheme are described in a scientific publication (COBISS-ID 53310723), and the work was also presented at two scientific meetings (COBISS-ID 52607747, MIC-Phy 2021 on-line workshop; 44928515, FEMS 2020 congress). The scheme was also employed in the scope of the work which we presented as a scientific paper entitled »Using whole-genome sequencing to assess the diversity of Paenibacillus larvae within an outbreak and a beekeeping operation« (authors: Bojan Papić, Majda Golob, Irena Zdovc, Jana Avberšek, Metka Pislak Ocepek, Darja Kušar); 5.5.2021 we submitted the paper to Microbial Genomics journal (IF= 4.632).
	Šifra	F.16 Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz
	Objavljeno v	COBISS

	Dosežek	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO Strokovno delo projektne skupine ANG Professional engagement of the project group
	Opis	SLO Člani projektne skupine so najtesneje sodelovali z imetniki čebel na področju izobraževanja, strokovnega svetovanja in preventive ter diagnostike in sanacije žarišč hude gnilobe čebelje zalege. Ob naštetih dejavnostih so ugotovitve, pridobljene v okviru tega projekta, prenašali neposredno v čebelarstvo prakso in s tem izboljšali nekatere dosedanje izkušnje. Med ostalim so člani projektne skupine objavili strokovne članke v reviji Slovenski čebelar, svoje ugotovitve pa so delili na srečanjih Strokovnega združenja profesionalnih čebelarjev (2. in 3. Pislakov dan), letnih srečanjih čebelarjev v okviru 42. in 43. ApiSlovenije in ApiSlovenije 'v malem', na 2. in 3. mednarodnem posvetu o urbanem čebelarjenju ter pri pripravi priročnika Dobra čebelarska praksa. Člani projektne skupine so s svojim znanjem in izkušnjami sodelovali s Čebelarstvo zvezo Slovenije in v več delovnih skupinah v okviru MKGP pri pripravi programov na področju čebelarstva, sodelovali z UVHVVR pri pripravi sprememb pravilnika o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege ter sodelovali v okviru MOL pri pripravi pilotnega projekta 'Azil za čebelje roje'. ANG Members of the project group have worked most closely with beekeepers in the areas of education, expert advice and disease prevention, and diagnosis and remediation of American foulbrood outbreaks. In addition to the activities listed, the knowledge gained from this project has been directly applied to the beekeeping practice, improving some previous experiences. The members of the project group published, among others, professional articles in the Slovenski čebelar magazine, and shared their findings at the meetings of the Expert Association of Professional Beekeepers (2nd and 3rd Pislak Day), at annual meetings of beekeepers within the 42nd and 43rd ApiSlovenia and ApiSlovenia 'in small', at the 2nd and 3rd International Conference on Urban Beekeeping and in the preparation of the Good Beekeeping Practice Manual. With their knowledge and experience, the members of the project group cooperated with the Beekeepers' Association of Slovenia and in several working groups within MKGP (Ministry of Agriculture, Forestry and Food) in the preparation of programs in the field of beekeeping, cooperated with UVHVVR (Administration for Food Safety, Veterinary Sector and Plant protection) in the preparation of amendments to the regulations on measures for identification, control, information and prevention of American foulbrood, and participated within the City Municipality of Ljubljana in the preparation of the pilot project 'Shelter for bee swarms'.
	Šifra	F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)
	Objavljeno v	COBISS
	Tipologija	1.04 Strokovni članek

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

Eden izmed pomembnih rezultatov projekta je postavitve molekularne metode qPCR za zanesljivo kvantifikacijo P. larvae, ki je bila validirana za med in drobir, lahko pa se uvede tudi za druge čebelje vzorce kot so odrasle čebele (v delu). Taka metoda do sedaj ni bila na voljo, prvič pa je bila za P. larvae uporabljena tudi metoda dPCR (digitalni PCR). Rezultate bomo predstavili v obliki znanstvenega članka »Construction and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the quantification of Paenibacillus larvae spores in honey and hive

debris«, ki je v zadnji fazi priprave.

Rezultati projekta so bili predstavljeni na štirih znanstvenih kongresih: v podatkovni bazi COBISS je sedem objavljenih povzetkov znanstvenih prispevkov na konferencah (COBISS-ID 52607747 od srečanja MIC-Phy 2021; 44930307, 44930307 in 44928003 od kongresa FEMS 2020; 32901379 in 32901379 od kongresa SMD 2020; 4881530 od kongresa ICECVM 2019).

V okviru projekta smo izvedli dve dijaški raziskovalni/projektni nalogi, ki sta bili tudi nagradjeni: (i) 'Genotipizacija bakterije *Paenibacillus larvae*, povzročitelja hude gnilobe čebelje zalege', avtor: Klara Papić (COBISS-ID 30046979, Gimnazija Bežigrad, 2020), mentorstvo: Majda Golob in Darja Kušar, nagrada: Srebrno priznanje Zveze za tehnično kulturo Slovenije; (ii) 'Huda gniloba čebelje zalege: štetje spor v medu ter tipizacija izolatov *Paenibacillus larvae*', avtorja: Andraž Rotar in Jurij Malovrh (COBISS-ID 26416643, Biotehniški izobraževalni center, Gimnazija in veterinarska šola Ljubljana, 2020), mentorstvo: Majda Golob in Darja Kušar, nagrada: 50. Krkine nagrade za srednješolske raziskovalne naloge.

Darja Kušar je bila članica programsko-organizacijskega odbora in sourednica knjige povzetkov (COBISS-ID 29246467) kongresa SMD 2020 (8. kongres Slovenskega mikrobiološkega kongresa, 23.-25.9.2020).

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Člani projektne skupine so v času trajanja projekta do danes pomembno doprinesli k razvoju znanosti, saj so objavili skupno 37 izvirnih znanstvenih člankov, en pregledni znanstveni članek, tri kratke znanstvene prispevke, 45 strokovnih člankov in 10 poljudnih člankov. Sodelovali so na številnih znanstvenih in strokovnih srečanjih, kjer so predstavili 94 prispevkov. Pripravili so en samostojni strokovni sestavek v monografski publikaciji, en strokovni sestavek v leksikonu ter en predgovor. Opravili so en intervju. Zaključili so štiri strokovne monografije, tri druga učna gradiva, dve doktorski disertaciji, osem končnih poročil o rezultatih raziskav ter dva elaborata. Sodelovali so v televizijskih oddajah, kot uredniki publikacij ter kot mentorji ali somentorji pri doktorskih disertacijah in diplomskih delih. Skupno imajo 238 bibliografskih enot (na dan 6. 5. 2021).

Ključne doprinose projekta k razvoju znanosti lahko razdelimo na metodološke in vsebinske. Metodološki doprinosi: v okviru projekta smo na novo razvili dve pomembni molekularni tehniki oz. postopka. Prvi pomemben metodološki doprinos je razvoj testa qPCR na osnovi pomnoževanja specifičnega gena, ki je prisoten v samo eni kopiji na genom *P. larvae*. Test temelji na tehnologiji TaqMan in omogoča zanesljivo kvantifikacijo spor *P. larvae* (test ima dobro specifičnost in občutljivost) v različnih čebeljih vzorcih. Test bo lahko kot presejalna metoda omogočal analizo večjega števila čebeljih vzorcev, poleg tega bo lahko nadomestil števno gojiščno preiskavo, saj smo v okviru projekta pokazali, da je kalitev spor *P. larvae* slaba in nekonsistentna. Test je dostopen vsem, ki se ukvarjajo z diagnostiko hude gnilobe čebelje zalege (HGČZ). Pri vpeljavi testa qPCR smo kot prvi v svetu uporabili digitalni PCR za kvantifikacijo bakterije *P. larvae* in z njim umerili test qPCR. Drugi pomemben metodološki doprinos je izdelava sheme wgMLST za tipizacijo bakterije *P. larvae* na ravni celotnega genoma (WGS). Shema je implementirana v bioinformacijski programski opremi BioNumerics, ki jo uporabljajo številni laboratoriji po celem svetu, zato bo omogočala harmonizirano analizo podatkov WGS za bakterijo *P. larvae*. Med metodološkimi doprinosi velja izpostaviti tudi vpeljavo kapilarne elektroforeze za analizo pomnožkov ERIC-PCR, ki so sedaj še ni bila uporabljena, omogoča pa natančnejšo analizo in primerjavo profilov ERIC kot klasična gelska elektroforeza.

Vsebinski doprinosi: v okviru projekta smo pridobili veliko število genomov *P. larvae* (n=202), ki so znatno povečali nabor genomov v javno dostopnih podatkovnih bazah in so sedaj na voljo za vse raziskovalce s področja. Nadalje smo opredelili okvirno mejo za ugotavljanje genetsko sorodnih (klonalnih) sevov *P. larvae*, kar pomembno prispeva k epidemiološkim preiskavam oz. opredelitvi izbruhov HGČZ v svetovnem merilu. Glede na rezultate smo

ugotovili glavne dejavnike tveganja za prenos sevov *P. larvae* znotraj 3-km kužnih krogov in na daljše razdalje, kar so podprli tudi podatki iz anketnega poizvedovanja; to do sedaj še ni bilo narejeno na sistematičen način. Opredelili smo raznolikost sevov *P. larvae* na različnih ravneh (med/čebelja družina, čebelnjak, čebelarstvo in izbruh), kar do sedaj še ni bilo opisano. Ugotovili smo nov sekvenčni tip (ST30), kar kaže, da genetska raznolikost *P. larvae* v svetovnem merilu še ni povsem raziskana. Potrdili smo, da imata obe klasični tipizacijski metodi (ERIC-PCR in MLST) premajhno moč razlikovanja za opredelitev izbruhov ter ugotovili, da lahko tipa ERIC in MLST zanesljivo napovemo iz podatkov WGS. Z metodo ERIC-PCR smo tipizirali veliko število izolatov *P. larvae* ($n=583$) in s tem doprinesli k poznavanju razširjenosti tipov ERIC v Sloveniji. Čeprav smo s kapilarno elektroforezo pri nekaterih izolatih odkrili dva nekoliko različna profila pasov ERIC I, je analiza WGS pokazala, da razlike ne zadoščajo za določitev novega (pod)tipa ERIC.

ANG

The project members have made significant scientific contributions within the project period till today. In total, they published 37 original scientific papers, one scientific review article, three short scientific communications, 45 professional articles and 10 popular-science articles. They participated in numerous scientific and professional meetings where they presented 94 works. They wrote an essay for monographic publication, one lexicon essay and one foreword. They conducted one interview and wrote four professional monographs, three teaching materials, two doctoral dissertations, eight final project reports and two elaborations. They have participated in television programs and as publication editors, supervisors or co-supervisors of doctoral and undergraduate theses. In total, their bibliography counts 238 units (6/5/2021).

The main project contributions to the progress of science can be divided into methodological and substantive. Methodological contributions: We have developed anew two important molecular techniques or procedures. The first is the development of a qPCR assay based on the amplification of a specific gene present in a single copy per *P. larvae* genome. The assay is based on TaqMan technology and allows reliable quantification of *P. larvae* spores (the assay has good specificity and sensitivity) in different bee-related samples. As a screening method, the assay is suitable for the analysis of a large number of samples and can replace plate counting since the germination of *P. larvae* spores was shown in the scope of the project to be poor and inconsistent. The assay is available for anyone involved in the diagnosis of American foulbrood (AFB). We were the first to use digital PCR for quantification of *P. larvae* and calibration of qPCR assay. Another important contribution is the development of the wgMLST scheme for typing of *P. larvae* at the genome-wide level (WGS). The scheme is implemented in the BioNumerics bioinformatics software, which is used by many laboratories worldwide, and will therefore allow harmonized analysis of WGS data for *P. larvae*. Among the methodological contributions, we also highlight the implementation of capillary electrophoresis for the analysis of ERIC-PCR amplicons, which had not been used prior to this project but allows a more accurate analysis and comparison of ERIC profiles than conventional gel electrophoresis.

Substantive contributions: As part of the project, we sequenced a large number of *P. larvae* genomes ($n=202$), which are now available to all researchers in the field and have significantly increased the number of publicly available *P. larvae* genomes. In addition, we established a threshold for delineating genetically related (clonal) *P. larvae* strains, which contributes significantly to the epidemiological surveillance of AFB and outbreak investigation on a global scale. Based on the results, we identified the main risk factors for transmission of *P. larvae* within a 3-km AFB zone and over large geographic distances, which was also supported by questionnaire data; this has not been done systematically before. We investigated the genetic diversity of *P. larvae* strains at different levels (honey/bee colony, apiary, beekeeping and outbreak), which had not been described in detail before. We identified a new sequence type (ST30), indicating that the genetic diversity of *P. larvae* has not yet been fully explored. We confirmed that both classical typing methods (ERIC-PCR and MLST) lack the necessary discriminatory power to identify outbreaks and found that ERIC and MLST types can be reliably predicted from WGS data. We typed a large number of *P. larvae* isolates ($n=583$) using ERIC-PCR and thus contributed to the knowledge of the prevalence of ERIC types in Slovenia. Although two slightly altered ERIC I banding profiles were detected in some isolates by capillary electrophoresis, WGS analysis showed that the differences were not sufficient to define a new ERIC (sub)type.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Namen projekta je bil preučiti poti širjenja hude gnilobe čebelje zalege (HGČZ) in na osnovi rezultatov predlagati spremembe ukrepov, da bi v Sloveniji zmanjšali pojavnost HGČZ, s čimer bi prispevali tako k zmanjševanju stroškov (nadomestila čebelarjem za uničene čebelje družine in opremo po prijavi suma in odkritju bolezni, stroški kliničnih pregledov na terenu in laboratorijskih preiskav) kot ohranjanju kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*), ki je v Sloveniji avtohtona pasma čebel in je bila pri nas tudi prvič opisana. Ker ima čebelarstvo v Sloveniji dolgo in bogato tradicijo, je nujno skrbeti za zdravje in obstoj kranjske čebele. Zato je pomemben vsak prispevek na področju izboljšanja njenega zdravstvenega stanja, poleg tega pa je zdravje čebel pomembno tudi z ekološkega vidika zaradi opraševalske funkcije in ohranjanja biotske raznovrstnosti.

V okviru projekta smo z anketnim poizvedovanjem in WGS-tipizacijo večjega števila izolatov *P. larvae* ugotovili, da je velikost (3 km) kužnega kroga ustrezna, saj lahko prenos HGČZ znotraj kroga pojasnimo z naravno aktivnostjo čebel, prenos na daljše razdalje pa z aktivnostjo čebelarjev (npr. prevoz bolnih/okuženih čebeljih družin na pašo in trgovanje s čebelami). Poleg tega smo zaradi kliničnih pregledov družin ob uvedbi zapore znotraj kužnih krogov ugotovili tudi nesorodne seve *P. larvae*, ki niso bili genetsko povezani s sevom iz prvotno ugotovljenega žarišča HGČZ. To kaže, da je v Sloveniji veliko čebelnjakov s HGČZ, v katerih bolezen ostane prikrita, ker čebelar bodisi ne opazi bolezenskih sprememb bodisi bolezni ne prijavi, v vsakem primeru pa taki čebelnjaki predstavljajo nevarnost za širjenje okužbe. V okviru projekta smo zaradi navedenega predlagali uvedbo (občasnih) kliničnih pregledov prevoznih čebeljih družin s strani veterinarja specialista za zdravstveno varstvo čebel, laboratorijskih preiskav čebeljih vzorcev in okrepljenega uradnega nadzora nad premiki v skladu z veljavnim pravilnikom. S tem bi hitreje izločili bolne čebele iz prometa, hkrati pa čebelarje motivirali, da si pridobijo ustrezno znanje in sami izvajajo redne preglede svojih družin. Nadalje smo predlagali uvedbo oz. dosledno izvajanje tehnoloških posegov, s katerimi lahko čebelarji zmanjšajo količino spor v panjih (redna menjava satja, pretresanje čebel na nove satnice, čiščenje in razkuževanje) ali preprečujejo širjenje okužbe (higienski ukrepi pri delu v čebelnjaku, pravilno ravnanje z roji, premiki zdravih čebeljih družin ter uporaba lastne opreme in orodja). Člani projekte skupine smo udeleženi v izobraževanje čebelarjev in z začetimi aktivnostmi nadaljujemo tudi po končanju projekta.

Ker je gostota čebelnjakov v Sloveniji velika, so izbruhi HGČZ pogosti. V okviru projekta smo razvili molekularni test qPCR za zanesljivo zgodnje ugotavljanje prisotnosti (detekcijo) in štetje (kvantifikacijo) spor *P. larvae* v čebeljih vzorcih (medu in drobirju), kar omogoča ugotavljanje tistih čebelnjakov, kjer je bolezen že prisotna, klinični znaki pa ne oz. so še premalo izraženi. V okviru projekta smo zato predlagali uvedbo rednega monitoringa (npr. vzorcev medu) po celotni Sloveniji za zgodnje ugotavljanje čebelnjakov, pozitivnih na bakterijo *P. larvae*, in s tem čimprejšnjega preprečevanja širjenja HGČZ. Na ta način bi v prihodnosti lahko spremenili trenutno veljavne ukrepe za nadzor in preprečevanje HGČZ ter potencialno zmanjšali z njimi povezane stroške in obseg dela. Vpeljani test qPCR je primeren za redni monitoring čebeljih vzorcev, saj omogoča analizo večjega števila vzorcev hkrati v realnem času, analiza pa je finančno sprejemljiva.

ANG

The aim of the project was to investigate the transmission of American foulbrood (AFB) and, based on the obtained results, to propose changes to the currently applied measures for AFB control in Slovenia, thereby reducing costs (compensation to beekeepers for destroyed colonies and beekeeping equipment after registration and detection of suspected disease, costs of clinical examinations in the field and laboratory testing) as well as to contribute to the preservation of the Carniolan bee (*Apis mellifera carnica*), which is an autochthonous bee breed in Slovenia and was here first described. Since beekeeping has a long and rich tradition in Slovenia, it is necessary to ensure the health and existence of the Carniolan bee. Therefore, any contribution to improving its health is important, and also, the health of bees is important from an ecological point of view because of the pollination function of bees and the preservation of biodiversity.

The questionnaire and WGS typing of a large number of *P. larvae* isolates conducted in this project revealed that the size (3 km) of AFB zone is appropriate, since AFB transmission

within the zone can be explained by natural activity of honeybees and long-distance transmission by the activity of beekeepers (e.g., transport of diseased/infected bee colonies for foraging and bee trading). In addition, due to the introduction of novel AFB zones and clinical examination of all corresponding colonies within the zone, strains of *P. larvae* that were genetically unrelated to the strain from the originally identified AFB outbreak were identified. This shows that there are many AFB-positive apiaries in Slovenia where the disease remains hidden because the beekeeper either does not notice the disease changes or does not report the disease, but such apiaries pose a risk for spreading the infection. As part of the project, we proposed the introduction of (occasional) clinical examinations of transport bee colonies by a veterinarian specializing in bee health, laboratory testing of bee-related samples and increased official control of bee movement in accordance with the current regulations. This would more efficiently remove diseased bees from circulation while motivating beekeepers to acquire the necessary knowledge to carry out regular inspections of colonies themselves. In addition, we proposed the implementation/strict adherence to the technological interventions that beekeepers can use to reduce the spore load in the hives (regular change of honeycombs, shaking the bees to new foundation, cleaning and disinfection) or prevent the spread of AFB (hygienic measures when working in the apiary, proper handling of swarms, movement of healthy colonies and use of own equipment and tools). The members of the project group participate in the education of beekeepers and we will continue with the activities started in this project.

Because the apiary density in Slovenia is high, outbreaks of AFB are frequent. In this project, we developed a molecular qPCR assay for reliable early detection and quantification of *P. larvae* spores in bee-related samples (honey and debris), allowing early identification of those apiaries where the pathogen is already present but no clinical symptoms are (yet) observed. We therefore proposed the introduction of regular country-wide monitoring (e.g., of honey samples) for early detection of *P. larvae*-positive apiaries, and thus to prevent the spread of AFB. In this way, the currently employed AFB control and prevention measures could be improved in the future and the associated costs and workload potentially reduced. The implemented qPCR assay is suitable for regular monitoring of bee-related samples since it allows simultaneous analysis of a large number of samples in real time and is cost-effective.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☐ v domačih znanstvenih krogih
☒ pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹¹

Za rezultate se zanimajo čebelarstva javnost v Sloveniji; v pripravi je poročilo za čebelarje, ki so sodelovali pri izpolnjevanju anketnega vprašalnika, ter dva strokovna prispevka za revijo Čebelarstva zveze Slovenije 'Slovenski čebelar' (povzetek rezultatov projekta s predlogi za izboljšavo čebelarstva prakse, povzetek rezultatov anketnega poizvedovanja). O rezultatih in posledicah naših ugotovitev smo tudi že razpravljali s pristojnimi na UVHVVR ter pripravljali ukrepe (UVHVVR, MKGP).

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ v mednarodnih znanstvenih krogih
☐ pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹²

- (i) Stalno sodelovanje v povezavi NRL-jev držav članic EU pod vodstvom EURL za zdravstveno varstvo čebel.
- (ii) Sodelovanje z Inštitutom Friedrich Loeffler (FLI, Nemčija).
- (iii) Usposabljanje diplomantke iz Veterinarske fakultete (VF) v Zagrebu na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo VF ter Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele VF, diagnostika vzorcev iz Hrvaške ter somentorstvo pri diplomski nalogi (v teku).
- (iv) Sodelovanje v projektu pomoči pri razvoju čebelarstva v Gani.

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹³

- (i) Udeležba na letnih srečanjih EURL oktobra 2019 in 2020 ter izmenjava znanja s sodelujočimi strokovnjaki iz drugih držav, sodelovanje v medlaboratorijskih kontrolah, tudi s področja hude gnilobe čebelje zalege (PLMICRO19-V00).
- (ii) Pridobitev seva *Paenibacillus larvae* ERIC V.
- (iii) Študentka zaključnega letnika VF iz Zagreba (Klara Zubak) se je v okviru ERASMUS+ usposabljala na VF, kjer je opravila del obveznosti za diplomsko delo pod somentorstvom članov projektne skupine, sodelovanje z VF Zagreb tudi na področju analize vzorcev čebel in drugih opraševalcev, recenzije strokovnih in znanstvenih člankov ter programov izobraževanja.
- (iv) Člani projektne skupine sodelujejo v projektu pomoči pri razvoju čebelarstva v Gani (Feasibility study and support for the bee industry in Ghana), ki ga financira Medex Honey Limited, predvsem na področju zdravstvenega varstva čebel. Do sedaj je bila izvedena analiza stanja z laboratorijskimi preiskavami vzorcev ter priprava pilotnega projekta.

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen 
	Uporaba rezultatov	V celoti 

Komentar**F.01**

- (i) Vpeljava masne spektrometrije MALDI-TOF za bakterijo P. larvae.
- (ii) Postavitev molekularne metode qPCR in prva uporaba dPCR za kvantifikacijo spor P. larvae v medu in drobirju. Gojiščna števna preiskava se je izkazala kot nezanesljiva za štetje spor P. larvae v vzorcih.
- (iii) Vpeljava metode ERIC-PCR za tipizacijo bakterije P. larvae in prva uporaba kapilarne elektroforeze za ERIC-tipizacijo (lažja analiza in primerjanje profilov).
- (iv) Vpeljava metode WGS za tipizacijo bakterije P. larvae, razvoj sheme wgMLST (sedaj vključena v BioNumerics, harmonizacija analize).

F.02

- (i) Kvantifikacija spor P. larvae: faktor kalitve spor, statistično značilne razlike.
- (ii) Tipi P. larvae: v Sloveniji prevladuje tip ERIC II, nov sekvenčni tip.
- (iii) Preiskave izbruhov HGČZ: določitev genetske meje za opredeljevanje izbruhov, nezadostna moč razlikovanja tipizacijskih metod ERIC-PCR in MLST, ugotovitev (nekaterih) razlogov za širjenje HGČZ v Sloveniji na podlagi WGS in pridruženih metapodatkov.

F.03

Večja usposobljenost predvsem za kvantifikacijo spor P. larvae v čebeljih vzorcih (qPCR, dPCR) in tipizacijo bakterije P. larvae (ERIC-PCR, WGS).

F.16

Postavitev stabilne bioinformacijske sheme wgMLST za P. larvae in znatna dopolnitev genomske baze za P. larvae (opisano v točki 8, dosežek 4).

F.17

Laboratorijske metode, ki so bile razvite/izboljšane med izvajanjem projekta, smo prenesli v vsakodnevno delo in tako posodobili rutinsko diagnostiko bakterije P. larvae in njeno epidemiološko spremljanje.

F.18

Ekipa veterinarjev za zdravstveno varstvo čebel vsakodnevno opravlja klinične preglede čebeljih družin, svetuje čebelarjem glede preventive in zatiranja bolezni ter izvaja izobraževanja, poleg tega pa sodeluje pri raziskovalnem delu. Opisano tudi v točki 8, dosežek 5.

Rezultate projekta smo že predstavili sofinancerju MKGP in zainteresirani javnosti, vključno s člani Čebelarke zveze Slovenije, dne 25.1.2021 preko spletne platforme Zoom. Na znanstvenih konferencah smo predstavili sedem prispevkov (COBISS.SI-ID 52607747, 44930307, 44928515, 44928003, 32901379, 32931075, 4881530).

F.21

Izdelava novega testa in vpeljava metode qPCR za kvantifikacijo spor P. larvae v vzorcih medu in drobirja; test je primeren tako za diagnostične kot raziskovalne namene.

F.22

- (i) Izboljšanje klasične bakteriološke preiskave na bakterijo P. larvae z vpeljavo metode MALDI-TOF.
- (ii) Izboljšanje tipizacije z metodo ERIC-PCR z vpeljavo kapilarne elektroforeze za analizo pomnožkov.
- (iii) Razširitev obstoječe mikrobiološke zbirke izolatov P. larvae na VF ter priprava natančne podatkovne zbirke za izolate in pridružene podatke. Pridobitev genomskih zaporedij za 202 izolata P. larvae. Vse to bo omogočalo prospektivno epidemiološko spremljanje P. larvae.

F.27

Kranjska čebela je slovenska avtohtona pasma. Pomemben je vsak prispevek na področju izboljšanja njenega zdravstvenega stanja.

F.35

Izvedba dveh dijaških raziskovalnih nalog (opisano v točki 9).

13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja					
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja					
G.01.03.	Drugo:					
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu					
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov					
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje					
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije					
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti					
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost					
G.02.07.	Večji delež izvoza					
G.02.08.	Povečanje dobička					
G.02.09.	Nova delovna mesta					
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih					
G.02.11.	Nov investicijski zagon					
G.02.12.	Drugo:					
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti					
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti					
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij					
G.03.04.	Drugo:					
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja					
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja					
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave					
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti					
G.04.05.	Razvoj civilne družbe					
G.04.06.	Drugo:					
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura					
G.07.02.	Prometna infrastruktura					
G.07.03.	Energetska infrastruktura					
G.07.04.	Drugo:					
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					

G.09.	Drugo:						
--------------	---------------	--	--	--	--	--	--

Komentar

G.01.01

Določene vsebine bodo dodane v dodiplomsko izobraževanje s področja mikrobiologije (člani projektne skupine so vključeni tudi v izobraževanje na VF).

G.02.06

Na osnovi rezultatov projekta pričakujemo izboljšave na področju ugotavljanja in preprečevanja hude gnilobe čebelje zalege (HGČZ) ter sanacije žarišč. S tem bomo zmanjšali ekonomske izgube čebelarjev zaradi stroškov sanacije, izgube čebeljih družin ter prepovedi premikov zaradi paše in prodaje čebeljih družin, s čimer se bo povečala konkurenčnost čebelarstva dejavnosti v Sloveniji.

G.03.03

V okviru projekta smo na novo razvili dve pomembni molekularni tehniki (tehnologiji): (i) test qPCR na osnovi tehnologije TaqMan, ki omogoča kvantifikacijo spor *P. larvae*. Test bo omogočal analizo večjega števila čebeljih vzorcev (kot presejalna metoda), pomemben pa je tudi v globalnem merilu; (ii) shema wgMLST za tipizacijo bakterije *P. larvae* na ravni celotnega genoma (WGS). Shema je implementirana v komercialnem bioinformacijskem programskem orodju BioNumerics, ki ga uporablja veliko držav/laboratorijev, zato bo omogočala harmonizirano analizo podatkov WGS za bakterijo *P. larvae* tudi v globalnem merilu.

G.05.

Izboljšanje zdravja in preživetja kranjske čebele kot slovenske avtohtone pasme čebel ter s tem povezane in v svetu edinstvene ljudske umetnosti panjskih končnic in tipične arhitekture v gradnji čebelnjakov.

G.06.

Bakterija *P. larvae* prizadene vse vrste iz rodu *Apis*, med katerimi ima pomembno opraševalsko vlogo medonosna čebela (*A. mellifera*). Boljši nadzor in preprečevanje širjenja HGČZ pomeni izboljšanje zdravstvenega stanja čebel, kar z okoljskega vidika zaradi učinkovitega opraševanja rastlin pomeni vzdrževanje biotske raznovrstnosti.

14. Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi Javnih razpisov za sofinanciranje ciljnih raziskovalnih projektov za leta 2017, 2018 in 2019¹⁴

<https://www.vf.uni-lj.si/podrocje/ugotavljanje-poti-sirjenja-hude-gnilobe-cebelje-zalege-z-genetsko-tipizacijo-sevov>

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni;
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki (v primeru, da poročilo ne bo oddano z digitalnima podpisoma);
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta;
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije prijaviteljice:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Veterinarska
fakulteta

Darja Kušar

ŽIG

Datum: 11.5.2021

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2021/8

- ¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)
- ² Navedite cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- ³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- ⁴ Navedite morebitna bistvena odstopanja in spremembe od predvidenega programa dela raziskovalnega projekta, zapisanega v prijavi raziskovalnega projekta. Navedite in utemeljite tudi spremembe sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta. Če sprememb ni bilo, navedite »Ni bilo sprememb«. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)
- ⁵ Navedite dosežke na raziskovalnem področju, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FORD področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)
- ⁶ Navedite dosežke na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti, ki so nastali v okviru tega projekta. Dosežke iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FORD področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.
- Dosežek na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti je po svoji strukturi drugačen kot dosežek na raziskovalnem področju. Povzetek dosežka na raziskovalnem področju je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.
- Povzetek dosežka na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)
- ⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. v sistemu COBISS rezultat ni evidentiran). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)
- ⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹⁴ Izvajalec mora za projekte, odobrene na podlagi Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2017« v letu 2017 in Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2019« v letu 2019 ter Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2018, na spletnem mestu svoje RO odpreti posebno spletno stran, ki je namenjena projektu. Obvezne vsebine spletne strani so: vsebinski opis projekta z osnovnimi podatki glede financiranja, sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS, faze projekta in njihova realizacija, bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta ter logotip ARRS in drugih sofinancerjev. Spletna stran mora ostati aktivna še 5 let po zaključku projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2021 v1.00
D7-0D-A3-48-D3-FB-C3-38-4B-D4-76-AC-3E-A5-3D-E6-C7-70-63-99

Elaborat_priloga k ARRS-CRP-ZP-2021/8

CRP V4-1804

**Ugotavljanje poti širjenja hude gnilobe čebelje zalege z genetsko tipizacijo
sevov povzročitelja bolezni**

1.11.2018–31.10.2020 (30.11.2020)

Raziskovalni projekt Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2018

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani



Ljubljana, junij 2021

Sofinancerji:	ARRS (Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS) MKGP (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS)
Skrbnik pogodbe MKGP:	Metka Kalinšek
Vsebinski spremljevalec:	Marko Potočnik
Številka projekta:	V4-1804
Trajanje projekta:	1.11.2018 – 31.10.2020 (30.11.2020; <i>podaljšano brez financiranja: dopis MKGP št. 631-8/2018/19 z dne 12.6.2020</i>)
Naslov projekta:	Ugotavljanje poti širjenja hude gnilobe čebelje zalege z genetsko tipizacijo sevov povzročitelja bolezni (angl. <i>Genotyping of the American foulbrood causative agent as a tool to determine the transmission routes of the disease</i>)
Ključne besede projekta:	huda gniloba čebelje zalege (angl. <i>American foulbrood</i> , AFB), <i>Paenibacillus larvae</i> , poti širjenja, kužni krog, genotipizacija, ERIC-PCR, sekvenciranje celotnih genomov (angl. <i>whole genome sequencing</i> , WGS)
Nosilna RO:	Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta (VF)
Sodelujoče RO:	Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta (VF)
Raziskovalno področje (ARRS):	4.04.02 Biotehnika/Veterina/Animalna patologija in epizootiologija
Raziskovalno področje (FOS):	4.03 Kmetijske vede in veterina – Veterina
Vodja projekta (in šifra):	Darja Kušar ^a (24296), e-mail: darja.kusar@vf.uni-lj.si
Ostali člani projektne skupine:	Jana Avberšek ^a , Majda Golob ^a , Biljana Hacin ^b , Vlasta Jenčič ^c , Mira Jenko Rogelj ^d , Alenka Jurič ^e , Maja Kavalič ^a , Tanja Knific ^a , Olga Kosar ^a , Maja Lepen ^a , Matjaž Ocepek ^a , Bojan Papič ^a , Mateja Pate ^a , Metka Pislak Ocepek ^c , Suzana Skerbiš ^b , Anita Vraničar Novak ^f , Jerica Vreček Šulgaj ^c , Urška Zajc ^a , Irena Zdovc ^a , Alenka Žugelj ^g , Lucija Žvokelj ^c

^a VF, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

^b VF, Nacionalni veterinarski inštitut, Enota Nova Gorica, Pri hrastu 18, 5000 Nova Gorica

^c VF, Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

^d VF, Nacionalni veterinarski inštitut, Enota Kranj, Kranjska cesta 16, 4202 Naklo

^e VF, Nacionalni veterinarski inštitut, Enota Celje, Trnoveljska cesta 1, 3000 Celje

^f VF, Nacionalni veterinarski inštitut, Enota Novo mesto, Šmarješka cesta 2, 8000 Novo mesto

^g VF, Nacionalni veterinarski inštitut, Enota Maribor–Ptuj, Šentiljska cesta 109, 2000 Maribor

Povzetek

Čebele imajo pomembno gospodarsko, še bolj pa ekološko vlogo kot opraševalke rastlin. Huda gniloba čebelje zalege (HGČZ; ang. *American foulbrood*, AFB) je ena izmed najhujših bolezni čebelje družine. Povzroča jo po Gramu pozitivna bakterija *Paenibacillus larvae*. Ličinke se okužijo s sporami *P. larvae* preko kontaminirane hrane. Spore so zelo odporne proti številnim okoljskim dejavnikom in lahko ostanejo infektivne več desetletij. Zaradi bolezni postopoma oboleva in odmira čebelja zalega, razvije se hudo pomanjkanje zalege in s tem priliv mladih čebel, dokler bolne čebelje družine popolnoma ne propadejo. Za uspešno zatiranje hude gnilobe je najučinkovitejši ukrep uspešno preprečevanje širjenja bolezni. Bolezen se zatira v skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege (Uradni list RS, št. 10/20 in 61/20). Okoli na novo odkritega žarišča bolezni se uvede zapora premikov čebel in čebelarke opreme v polmeru 3 km (t. i. kužni krog ali okuženo območje), dokler se žarišče ne sanira in se klinično pregledajo vse čebelje družine znotraj zapore. Če se znotraj zapore ugotovi novo žarišče, se kužni krog ustrezno razširi.

Projekt V4-1804 je bil usmerjen v zmanjšanje izgub v čebelarstvu zaradi HGČZ. V okviru projekta smo analizirali retrospektivno (iz let 2017 in 2018) in prospektivno (iz leta 2019) pridobljene izolate *P. larvae*. Izolati so bili pridobljeni iz medu in zalege iz evidentiranih izbruhov HGČZ v Sloveniji. Prvi doprinos projekta so podatki pridobljeni iz **anketnega vprašalnika** za čebelarje in veterinarje, s katerim smo pridobili natančen vpogled v vzorec populacije čebelarjev in čebelarke prakse pri nas. Poleg tega smo identificirali glavne dejavnike tveganja za pojav HGČZ in ugotovili značilne razlike v pojavnosti kliničnih znakov med tipoma ERIC I in II. Drugi doprinos projekta je vpeljava masne spektrometrije **MALDI-TOF** za fenotipsko identifikacijo izolatov, kar je znatno skrajšalo čas bakteriološke preiskave na bakterijo *P. larvae*. Tretji doprinos je razvoj visoko specifičnega in zanesljivega molekularnega testa **qPCR** (PCR v realnem času) za kvantifikacijo spor *P. larvae* v čebeljih vzorcih, ki do sedaj ni bil na voljo. Test smo vpeljali za vzorce medu in dodatno še za vzorce drobirja. Za določitev absolutnega števila spor *P. larvae* v čebeljih vzorcih smo test qPCR kot prvi umerili z digitalnim PCR (dPCR). Primerjava števila spor *P. larvae* v medu, ki smo jo določili s števno gojiščno preiskavo in testom qPCR, ter intenziteto kliničnih znakov HGČZ v pripadajočih čebeljih družinah je pokazala, da imajo vzorci medu iz klinično pozitivnih družin značilno večje število spor kot tisti iz klinično negativnih družin. Kvantifikacija z metodo qPCR je pokazala večje število spor v medu in se izkazala za bolj občutljiva kot števna gojiščna preiskava. Primerjava metod je pokazala na slabo in nekonsistentno kalitev spor *P. larvae*; v povprečju je bil faktor kalitve 0,52 % in je imel velik razpon (0,04–6,05 %). Četrty doprinos projekta je vpeljava metode **ERIC-PCR** za tipizacijo izolatov *P. larvae*. Za razliko od predhodnih raziskav smo v okviru projekta z metodo ERIC-PCR tipizirali veliko število izolatov (583 izolatov *P. larvae* iz let 2017–2019). Za analizo pomnožkov smo kot prvi uporabili kapilarno elektroforezo (Qiaxcel), kar je znatno izboljšalo zanesljivost in primerljivost pridobljenih profilov. Odkrili smo dva nekoliko spremenjena profila ERIC I ('Ia' in 'Ib'); zanju se je po tipizaciji WGS sicer izkazalo, da ne predstavljata novih (pod)tipov ERIC. Gre za prvo raziskavo pogostnosti tipov ERIC v Sloveniji, ki je pokazala, da za razliko od situacije v Evropi in po svetu pri nas prevladuje tip ERIC II (70,2 %), sledi pa mu ERIC I. Peti doprinos je vpeljava metode **WGS** (sekvenciranje celotnih genomov) za bakterijo *P. larvae*, ki je trenutno najboljša možna metoda za genotipizacijo patogenih mikroorganizmov; v kombinaciji s pridruženimi epidemiološkimi/epizootiološkimi podatki omogoča ugotavljanje poti širjenja in opredelitev izbruhov bolezni. Za namen bioinformacijske obdelave

podatkov WGS smo na novo razvili stabilno shemo wgMLST (tipizacija na osnovi zaporedij lokusov celotnega genoma) s 5745 lokusi, ki je implementirana v splošno uporabljeno programsko opremo BioNumerics in bo tako omogočala standardizirano analizo wgMLST za bakterijo *P. larvae* in izmenjavo rezultatov med laboratoriji. Na ta način bo olajšano epidemiološko spremljanje bakterije *P. larvae* v svetovnem merilu. V okviru projekta smo določili tudi okvirno genetsko mejo med izolati (≤ 35 alelov wgMLST), s katero lahko zanesljivo zamejimo gruče genetsko povezanih (klonalnih) izolatov ter s tem dokončno potrdimo izbruhe in poti prenosa HGČZ. Ugotovili smo, da klasični tipizacijski metodi ERIC-PCR in MLST (tipizacija na osnovi zaporedij sedmih lokusov) nimata zadostne moči razlikovanja za analizo gruč ter da z metodo WGS lahko zanesljivo napovemo tudi tip ERIC in MLST. Odkrili smo nov tip MLST (sekvenčni tip ST30); njegovo odkritje kaže, da genetska raznolikost bakterije *P. larvae* ostaja slabo poznana. V okviru projekta smo z obsežnim sekvenciranjem celotnih genomov (202 izolata *P. larvae* iz let 2017–2019) znatno povečali število genomskih zaporedij v javno dostopnih podatkovnih bazah, ki predstavljajo temelj za prihodnje genomske raziskave tega pomembnega patogena čebel.

Rezultati pridobljeni v okviru projekta so pokazali, da je velikost kužnega kroga s polmerom 3 km okrog žarišča dovolj obsežna, da zajame prenose okužbe, ki so posledica naravne aktivnosti čebel. V primeru ugotovitve istega klona *P. larvae* na razdaljah, ki močno presegajo preletno razdaljo čebel (tudi 20 km in več), lahko upravičeno sklepamo na širjenje okužbe s prevozom, najverjetneje bolnih čebeljih družin. Ker je bilo potrjenih več takih primerov, lahko ugotovimo, da je v Sloveniji pomemben dejavnik širjenja HGČZ prevoz bolnih čebel, zato bi bilo smiselno uvesti občasne veterinarske klinične preglede družin pred prevozom. Hkrati smo na posameznih področjih ugotovili na razdalji, ki je bistveno manjša od 3 km, dva ali več nesorodnih klonov povzročitelja. Te okužbe smo odkrili naključno, ker so bile prisotne na lokaciji kliničnih pregledov čebeljih družin v kužnem krogu in izvirno niso bile povezane s prvotno ugotovljenim žariščem bolezni. Na osnovi navedenega lahko sklepamo, da je huda gniloba prisotna tudi v posameznih čebelnjakih, kjer iz različnih razlogov (še) ni bila ugotovljena, zato priporočamo uvedbo monitoringa, s katerim bi odkrili in sanirali vsa žarišča bolezni. V primeru uvedbe takega načina odkrivanja bolezni širom po državi kot trajnega ukrepa, bi lahko obseg kužnega kroga zožili, s tem pa zmanjšali ekonomsko škodo v čebelarstvu zaradi zapor premikov čebel.

Summary

In addition to their important economical role, honeybees have a crucial ecological role as plant pollinators. American foulbrood (AFB) is one of the most devastating honeybee diseases. AFB is caused by the gram-positive bacterium *Paenibacillus larvae*. Honeybee larvae become infected by ingesting spore-contaminated food. Spores are extremely resistant and can remain infectious for decades. Due to AFB, the bee brood gradually becomes diseased and dies, leading to a severe deficit of honeybee brood and consequently of young bees, until the affected honeybee colonies are completely destroyed. The most efficient measure for AFB control is to prevent its spread. Control of the disease is carried out in accordance with the Regulations on measures for the detection, control, notification and prevention of American foulbrood (Official Gazette of the Republic of Slovenia, No. 10/20 and 61/20). A 3-km embargo zone (also known as infection circle or AFB zone) is established around a newly detected AFB outbreak, and transport of honeybees and beekeeping equipment is prohibited until the outbreak is sanitized and all the honeybee colonies within the AFB zone are clinically inspected. If a new outbreak is detected within the AFB zone, the zone is expanded accordingly.

Project V4-1804 was aimed at reducing losses in beekeeping due to AFB. In this project, we analyzed *P. larvae* isolates collected both retrospectively (years 2017 and 2018) and prospectively (year 2019); these originated from honey and brood from confirmed AFB outbreaks in Slovenia. The first contribution of the project was the data obtained from the **questionnaire** for beekeepers and veterinarians, which we used to gain a detailed insight into the population sample of beekeepers and beekeeping practices in our country. In addition, we identified the main risk factors for the occurrence of AFB and found significant differences in the frequency of clinical signs between ERIC types I and II. The second contribution is the implementation of **MALDI-TOF** mass spectrometry for the phenotypic identification of isolates, which significantly reduced the time of bacteriological examination of *P. larvae*. The third contribution is the development of a highly specific and reliable molecular **qPCR** (real-time PCR) assay to quantify *P. larvae* spores in honeybee samples, which has not been developed before. The assay was validated for honey samples and additionally for hive debris samples. To determine the absolute number of *P. larvae* spores in honeybee samples, the qPCR assay was initially calibrated by digital PCR (dPCR). Comparison of *P. larvae* spore counts in honey samples determined by plate counting and qPCR assay with the intensity of the clinical symptoms of the disease in respective honeybee colonies showed that honey samples from AFB-positive colonies have significantly higher spore counts than those from AFB-negative colonies. Quantification by qPCR showed higher spore counts in honey samples and had a higher sensitivity compared with plate counting. Comparison of these two quantification methods revealed a low and inconsistent spore germination rate of *P. larvae*; on average, the germination rate was 0.52 % and had a high variation (0.04–6.05 %). The fourth contribution of the project was the implementation of **ERIC-PCR** for the typing of *P. larvae*. Contrary to other available studies, we typed a large set of isolates (583 isolates from years 2017–2019) by ERIC-PCR. For the first time, capillary electrophoresis (Qiaxcel) was used for amplicon analysis, which significantly improved the reliability and comparability of the obtained profiles. We discovered two slightly altered ERIC I profiles ('Ia' and 'Ib'); however, after WGS typing they were shown not to represent novel ERIC (sub)types. This is the first study on the frequency of ERIC types in Slovenia, which showed that, in contrast to the situation in Europe and worldwide, ERIC II (70.2 %) is the predominant type, followed by ERIC I. The fifth

contribution was the implementation of the whole-genome sequencing (**WGS**) for the typing of *P. larvae*, which is currently the ultimate method for the genotyping of pathogenic microorganisms and enables the identification of transmission routes and outbreak delineation when interpreted in combination with the associated epidemiological/epizootiological data. For WGS data analysis, we developed for the first time a stable whole-genome multilocus sequence typing (wgMLST) scheme for *P. larvae* consisting of 5745 loci, which is implemented in the commonly used BioNumerics software and will enable a standardized wgMLST analysis and facilitate the exchange of results between laboratories. The newly developed wgMLST scheme will improve the epidemiological surveillance of *P. larvae* worldwide. In this project, we also determined the approximate threshold (≤ 35 alleles wgMLST) to detect clusters of genetically closely related (clonal) isolates and thus reliably confirm AFB outbreaks and transmission routes. We showed that conventional typing methods (i.e., ERIC-PCR and MLST) lack the sufficient discriminatory power for cluster analysis, and that ERIC and MLST types can also be reliably predicted from WGS data. The discovery of a new MLST type (sequence type ST30) shows that the genetic diversity of *P. larvae* is still poorly understood. This project significantly contributed to the number of genomic sequences deposited in the publicly available databases by sequencing a large set of isolates (202 *P. larvae* isolates from 2017–2019), which represent a foundation for future genomic studies of this important honeybee pathogen.

The project results showed that the size of the infection circle with a radius of 3 km around the detected AFB outbreak is large enough to capture the transmissions of the infection resulting from the natural activity of honeybees. When detecting the same clone of *P. larvae* at distances far beyond the flight distance of honeybees (even 20 km and more), it is possible to suspect the spread of infection by transport, most probably of the diseased honeybee colonies. Since several such cases were confirmed, we could conclude that in Slovenia an important factor for the spread of AFB is the transport of diseased honeybees; thus, we suggest introducing the periodic veterinary clinical examinations of the honeybee colonies before transport. Also, we identified the presence of two or more unrelated clones of *P. larvae* in some areas at the distance much less than 3 km. These infections were discovered incidentally as they occurred at the location of clinical examinations of the honeybee colonies belonging to the newly defined infection circle and were not originally associated with the identified outbreak. From these results, we can conclude that AFB is also present in some apiaries, where it has not (yet) been identified for various reasons; thus, the introduction of monitoring to detect and sanitize all AFB outbreaks is recommended. If introducing such AFB-surveillance throughout the country as a permanent measure, the size of the infectious circle could be reduced, also reducing the economic damage in beekeeping due to the embargo put onto the apiaries.

Kazalo vsebine

Povzetek	1
Summary	3
Kazalo vsebine	5
Seznam preglednic	7
Seznam slik	7
Seznam kratic.....	8
1. OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI RAZISKAVE	9
2. PREGLED LITERATURE	11
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1. Pregled stanja v Sloveniji glede HGČZ in evidentiranje posameznih izbruhov (DS1)	15
3.1.1. Vzpostavitev podatkovne zbirke izolatov <i>P. larvae</i>	16
3.1.2. Priprava anketnega vprašalnika za epidemiološko poizvedovanje	16
3.2. Bakteriološka preiskava zalege in medu (DS2)	17
3.2.1. Izolacija bakterije <i>P. larvae</i>	17
3.2.2. Identifikacija <i>P. larvae</i> z metodo MALDI-TOF	18
3.3. Molekularna kvantifikacija spor <i>P. larvae</i> (DS3).....	18
3.3.1. Izolacija DNA iz vzorcev medu in drobirja	18
3.3.2. Izdelava testa qPCR za detekcijo in kvantifikacijo spor <i>P. larvae</i>	19
3.3.3. Izvedba metode qPCR in dPCR	19
3.3.4. Analitska učinkovitost testa qPCR.....	20
3.3.5. Validacija metode qPCR za vzorce medu in drobirja	21
3.3.6. Umerjanje metode qPCR z metodo dPCR	21
3.3.7. Kvantifikacija spor <i>P. larvae</i> v vzorcih medu in drobirja	22
3.3.8. Primerjava metod qPCR in dPCR	22
3.4. Tipizacija izolatov <i>P. larvae</i> z metodo ERIC-PCR (DS3)	23
3.4.1. Izolacija DNA iz bakterijskih kultur <i>P. larvae</i> za tipizacijo ERIC	23
3.5. Tipizacija izolatov <i>P. larvae</i> z metodo WGS (DS3)	23
3.5.1. Nabor izolatov <i>P. larvae</i> za WGS.....	23
3.5.2. Izolacija DNA iz bakterijskih kultur <i>P. larvae</i> za tipizacijo WGS in izvedba WGS	24
3.5.3. Izdelava stabilne sheme wgMLST	24
3.5.4. Bioinformacijska analiza podatkov WGS	24
3.5.6. Populacijska struktura izolatov <i>P. larvae</i> iz Slovenije	25

4. REZULTATI	25
4.1. Nabor izolatov <i>P. larvae</i>	25
4.2. Anketni vprašalnik za epidemiološko poizvedovanje	26
4.3. Identifikacija bakterije <i>P. larvae</i> z metodo MALDI-TOF	28
4.4. Kvantifikacija spor <i>P. larvae</i> v medu in drobirju.....	28
4.5. Tipizacija izolatov <i>P. larvae</i> z metodo ERIC-PCR.....	31
4.6. Tipizacija izolatov <i>P. larvae</i> z metodo WGS	34
5. RAZPRAVA	41
6. ZAKLJUČKI.....	46
6.1. Posodobitev priporočil za omejitev širjenja hude gnilobe čebelje zalege.....	47
7. PRIPOROČILA	48
8. VIRI	49
9. PRILOGE ELABORATA	51

Seznam preglednic

- Preglednica 1.** Test qPCR za pomnoževanje gena za metaloproteinazo (MP) bakterije *P. larvae*. (str. 19)
Preglednica 2. Protokol pomnoževanja z metodo qPCR. (str. 19)
Preglednica 3. Protokol pomnoževanja z metodo dPCR. (str. 20)
Preglednica 4. Analitski parametri metode qPCR za vzorce medu in drobirja. (str. 29)

Seznam slik

- Slika 1.** Umeritvena krivulja za kvantifikacijo spor *P. larvae* v vzorcih medu (A) in drobirja (B) z metodo qPCR. (str. 29)
Slika 2. Povezava med številom spor/g medu in klinično sliko v pripadajoči čebelji družini po števeni gojiščni preiskavi (A) in kvantifikaciji z metodo qPCR (B). (str. 30)
Slika 3. Grafikon Bland-Altman, ki prikazuje ujemanje metod qPCR in dPCR. (str. 30)
Slika 4. Profili ERIC, ki smo jih pridobili po ločitvi pomnožkov s kapilarno elektroforezo Qiaxcel (Qiagen). (str. 31)
Slika 5. Filogenetsko drevo wgMLST za globalni nabor genomov *P. larvae* ($n = 179$), v katerega so vključeni tudi izolati iz slovenskega izbruha, dodani pa genomi izolatov z ERIC profili 'Ia' in 'Ib' ($n = 38$). (str. 32)
Slika 6. Pojavnost tipov/profilov ERIC v Sloveniji glede na lokacijo (A) in čas (B). (str. 33)
Slika 7. Filogenetsko drevo wgMLST za globalni nabor genomov *P. larvae*, v katerega so vključeni tudi izolati iz slovenskega izbruha. (str. 35)
Slika 8. Minimalno vpeto drevo (MST) wgMLST za globalni nabor genomov *P. larvae*, v katerega so vključeni tudi izolati iz slovenskega izbruha. (str. 36)
Slika 9. Geografska porazdelitev klonov *P. larvae* v Sloveniji, pridobljenih z metodo WGS. (str. 37)
Slika 10. Primer širjenja klona *P. larvae* znotraj kužnega kroga in med kužnimi krogi. (str. 38)
Slika 11. Obsežen izbruh HGČZ v Sloveniji, 2017–2019. (str. 40)

Seznam kratic

AFB	angl. <i>American foulbrood</i> (huda gniloba čebelje zalege, HGČZ)
CFU	kolonijske enote (angl. <i>colony forming units</i>)
cgMLST	tipizacija na osnovi zaporedij lokusov jedrnega genoma (angl. <i>core-genome multilocus sequence typing</i>)
CV	koeficient variacije (angl. <i>coefficient of variation</i>)
Cq	pražni ali kvantifikacijski cikel pri qPCR (angl. <i>threshold cycle</i> ali <i>quantification cycle</i>)
CŽS	Čebelarska zveza Slovenije
dPCR	digitalni PCR (angl. <i>digital PCR</i>)
ERIC	enterobakterijska ponavljajoča se medgenska ohranjena zaporedja (angl. <i>enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences</i>)
HGČZ	huda gniloba čebelje zalege (angl. <i>American foulbrood</i> , AFB)
LOD	meja detekcije, meja zaznave (angl. <i>limit of detection</i>)
LOQ	meja kvantifikacije (angl. <i>limit of quantification</i>)
MALDI-TOF	masna spektrometrija MALDI-TOF (angl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>)
MLST	tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov (angl. <i>multilocus sequence typing</i>)
MST	minimalno vpeto drevo (angl. <i>minimum spanning tree</i>)
NGS	sekvenciranje naslednje generacije (angl. <i>next generation sequencing</i>)
NVI	Nacionalni veterinarski inštitut (VF–NVI)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>)
qPCR	PCR v realnem času (angl. <i>real-time PCR</i> ali <i>quantitative PCR</i>)
SNP	polimorfizmi posameznih nukleotidov (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
ST	sekvenčni tip (angl. <i>sequence type</i>)
UVHVVR	Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
VF	Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani
wgMLST	tipizacija na osnovi zaporedij lokusov celotnega genoma (angl. <i>whole-genome multilocus sequence typing</i>)
WGS	sekvenciranje celotnih genomov (angl. <i>whole genome sequencing</i>)
ZVČ	zdravstveno varstvo čebel

1. OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI RAZISKAVE

Čebele imajo pomembno vlogo tako v kmetijstvu in gospodarstvu, mnogo bolj pa kot oprasovalke kulturnih rastlin. Čebelarstvo v Sloveniji sodi med kmetijsko dejavnost z dolgoletno tradicijo, Slovenija pa je uveljavila zaščito avtohtone kranjske sivke (*Apis mellifera carnica*). Čebelje družine so podvržene številnim nalezljivim boleznim, med katerimi sta gospodarsko najpomembnejši varoza in huda gniloba čebelje zalege. Huda gniloba čebelje zalege (**HGČZ**; angl. *American foulbrood*, AFB) je zelo nalezljiva ter najbolj nevarna bakterijska bolezen medonosnih in drugih čebel (*A. mellifera* in drugih vrst iz rodu *Apis*), ki se pojavlja globalno. Povzročitelj bolezni je po Gramu pozitivna, sporogena bakterija *Paenibacillus larvae*, ki prizadene zelo mlade čebelje ličinke, medtem ko odrasle čebele za povzročitelja niso občutljive. Ličinke se okužijo s sporami *P. larvae* preko kontaminirane hrane. Mrtvo ličinko povzročitelj razgradi v vlecljivo maso, ki se kasneje posuši v suho lusko z milijoni spor. Te so zelo odporne proti številnim okoljskim dejavnikom in lahko ostanejo infektivne več desetletij. Zaradi bolezni se pojavi hudo pomanjkanje zalege, bolne čebelje družine oslabijo in popolnoma propadejo. Antibiotiki ne delujejo na spore *P. larvae* in z njihovo morebitno uporabo se okužba prikriva ter širi. Uporaba antibiotikov s strani čebelarjev zato ni dovoljena in v Evropi nobeno veterinarsko zdravilo nima dovoljenja za zdravljenje HGČZ.

Okužba z bakterijo *P. larvae* lahko v čebelji družini več mesecev poteka prikrito, v tem času pa se povzročitelj nevirano širi. Za uspešno zatiranje HGČZ je najučinkovitejši ukrep uspešno preprečevanje širjenja bolezni z dobro čebelarско prakso in preventivo. Posebno pozornost je treba nameniti nakupu matic in čebeljih družin, ki morajo izhajati iz čebelarstev s preverjenim zdravstvenim stanjem. Za širjenje okužbe so nevarni roji neznanega porekla, čebelji proizvodi ter nerazkužena čebelarška oprema. Čebelje družine je treba redno pregledovati ter menjavati satje v plodišču in preprečevati ropanje. Kadar sumimo na okuženo gospodarstvo, kjer še ni znakov bolezni, lahko za orientacijo odvezamo med, pri čemer se moramo zavedati določenih omejitev take preiskave (število spor v medu ne korelira vedno s pojavom bolezni). V primeru ugotovljene prisotnosti spor *P. larvae* v medu se čebelarju svetuje ukrepe za odstranitev čim večjega števila spor iz panjev, npr. z menjavo vsega satja ali pretresanjem čebel. Metoda za hitro in zanesljivo **kvantifikacijo** (ne le detekcijo) spor *P. larvae* v medu in drugih čebeljih vzorcih zaenkrat še ni na voljo, saj je znano, da štetje kolonij na bakterioloških gojiščih zaradi slabega in nekonsistentnega kaljenja spor ni zanesljivo, štetje spor pod mikroskopom je zamudno in nespecifično. Zanesljiva molekularna metoda, npr. PCR v realnem času (angl. *real-time PCR* ali *quantitative PCR*; **qPCR**), za kvantifikacijo spor *P. larvae* prav tako ni na voljo.

Zatiranje bolezni vključuje neškodljivo uničenje okuženih čebeljih družin, kontaminiranih panjev in satja ter opreme, ki je ni mogoče razkužiti. V redkih primerih, zlasti pri družinah v prizadetem čebelnjaku, ki ne kažejo znakov bolezni, in pri močnih družinah, kjer je bolezen še v začetnem stadiju, se lahko odločimo za pretresanje čebel. Ker se bolezen pogosto širi z nenadzorovanimi premiki čebel, je eden izmed ukrepov zatiranja HGČZ uvedba zaščitnega pasu okoli žarišča bolezni (t. i. kužni krog), ki v Sloveniji znaša 3 km. Na tem območju velja prepoved premikov čebel, dokler se žarišče ne sanira in se pregledajo vse čebelje družine znotraj zapore. Če se znotraj kužnega kroga ugotovi novo žarišče, se ta ustrezno razširi. Vse to lahko traja več mesecev in povzroča dodatno ekonomsko škodo čebelarjem zaradi onemogočenega prevoza čebel na pašo ter prepovedi trgovine z maticami in čebeljimi družinami. S pravilnikom (Pravilnik o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in

preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege; Uradni list RS, št. 10/20 in 61/20) predpisana zapora 3-km pasu okrog žarišča je bila določena na osnovi predvidene preletne razdalje čebel.

Za uspešno preprečevanje hude gnilobe je potrebno poznavanje poti prenosa bakterije *P. larvae* med čebelnjaki in čebelarstvu ter preučevanje izbruhov bolezni. Za ta namen je potrebno pridobljene izolate *P. larvae* tipizirati z metodo, ki ima visoko moč razlikovanja, ter rezultate interpretirati v kontekstu pridruženih epizootioloških podatkov (npr. lokacija čebelnjaka, oskrbovalec, zgodovina pojava bolezni, tip vzorca za izolacijo bakterije *P. larvae*, prodaja in nakup čebeljih družin ter prevoz na pašo). Kot predpogoj za kakršno koli tipizacijo je bakteriološka izolacija povzročitelja na gojiščih, ki vključuje tudi fenotipsko identifikacijo. Slednja je za bakterijo *P. larvae* zamudna, vendar se je v zadnjih letih kot hitra, cenovno ugodna in zanesljiva metoda za identifikacijo bakterij uveljavila masna spektrometrija **MALDI-TOF** (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*).

Za tipizacijo izolatov *P. larvae* se je do sedaj uporabljala predvsem metoda **ERIC-PCR**, ki temelji na pomnoževanju ponavljajočih se medgenskih ohranjenih zaporedij (angl. *enterobacterial repetitive intergenic consensus*, ERIC) z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Tipizacija ERIC izolate *P. larvae* razdeli v štiri oziroma od začetka leta 2020 v pet tipov ERIC (ERIC I–V), od katerih sta splošno razširjena le tipa ERIC I in II. V Sloveniji do sedaj metoda še ni bila uporabljena, poleg tega pa glede na njeno omejeno moč razlikovanja metoda ni uporabna za preučevanje poti širjenja in opredelitev izbruhov. Kljub vsemu je poznavanje tipa ERIC pomembno z vidika ugotavljanja klinično pomembnih lastnosti bakterije *P. larvae* (npr. hitrost pojavljanja kliničnih znakov), saj se tipa ERIC I in II pomembno ločita v svoji virulenci.

Boljšo moč razlikovanja ima genotipizacijska metoda **MLST** (tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov, angl. *multilocus sequence typing*), ki bakterijske izolate razvršča v sekvenčne tipe (angl. *sequence type*, ST), od katerih jih je danes znanih 30 (ob prijavi projekta 24). Metoda temelji na ugotavljanju zaporedij sedmih genov *P. larvae*, kar še vedno ne zagotavlja moči razlikovanja, s katero bi lahko ugotavljali poti širjenja, kljub vsemu pa je poznavanje tipov ST pomembno z vidika razumevanja genetske raznolikosti bakterije *P. larvae*.

Kot ultimativna metoda za tipizacijo bakterijskih patogenov se je v zadnjem času uveljavilo sekvenciranje celotnih genomov (angl. *whole genome sequencing*, **WGS**). Iz podatkov WGS lahko pridobimo številne informacije, tudi klasičen tip MLST, predvsem pa lahko na osnovi genomskih zaporedij zanesljivo identificiramo gruče genetsko povezanih (klonalnih) izolatov. Metoda WGS je bila za bakterijo *P. larvae* do sedaj samo enkrat uporabljena za preiskave izbruhov.

Projekt je potekal v štirih delovnih sklopih (DS): DS1 – Pregled stanja v Sloveniji glede HGČZ in evidentiranje posameznih izbruhov, DS2 – Bakteriološka preiskava zalege in medu, DS3 – Tipizacija izolatov *P. larvae* in molekularna kvantifikacija *P. larvae* v medu ter DS4 – Priprava smernic. Cilji projekta so bili usmerjeni v zmanjšanje izgub v čebelarstvu zaradi hude gnilobe:

- (i) Za retrospektivno (2017 in 2018) in prospektivno (2019) pridobljene izolate *P. larvae* iz celotne Slovenije sestaviti **podatkovno zbirko** izolatov s pridruženimi epizootiološkimi podatki; za izolate iz leta 2019 pripraviti tudi **anketni vprašalnik** za čebelarje za pridobivanje usmerjenih podatkov.

- (ii) Posodobiti bakteriološko diagnostiko, ki vključuje vpeljavo identifikacije izolatov *P. larvae* z masno spektrometrijo **MALDI-TOF**.
- (iii) Izdelati test (začetna oligonukleotida in sonda) in vpeljati molekularno metodo **qPCR** za hitro in zanesljivo **kvantifikacijo** spor *P. larvae* v vzorcih medu, dodatno pa tudi v vzorcih drobirja; metodo qPCR umeriti z metodo **dPCR** ter ugotoviti morebitno povezavo med številom spor in intenziteto kliničnih znakov bolezni v okuženih čebeljih družinah.
- (iv) Vpeljati laboratorijsko diagnostiko bakterije *P. larvae* z metodo **ERIC-PCR** ter večje število izolatov iz let 2017–2019 tipizirati za ugotavljanje pojavnosti tipov ERIC v Sloveniji in povezave tipa ERIC s pojavljanjem izbruhov hude gnilobe.
- (v) Vpeljati metodo **WGS** za tipizacijo bakterije *P. larvae* ter izbrane izolate (glede na pripadajoče epizootične podatke) tipizirati; za bioinformacijsko obdelavo podatkov WGS najprej izdelati stabilno shemo wgMLST, ki bo omogočala harmonizirano obdelavo podatkov WGS za bakterijo *P. larvae* med različnimi laboratoriji na svetovni ravni, nato pa opredeliti globalno populacijsko strukturo bakterije *P. larvae*, poti širjenja klonov *P. larvae* v Sloveniji ter postaviti genetsko mejo za opredelitev genetsko povezanih (klonalnih) izolatov, ki so udeleženi v izbruhih.
- (vi) Posodobiti priporočila za omejitev širjenja hude gnilobe: ugotoviti ustreznost 3-km kužnega kroga, pripraviti priporočila za čebelarje, veterinarje in veterinarske inšpektorje glede ukrepov pri pojavu hude gnilobe ter posodobiti shemo za redni monitoring medu.

2. PREGLED LITERATURE

Hudo gnilobo čebelje zalege (HGČZ) je v Evropski skupnosti (EU) po zakonu potrebno prijaviti in jo je Svetovna organizacija za zdravje živali (OIE) vključila na seznam obvezno prijavljivih bolezni (OIE, 2017). V skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege (Uradni list RS, št. 10/20 in 61/20) bolezni ne smemo zdraviti. V Sloveniji je HGČZ stalno prisotna v večjem ali manjšem obsegu, v primeru potrditve bolezni pa se izvajajo strogi veterinarsko-sanitarni ukrepi (Mehle in sod., 1994, Zdovc in sod., 2005). Poleg tega se vsako leto z gojiščno preiskavo pregledujejo vzorci medu iz posameznih čebelarstev, kjer obstaja večja verjetnost, da je povzročitelj prisoten, čeprav bolezen še ni klinično izražena (Žugelj in sod., 2017; Žugelj in sod., 2018; Pislak, 2018). Čeprav zatiranje bolezni vključuje sežiganje obolelih čebeljih družin, s sporami kontaminiranih panjev in čebelarskih pripomočkov, bolezen že stoletja ostaja nerešljiv problem.

Diagnostika HGČZ v Sloveniji trenutno temelji na klasični bakteriološki preiskavi, pri kateri izoliramo povzročitelja na gojiščih, ki spodbujajo kalitev spor in rast *P. larvae*. Na ta način ugotavljamo prisotnost ali odsotnost povzročitelja in posledično diagnosticiramo bolezen, nimamo pa podatkov o pojavljanju različnih (geno)tipov povzročitelja ali zanesljivega števila spor v preučevanih vzorcih. Morfološki tip kolonij *P. larvae* je do neke mere povezan s tipom ERIC (Genersch in sod., 2006; Bassi in sod., 2015), vendar je po podatkih raziskave v Italiji morfotip kolonij odvisen tudi od bakterijske pasaže (Bassi in sod., 2015). Diagnostika na osnovi biokemijskih lastnosti za bakterijo *P. larvae* traja 4–10 dni (Genersch in Otten, 2003; Genersch in sod., 2006). V bakterioloških diagnostičnih laboratorijih se v zadnjih letih za determinacijo (identifikacijo) bakterijskih vrst vse bolj uporablja masna spektrometrija **MALDI-TOF** (Ledina in sod., 2018). Tehnologija MALDI-TOF temelji na računalniški primerjavi masnega spektra preiskovanega izolata s spektri referenčnih bakterij v bazah

podatkov aparature, bakterijsko vrsto pa lahko zanesljivo določimo že v nekaj minutah, na primarno izraščeni kulturi (Croxatto in sod., 2011; Clark in sod., 2013; Singhal in sod. 2015). Schäfer in sod. (2014) so masno spektrometrijo MALDI-TOF vpeljali kot zanesljivo, hitro in poceni diagnostično metodo ne le za identifikacijo bakterije *P. larvae*, temveč tudi za razlikovanje tipov ERIC I in II. Zaradi premajhnega števila izolatov *P. larvae* tipov ERIC III in IV priprava referenčne podatkovne baze za ta dva tipa ni bila mogoča, zato analiza masnih spektrov ni bila statistično podprta.

Za povzročitelja HGČZ so občutljive le zelo mlade čebelje ličinke v starosti 12–36 h po izvalitvi iz jajčeca, okužijo pa se s hrano, ki je kontaminirana s sporami *P. larvae*; za izbruh bolezni naj bi zadoščalo že 10 spor (Genersch in sod., 2005). V neinvazivni fazi bolezni spore vzklijejo (germinirajo) v črevesju ličinke in bakterije se namnožijo do velikega števila. Neinvazivni fazi sledi invazivna, v kateri povzročitelj razgradi zaščitni sloj črevesnega epitelija, vdre v hemocel in povzroči smrt ličinke. Mrtvo ličinko povzročitelj v destruktivni fazi razgradi v vlecljivo maso, ki jo v končni fazi sestavljajo same bakterije. Ko vegetativnim oblikam začne primanjkovati hranil, začnejo sporulirati. Vlecljiva vsebina se posuši v suho lusko, ki vsebuje milijone spor *P. larvae* (Poppinga in Genersch, 2015). Te so zelo odporne proti dejavnikom okolja in po podatkih iz literature ostanejo infektivne več kot 35 let (Genersch, 2010). Za zamejitev HGČZ je zato ključnega pomena njeno preprečevanje in ugotavljanje poti širjenja spor *P. larvae*, tudi z namenom ugotavljanja ustreznosti velikosti kužnega kroga. Ob pregledu čebelnjakov se HGČZ v okuženem panju kaže kot presledkasta zalega s spremenjenimi pokrovcami satnih celic, ki so napolnjene z vlecljivo vsebino. V odvisnosti od tipa ERIC in stanja bolezni v panju opazimo bodisi veliko število spremenjenih satnih celic (tip ERIC I) bodisi so spremenjene le posamezne celice, ki jih čebelar ali pristojni veterinar ob pregledu čebelje družine lahko tudi spregleda (tip ERIC II) (Genersch, 2010).

Najpogosteje uporabljena metoda za kvantifikacijo spor *P. larvae* v čebeljih vzorcih je klasična gojiščna metoda (Nordström in sod., 2002; Gende in sod., 2011; Forsgren in Laugen, 2014; Bassi in sod., 2018). Znano je, da kvantifikacija spor *P. larvae* s števno gojiščno preiskavo ni zanesljiva zaradi sporogene narave bakterije *P. larvae* in je močno odvisna od genotipa bakterije *P. larvae*, tipa vzorca in vrste gojišča (Genersch in sod., 2005; Beims in sod., 2020a; Crudele in sod., 2020). Za molekularno kvantifikacijo *P. larvae* v čebeljih vzorcih je na voljo le nekaj testov **qPCR**, vendar se v praksi niso najbolje izkazali, so le kvalitativni (ne kvantitativni), niso bili validirani za kvantifikacijo v čebeljih vzorcih v skladu s smernicami MIQE za metodo qPCR (Bustin in sod., 2009) ali pa temeljijo na tehnologiji SYBR. Le dva obstoječa testa qPCR sta bila validirana na vzorcih medu in/ali drobirja (Martínez in sod., 2010; Rossi in sod., 2018), vendar oba temeljita na tehnologiji SYBR, ki ima v primerjavi s tehnologijo TaqMan slabšo specifičnost, ponovljivost in občutljivost (Matsenko in sod., 2008; Zhou in sod., 2017). Poleg tega oba testa pomnožujeta gen za 16S rRNA, ki je prisoten v osmih kopijah na genom in ni vrstno specifičen, kar otežuje zanesljivo kvantifikacijo. Dainat in sod. (2018) so razvili TaqMan test qPCR za sočasno določanje treh patogenov v vzorcu, vključno z bakterijo *P. larvae*, vendar metoda ne omogoča kvantitativne analize vzorcev, kar je sicer glavni doprinos metod qPCR.

Metoda **ERIC-PCR** je splošno razširjena metoda za tipizacijo bakterije *P. larvae*, katere rezultat so značilni profili pomnožkov (Alippi in sod., 2004). V začetku leta 2020 je bil poleg obstoječih štirih tipov ERIC I–IV (Genersch in sod., 2006) odkrit še peti, *P. larvae* ERIC V (Beims in sod., 2020b). Splošno razširjena sta le tipa ERIC I in II, ki se razlikujeta tudi fenotipsko, tj. po morfologiji bakterijskih

kolonij in spor ter biokemijskih lastnostih, najpomembnejša pa je razlika v virulenci (Genersch in Otten, 2003; Genersch in sod., 2006). Sevi tipa ERIC II (t. i. »hitri ubijalci«) so bolj virulentni na ravni posamezne čebelje ličinke in povzročijo smrt čebelje ličinke sedmi dan po okužbi, pred zaprtjem satnih celic. Odrasle čebele čistilke odmrlo zalego hitro in učinkovito odstranijo in s tem zmanjšajo količino spor v okuženi čebelji družini. Sevi tipa ERIC I (t. i. »počasni ubijalci«) so bolj virulentni na ravni celotne čebelje družine. Večina ličink odmre dvanajsti dan po okužbi, ko so satne celice že zaprte. Po zaprtju satnih celic čistilni nagon čebel ni dovolj učinkovit. Tvori se veliko število spor, s katerimi se bolezen širi znotraj družine in privede do njenega propada (Rauch in sod., 2009). Pri širjenju bolezni naj bi bili tako bolj učinkoviti manj virulentni sevi *P. larvae* (ERIC I), po drugi strani pa so pri sevih tipa ERIC II spremenjene le posamezne satne celice, kar se pri kliničnem pregledu panjev lahko spregleda in zato ne sanira pravočasno. Pri spremljanju izbruhov in širjenja bolezni je pomembno ugotoviti, kateri tip ERIC je povzročitelj okužbe, zaradi majhnega števila tipov *P. larvae* pa tipizacija ERIC ni uporabna za ugotavljanje poti širjenja ali podrobno opredelitev genetskih značilnosti povzročitelja HGČZ.

Večjo moč razlikovanja ima genotipizacijska metoda **MLST**, ki temelji na zaporedju sedmih genskih lokusov (*glpF*, *sigF*, *glpT*, *Natrans*, *rpoB*, *ftsA* in *clpC*), na osnovi katerih izolate *P. larvae* razvrščamo v sekvenčne tipe (Morrissey in sod., 2015). Število odkritih tipov MLST narašča; do danes jih je opisanih 30 (<https://pubmlst.org/plarvae/>). Za večino tipov MLST so znani tudi pripadajoči tipi ERIC. Z MLST-tipizacijo izolatov *P. larvae* iz mednarodne zbirke so ugotovili, da so nekateri sekvenčni tipi razširjeni globalno, medtem ko se drugi pojavljajo le lokalno (Morrissey in sod., 2015). Tudi metoda MLST nima zadostne moči razlikovanja, ki bi omogočala ugotavljanje poti širjenja bakterije *P. larvae* in preučevanje izbruhov HGČZ (Ågren in sod., 2017).

Preučevanje izbruhov in nadzor nad kužnimi boleznimi sta se močno izboljšala z vpeljavo metode NGS (sekvenciranje naslednje generacije, angl. *next generation sequencing*), ki ima v primerjavi z ostalimi tipizacijskimi metodami bistveno večjo moč razlikovanja. Ena od izvedb metode NGS je sekvenciranje celotnih genomov (angl. *whole genome sequencing*, **WGS**), ki v primeru analize posameznih genov oz. pristopa, ki temelji na alelih, omogoča ultimativno (razširjeno) analizo MLST. To pomeni, da lahko z metodo WGS izolate tipiziramo na ravni celotnega genoma oz. genov (lokusov), ki so vključeni v ožjo (cgMLST, angl. *core genome* MLST) ali širšo (wgMLST, angl. *whole genome* MLST) shemo za izbrano bakterijsko vrsto. Že v primeru pristopa cgMLST govorimo o več tisoč genih, ki so vključeni v tipizacijo izolatov: 3367 genov za *P. larvae* tipa ERIC I (od 4460 genov v celotnem referenčnem genomu) in 3373 genov za *P. larvae* tipa ERIC II (od 4060 genov v celotnem referenčnem genomu) (Ågren in sod., 2017).

Drugi pristop k analizi zaporedij celotnih genomov, ki jih pridobimo z metodo WGS, je ugotavljanje razlik med genomi preučevanih organizmov na osnovi polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP, angl. *single nucleotide polymorphism*) v celotnem genomu, tj. analiza SNP (angl. *SNP-based* pristop). Slednja omogoča najbolj verodostojno rekonstrukcijo filogenetskih (sorodstvenih) odnosov med preučevanimi izolati. Ugotavljanje sorodstvenih povezav med pridobljenimi izolati s pristopom wg/cgMLST ali analizo SNP je osnova za kakršne koli sodobne in zanesljive epidemiološke raziskave (ECDC, 2015).

Za določitev tipa cg/wgMLST z bioinformacijskimi orodji ugotavljamo alelne različice vsakega od več kot 1000 genov znotraj jedrnega/celotnega genoma, ki je pred-definiran znotraj tipizacijske sheme preučevanega organizma, kar pa je glavni omejujoč dejavnik te analize. Sprejete in vzdrževane tipizacijske sheme cg/wgMLST, ki so dostopne v mednarodnih zbirkah podatkov ali v okviru dostopnih bioinformacijskih orodij, so na voljo le za omejen nabor patogenov (Maiden in sod., 2013); shema cgMLST za razlikovanje izolatov *P. larvae* je pripravljena, definirana pa je v okviru programske opreme SeqSphere+ (Ridom) in je odvisna od nabora primerjanih izolatov oz. ni stabilna (Ågren in sod., 2017). Sheme, ki so na novo pripravljene v programu Ridom, žal niso prenosljive v drug pogosto uporabljen programski paket BioNumerics (Applied Maths NV, bioMérieux), ki ga je mnogo laboratorijev uporabljalo za rutinsko tipizacijo patogenov z včasih uveljavljeno molekularno metodo PFGE (elektroforeza v pulzirajočem električnem polju, angl. *pulsed-field gel electrophoresis*), danes pa je zelo uporaben tudi za analizo podatkov WGS s stabilnimi shemami wgMLST. Trenutno se razvijajo in vzdržujejo predvsem stabilne sheme cg/wgMLST, ki obravnavajo pomembne humane patogene, ostale bakterijske vrste pa so glede tega v precejšnjem zaostanku (Saltykova in sod., 2018).

Tipizacijski pristopi, ki temeljijo na analizi SNP, so po drugi strani bolj prilagodljivi, saj ne zahtevajo pred-definiranih shem. Omogočajo rekonstrukcijo filogenetskih odnosov med izolati, na osnovi primerjave mutacij SNP med preučevanimi izolati in referenčnim genomom. Analiza na osnovi SNP-mutacij omogoča izredno veliko ločljivost tipizacije (Cunningham in sod., 2017), vendar je zahtevnejša glede kapacitete strežnika za izvedbo analize in je odvisna od izbora referenčnega genoma. Poleg tega je manj primerna za standardizacijo in rutinsko tipizacijo patogenov.

Metoda WGS omogoča najboljše možno razlikovanje med izolati, poleg tega pa tudi pridobivanje dodatnih uporabnih informacij, kot je prisotnost genetskih determinant virulence in odpornosti proti antibiotikom (Saltykova in sod., 2018). Ta tehnologija se že uporablja pri preučevanju izbruhov in v epidemioloških raziskavah za pomembne humane patogene (Köser in sod., 2012; Jenkins in sod., 2015; Moura in sod., 2017) ter je vedno bolj v uporabi tudi za rutinsko tipizacijo patogenov. Rutinsko uporabo metode WGS za namen tipizacije in epidemiološkega nadzora kužnih bolezni v največji meri upočasnjujeta cena metode in zahtevnost analize (pridobivanje relevantnih podatkov iz velike količine pridobljenih informacij), vendar tudi cena v komercialnih sekvencijskih centrih za samo tehnično izvedbo sekvenciranja z razvojem metode WGS pada in je glede na veliko količino potencialnih podatkov, ki jih lahko pridobimo iz genomskih zaporedij, primerljiva z naborom sicer potrebnih testov. Za analizo pridobljenih zaporedij WGS so potrebna specialna bioinformacijska znanja, zaradi uveljavljanja metode WGS kot metode izbora za medlaboratorijske primerjave pri iskanju vira okužbe in preiskavah izbruhov pa je že na voljo nekaj uporabniku prijaznejših orodij za avtomatiziran potek analize. Postopek sekvenciranja je relativno primerljiv za različne bakterijske vrste, zato se lahko izvaja v sekvencijskih centrih, analiza podatkov WGS z bioinformacijskimi orodji pa je v veliki meri prilagojena preučevani mikrobnosti in je odvisna od kontinuiranega napredka tehnologij in rasti podatkovnih zbirk, tj. deponiranjem in analizo genomov izbranih mikroorganizmov (Saltykova in sod., 2018). Do sedaj je opisana le ena raziskava, ki je izbruhe HGČZ opredelila z metodo WGS (Ågren et al., 2017).

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Pregled stanja v Sloveniji glede HGČZ in evidentiranje posameznih izbruhov (DS1)

V Sloveniji imamo po zadnjih podatkih Sektorja za identifikacijo in registracijo ter informacijske sisteme (SIRIS) registriranih okrog 15.000 čebelnjakov, s katerimi čebelarji okrog 11.000 čebelarjev, zato je bila izbira gospodarstev omejena glede na predhodne podatke o pojavljanju HGČZ. V projekt smo vključili evidentirane izbruhe HGČZ iz različnih regij Slovenije, ki jih v skladu z določili Pravilnika o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege (Uradni list RS, št. 10/20 in 61/20) obravnavajo veterinarji za zdravstveno varstvo čebel (ZVČ) Veterinarske fakultete (VF) Univerze v Ljubljani, Nacionalnega veterinarskega inštituta (VF–NVI) in uradni veterinarji Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) na vseh regionalnih enotah. Število izbruhov na leto se po evidenci EPI/UVHVVR giblje med 50 in 100.

Ob začetku projekta (1.11.2018) smo pregledali obstoječo zbirko izolatov *P. larvae* s pridruženimi podatki (Excel, od leta 2017 naprej; pred tem je bilo shranjenih manj izolatov) iz vse Slovenije; centralno shranjevanje izolatov na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ s pridruženimi podatki, vključno epizootiološkimi, poteka na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo VF v Ljubljani. Tekom projekta smo želeli pridobiti še usmerjene podatke ter pridobiti še večje število izolatov iz vseh regionalnih enot VF–NVI. Na vseh omenjenih enotah VF–NVI deluje veterinar za ZVČ, ki opravlja vse aktivnosti na tem področju dela, od preventive, terenske diagnostike, zdravljenja in zatiranja bolezni, do svetovanja in izobraževanja čebelarjev ter raziskovalnega dela. V primeru suma na HGČZ veterinar za ZVČ VF–NVI v skladu s predhodno omenjenim pravilnikom opravi pregled vseh čebeljih družin na stojišču in v primeru ugotovljenih kliničnih znakov bolezni odvzame vzorce spremenjene zalege za laboratorijsko preiskavo. Za potrditev bolezni se šteje, ko sta izpolnjena dva kriterija: ugotovitev značilnih kliničnih znakov HGČZ in potrditev povzročitelja bolezni *P. larvae* z laboratorijsko preiskavo vzorca spremenjene zalege. Ko/če je bolezen potrjena, izda uradni veterinar UVHVVR odločbo, s katero predpiše ukrepe za sanacijo žarišča. Med temi ukrepi je prepoved premika čebel in čebelarjeve opreme v območju s polmerom 3 km okrog žarišča bolezni (t. i. kužni krog), uničenje obolelih čebeljih družin v žarišču bolezni in razkužba vse opreme, orodja, čebelnjaka in okolice čebelnjaka v žarišču, pregled vseh čebeljih družin znotraj kužnega kroga in po 30 dneh od končane sanacije žarišča tudi kontrolni pregled vseh preostalih čebeljih družin v čebelnjaku, kjer je žarišče bolezni. Kontrolni pregled žarišča je namenjen ugotavljanju morebitnih na novo pozitivnih čebeljih družin, pri katerih v času prvega pregleda klinični znaki bolezni še niso bili prisotni. Za pomoč pri nadzoru stanja čebeljih družin v žarišču in njegovi okolici veterinar ZVČ po lastni presoji lahko vzorči tudi med iz satov z zalego za laboratorijsko preiskavo na prisotnost spor *P. larvae*. Čeprav ugotovitev spor *P. larvae* v vzorcu medu ne pomeni potrditve bolezni, so družine, pri katerih so spore v medu bile ugotovljene, pod večjim nadzorom. V takem primeru se čebelarju svetujejo nekateri higienski in tehnološki ukrepi za zmanjšanje oz. odstranitev spor in s tem za preprečevanje morebitnega kasnejšega izbruha bolezni. Veterinar ZVČ vzorce spremenjene zalege ali medu označi s številko EPI in pripravi zapisnik EPI, rezultati bakteriološke preiskave pa se preko programa OrbitaLIMS (Epi Spektrum; <https://www.epi-spektrum.si/sl/informacijski-sistem-orbita/>) vnesejo v informacijski sistem EPI (<https://www.gov.si/zbirke/storitve/sistem-za-spremljanje-porocanje-in-obvescanje-o-bolezni-zivali-aplikacija-epi/>).

Vzorci spremenjene **zalege** iz čebeljih družin z ugotovljenimi kliničnimi znaki bolezni so bili odvzeti z vatirano paličico (bris), s katero je veterinar ZVČ obrisal notranjost spremenjene satne celice oz. iz nje povlekel vlecljivo maso. Vzorci so bili shranjeni v sterilne epruvete in dostavljeni v regionalni VF–NVI ali centralni laboratorij VF za bakteriološko preiskavo na *P. larvae*. Tako pridobljene izolate *P. larvae* smo uporabili v tem projektu. Vzorci **medu** odvzeti po presoji veterinarja ZVČ ob kliničnih pregledih čebeljih družin na osnovi odločbe uradnega veterinarja UVHVVR ter vzorci medu iz posameznih klinično negativnih, sumljivih ali pozitivnih čebeljih družin, ki smo jih odvzeli za potrebe tega projekta, so bili odvzeti s sterilnim lončkom ali žlico ter shranjeni v sterilne PVC lončke, v katere smo namestili več plasti gaze, da se je med tekom transporta in shranjevanja precedil skozi gazo in s tem ločil od voščenih delcev. Vzorce **drobirja** je veterinar ZVČ odvil občasno in po dogovoru za potrebe projekta. Drobir je bil odvil iz dna panja in spravljen v PVC lonček.

3.1.1. Vzpostavitev podatkovne zbirke izolatov *P. larvae*

V projekt smo vključili izbrane izolate iz zalege in medu, ki so bili pridobljeni v letih 2017–2019. Za namen projekta smo pripravili ločeno podatkovno zbirko Excel, kamor smo tekom analiz vnašali tudi specialne podatke (datum izolacije DNA, izvedba tipizacije ERIC in tip ERIC, oznaka za WGS in oznaka izvedbe WGS, kužni krog in pridružene opombe). Izolate smo izbrali glede na epizootiološke in tekom projekta druge pridobljene podatke: čebelar (kdo, naslov), čebelnjak (ID registrska številka čebelnjaka, KMG-MID številka čebelarstva), panj, datum vzorčenja, tip vzorca (zalega, med), pripadnost kužnemu krogu (okvirni podatki, ker se kužni krogi med sabo lahko časovno in prostorsko prekrivajo), tip ERIC (da smo zajeli izolate razporejene po celi Sloveniji, tj. vsaj en izolat *P. larvae* na čebelnjak, ki je bil na voljo v zbirki; v primeru pojava novih podtipov ERIC smo analizirali večje število izolatov, prav tako pa v primeru proučevanja raznolikosti bakterije *P. larvae* znotraj istega panja, čebelnjaka in čebelarstva) in drugo (sorodstveni odnosi med čebelarji, oskrbovanje drugih čebeljakov, čebelnjaki istega čebelarja na različnih lokacijah, prevoz na pašo idr.).

Vse izbrane izolate *P. larvae* iz let 2017–2019 smo po vpeljavi metode ERIC-tipizirali, od teh pa jih glede na tip ERIC in epizootiološke podatke odbrali za tipizacijo z metodo WGS. Po nasajanju shranjenih (iz let 2017 in 2018) ali pridobljenih (v letu 2019) izolatov *P. larvae* na bakteriološka gojišča za pridobitev sveže bakterijske kulture za izolacijo genomske DNA smo izolate ponovno determinirali, z vpeljano metodo masne spektrometrije MALDI-TOF. Za čebelnjake smo glede na njihove številke ID ob pomoči UVHVVR pridobili geografske koordinate v ustrezni obliki, za namen izrisa na zemljevidu Slovenije in ugotavljanja razdalj med čebelnjaki.

3.1.2. Priprava anketnega vprašalnika za epidemiološko poizvedovanje

Za preučitev trenutnega stanja, možnih vplivov različnih dejavnikov na pojavnost HGČZ v slovenskih čebelarstvih in ugotavljanje razlik v klinični sliki med tipi ERIC smo pripravili anketni vprašalnik za čebelarje in veterinarje (**priloga 1**). Osnutek anketnega vprašalnika je zasnovala delovna skupina raziskovalcev na VF, pregledali in testirali pa so ga izkušeni regionalni veterinarji za ZVČ, zaposleni na VF–NVI. Na podlagi njihovih pripomb je bila izdelana končna verzija, ki je bila sestavljena iz dveh delov. Prvi del vprašalnika je veterinar izročil čebelarju v izpolnjevanje ob pregledu čebelnjaka. Vprašalnik je vseboval podatke o čebelarju (osnovni podatki o čebelarju, čebelarstvo, namen čebelarjenja, izobrazba idr.), čebelarstvu (število čebeljih družin, promet s čebelami in prodaja/nakup

v preteklih treh letih, paša, tehnologija čebelarjenja, čebelarjeva ocena razmer čebelnjaka in biovarnosti idr.) in zdravju čebel (zgodovina HGČŽ, druge bolezni, zdravljenja idr.). Drugi del vprašalnika je izpolnil veterinar in je vseboval opis razloga za pregled čebelnjaka, oceno razmer čebelarjenja in podroben seznam kliničnih znakov. Vprašalniki so bili izpolnjeni v letu 2019 in so bili dodani kot priloga zapisniku o odvzemu vzorcev. Večina čebelarjev, povabljenih k sodelovanju, je imela čebelnjake znotraj kužnih krogov in so bili pregledani na podlagi odločbe ali pa so bili pregledani zaradi suma na HGČŽ. Poleg teh so bili opravljeni tudi dodatni pregledi in vzorčenja, da smo pridobili zadostno število čebelnjakov negativnih na HGČŽ.

Podatki iz vprašalnikov so bili zbrani v preglednici Excel in dopolnjeni s podatki o tipih ERIC. Za statistično analizo smo uporabili program R v3.6.2 (R Core Team; <https://www.r-project.org/>). Številске podatke smo opisali z osnovnimi opisnimi statistikami, opisne podatke pa s frekvenčami in deleži. Testirali smo razlike med HGČŽ-pozitivnimi in negativnimi čebelnjaki ter med tipoma ERIC I in II. Normalnost porazdelitve številskih spremenljivk smo testirali s Shapiro-Wilk testom. Ker spremenljivke niso bile normalno porazdeljene, smo za primerjave med skupinami uporabili neparametrični Wilcoxonov test vsote rangov. Povezanost opisnih spremenljivk s statusom čebelnjaka ali s tipom ERIC smo ugotavljali s hi-kvadrat testom, ko je bila izpolnjena predpostavka o pričakovanih frekvencah ali Fisherjevim eksaktnim testom. Merilo za statistično značilnost je bila vrednost $p < 0,05$.

3.2. Bakteriološka preiskava zalege in medu (DS2)

3.2.1. Izolacija bakterije *P. larvae*

Postopek izolacije sledi priporočilom iz priročnika OIE (OIE, 2018). Vzorce medu smo pred nasajanjem na gojišča pred-pripravili. Med smo segreli na 45–50 °C, da je postal bolj tekoč in odtehtali 50 g v sterilno centrifugirko. K vzorcem smo dodali 150 ml tople sterilne vode in dobro premešali, da smo dobili homogeno suspenzijo, ki smo jo centrifugirali 30 min pri 4.000 g (Multifuge 1 S-R, Heraeus). Po centrifugiranju smo supernatant previdno odlili in na dnu centrifugirke pustili 1–2 ml sedimenta. Sediment smo odpipetirali v sterilno epruveto in mu dodali 9 ml sterilne fiziološke raztopine ter homogenizirali (suspenzija 1). Za uničenje vegetativnih oblik bakterije *P. larvae* smo suspenzijo segrevali 10 min pri 80 °C. S fiziološko raztopino smo pripravili še dve zaporedni 10-kratni redčitvi suspenzije (suspenziji 2 in 3).

Brise zalege ter za vzorce medu vse tri pripravljene razredčine suspenzij (500 µl) smo nasadili na trdna gojišča BHIA (angl. *Brain Heart Infusion Agar*; Oxoid) z ovčjo krvjo, tiaminom in nalidiksinsko kislino ter jih inkubirali aerobno 2–7 dni pri 37 °C (če v vzorcu prevladujejo vegetativne oblike bakterije *P. larvae*, so prve kolonije vidne že po 1–2 dneh; v primeru kvantifikacije spor *P. larvae* v medu smo inkubacijo vedno podaljšali na 7 dni). Zrasle kolonije smo glede na morfologijo ocenili kot sumljive na bakterijo *P. larvae* ter jih precepili na novo gojišče za pridobitev čistih kultur (po eno kolonijo na vzorec; v primeru ugotavljanja raznolikosti bakterije *P. larvae* znotraj panja, čebelnjaka in čebelarstva po pet kolonij), ki smo jih nato determinirali z barvanjem po Gramu, osnovne biokemijske teste pa smo po vpeljavi metode zamenjali z masno spektrometrijo MALDI-TOF. Pridobljene izolate *P. larvae* smo shranili pri –70 °C v zbirki izolatov VF ter za namen nadaljnjih analiz.

3.2.2. Identifikacija *P. larvae* z metodo MALDI-TOF

Vpeljavo in validacijo metode za identifikacijo bakterije *P. larvae* z masno spektrometrijo MALDI-TOF (Bruker Daltonics) smo izvedli z uporabo referenčnih kultur *P. larvae* tipov I–IV (ERIC V je bil odkrit kasneje; Beims in sod., 2020b), s katerimi je bila pripravljena tudi podatkovna zbirka v pripadajoči programski opremi. Ob koncu projekta smo z metodo MALDI-TOF identificirali in dodali v zbirko tudi *P. larvae* ERIC V. Poleg referenčnih kultur smo v postopku validacije testirali tudi 50 izolatov iz arhivske zbirke Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo VF, ki so bili predhodno na podlagi morfoloških in biokemijskih lastnosti že zanesljivo determinirani kot bakterija *P. larvae*. Kot negativno kontrolo smo uporabili referenčne kulture iz rodu *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus* in *B. licheniformis*), ki so sorodni rodu *Paenibacillus*.

Po vpeljavi metode smo vse izolate *P. larvae* identificirali z masno spektrometrijo MALDI-TOF po navodilih proizvajalca (Bruker Daltonics). Z zobotrebcom smo nanegli del bakterijske kolonije v vdolbinico testne ploščice in pustili, da se je posušil pri sobni temperaturi. Nato smo na kulturo dodali reagent/matriks (HCCA; Sigma–Aldrich, Merck) in počakali, da se je posušil. Ploščico smo vstavili v aparaturo, kjer je analizator odčital komponente. Dobljeni rezultat je predstavljal beljakovinski masni spekter preiskovanega izolata. Za interpretacijo rezultatov smo uporabili programsko opremo MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics). Rezultati so bili glede ustreznosti vrste in rodu razvrščeni po barvni lestvici ter ovrednoteni s kategorijami (v primeru identifikacije do bakterijske vrste s kategorijo A).

3.3. Molekularna kvantifikacija spor *P. larvae* (DS3)

Za namen postavitve metode qPCR za molekularno kvantifikacijo spor *P. larvae* v medu smo izbrali vzorec medu iz klinično pozitivnega panja, v katerem je bila prisotnost *P. larvae* potrjena tudi z gojiščno preiskavo. Dodatno smo metodo vpeljali tudi za drobir; za ta namen smo izbrali vzorec drobirja iz klinično pozitivnega panja, za katerega prisotnosti bakterije *P. larvae* nismo potrdili z gojiščno preiskavo. Ta dva vzorca sta nam služila za pripravo umeritvene krivulje qPCR, ki smo jo umerili z rezultati metode dPCR. Po validaciji metode qPCR (določitev mejnih vrednosti) smo preverili tudi njegovo analitsko učinkovitost (inkluzivnost in ekskluzivnost). Po validaciji smo metodo qPCR uporabili za kvantifikacijo spor *P. larvae* v vzorcih medu, ki smo jih hkrati kvantificirali tudi s števno gojiščno preiskavo in imeli zanje podatke o intenziteti kliničnih znakov v pripadajočih čebeljih družinah. Po primerjavi metod kvantifikacije spor *P. larvae* smo izbrane vzorce medu in drobirja kvantificirali z obema molekularnima metodama (qPCR in dPCR) za ugotavljanje skladnosti rezultatov.

3.3.1. Izolacija DNA iz vzorcev medu in drobirja

Za izolacijo celokupne DNA iz vzorcev medu smo uporabili 1 ml toplotno obdelane suspenzije 1 (poglavje 3.2.1.), kar je bilo ekvivalentno 5 g medu (1/10 začetnega vzorca; po potrebi preračunano glede na začetno količino, če je odstopala od 50 g). Za izolacijo DNA iz vzorcev drobirja smo k 5 ml drobirja dodali 45 ml sterilne fiziološke raztopine, vzorce močno stresali (160 rpm; IKA KS 4000 i control, IKA) 2 h pri 37 °C ter po stresanju vzorec še homogenizirali (MiniMix, www.interscience.fr) pri najvišjih obratih 1,5 min. Iz vzorca smo odvzeli 1 ml za izolacijo DNA, kar je bilo ekvivalentno 1/10 začetnega vzorca; za drobir količine spor nismo preračunali na enoto mase [g], ampak na enoto prostornine [ml] vzorca, ker so se vzorci znatno razlikovali po vsebnosti vlage. Vzorce medu smo

kvantificirali tako s števno gojiščno kot qPCR metodo, vzorce drobirja pa le molekularno (qPCR). Celokupno DNA smo izolirali s kompletom 'DNA isolation from complex samples' (IMMT, Institute of Metagenomics and Microbial Technologies, Slovenija) po navodilih proizvajalca; izolacija vsebuje tako mehansko kot encimsko in toplotno obdelavo za lizo celic tudi v primeru prisotnosti debele celične stene ali ovojnice.

3.3.2. Izdelava testa qPCR za detekcijo in kvantifikacijo spor *P. larvae*

Kot tarčo testa (angl. *assay*) qPCR za detekcijo in kvantifikacijo bakterije *P. larvae* (spor, lahko pa tudi vegetativnih oblik, tj. za potrjevanje bakterijskih kultur) smo izbrali gen za metaloproteinazo (genom CP020557.1, lokus B7C51_23310), saj smo z analizo BLASTn ugotovili, da je gen vrstno specifičen in visoko ohranjen (> 97 % identičnost) med različnimi tipi ERIC, poleg tega pa je vedno prisoten v eni kopiji na genom *P. larvae*. Kandidatna zaporedja različnih začetnih oligonukleotidov in sonde za pripravo testa smo na novo izdelali z orodjem 'RealTime qPCR Assay Entry' (<https://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) in njihovo primernost analizirali z orodjem 'IDT OligoAnalyzer' (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) z uporabo parametrov za metodo qPCR. Za test qPCR smo izbrali najprimernejša začetna oligonukleotida (F, angl. *forward*; R, angl. *reverse*) in sondo TaqMan, ki so navedeni v **preglednici 1**. Izdelani test qPCR je primeren tudi za metodo dPCR, saj obe temeljita na uporabi dveh začetnih oligonukleotidov (F in R) in sonde.

Preglednica 1. Test qPCR za pomnoževanje gena za metaloproteinazo (MP) bakterije *P. larvae*.

Ime	Zaporedje (5'→3')
MP_F	GGTAACTATTCTGGCAGGAGC
MP_R	AAGTTCACGGTTAGGGTCTTC
MP_sonda (TaqMan)	[56-FAM]TTGGTAGGA[ZEN]ACGTCATTGTCCGCA[3IABkFQ]

3.3.3. Izvedba metode qPCR in dPCR

Pomnoževanje gena za metaloproteinazo pri bakteriji *P. larvae* z metodo **qPCR** smo izvedli v 20- μ l reakcijskih mešanicah, ki so vsebovale 10 μ l reagenta 'Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix' (Thermo Fisher Scientific), 0,12 μ l barvila ROX (redčenega 1 : 10), začetna oligonukleotida MP (F in R) v končni koncentraciji 300 nM in sondo MP v končni koncentraciji 200 nM (tj. test qPCR), 3,88 μ l vode za molekularne aplikacije in 5 μ l izolirane DNA. Pomnoževanje smo izvedli na aparaturi Applied BioSystems 7500 Fast System (Thermo Fisher Scientific). Protokol pomnoževanja je naveden v **preglednici 2**. K vsakemu pomnoževanju smo vključili negativna vzorca, tj. vzorec DNA iz negativnega čebeljega vzorca (medu ali drobirja) ter vzorec brez dodane DNA (voda namesto DNA), ter pozitivno kontrolo (DNA iz enega od referenčnih sevov *P. larvae*). Pričakovano dolžino pomnožka (94 bp) smo preverili s kapilarno elektroforezo QIAxcel (Qiagen), za katero smo uporabili komplet 'QIAxcel DNA High Resolution Kit' (Qiagen).

Preglednica 2. Protokol pomnoževanja z metodo qPCR.

Razmere pomnoževanja	Število ciklov
50 °C, 2 min	1×
95 °C, 10 min	1×
95 °C, 15 s	45×
60 °C, 1 min	

Pomnoževanje gena za metaloproteinazo pri *P. larvae* z metodo **dPCR** smo izvedli v 15- μ l reakcijskih mešanicah, ki so vsebovale 7,5 μ l reagenta 'QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix v2' (Thermo Fisher Scientific), začetna oligonukleotida MP v končni koncentraciji 300 nM in sondo MP v končni koncentraciji 200 nM (kot zgoraj, tj. test qPCR), 3,75 μ l vode za molekularne aplikacije ter 3 μ l izolirane DNA. Reakcijsko mešanico (14,5 μ l) smo nanесли na čip 'QuantStudio 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2' z nanašalnikom čipov 'QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader' (Thermo Fisher Scientific) po navodilih proizvajalca. Pomnoževanje smo izvedli na aparaturi ProFlex 2x flat PCR System (Thermo Fisher Scientific). Protokol pomnoževanja je naveden v **preglednici 3**. Pri pomnoževanju smo uporabili enake negativne kontrole kot pri metodi dPCR; kot pozitivno kontrolo smo vzeli DNA iz vzorca, ki je bil pridobljen iz obolele čebelje družine (kot za pripravo umeritvene krivulje qPCR). Z analizo kontrolnih vzorcev smo ob vsaki izvedbi metode določili prag zaznave glede na kvaliteto (angl. *quality threshold*) in fluorescenco (angl. *fluorescence threshold*); oba sta se izkazala kot ponovljiva v vseh izvedbah, kar kaže na robustnost metode dPCR. Rezultate dPCR smo analizirali s spletnim orodjem QuantStudio 3D AnalysisSuite v3.1.6 po navodilih proizvajalca. Rezultat smo podali kot število tarč (tj. spor *P. larvae*) na μ l izolirane DNA, kar smo lahko ob upoštevanju redčitev in prostornin preračunali v število spor *P. larvae* na enoto [g ali ml] medu ali drobirja.

Preglednica 3. Protokol pomnoževanja z metodo dPCR.

Razmere pomnoževanja	Število ciklov
96 °C, 10 min	1x
60 °C, 2 min	39x
98 °C, 30 s	
60 °C, 2 min	1x

3.3.4. Analitska učinkovitost testa qPCR

Inkluzivnost testa qPCR smo definirali kot sposobnost testa, da opredeli rezultat kot pozitiven pri vseh izolatih, ki resnično pripadajo vrsti *P. larvae*. Ekskluzivnost smo definirali kot sposobnost testa, da opredeli rezultat kot negativen pri vseh izolatih, ki resnično ne pripadajo vrsti *P. larvae*.

In silico inkluzivnost smo opredelili na osnovi devetih genomov *P. larvae* iz zbirke NCBI Genomes in 40 v okviru projekta sekvenciranih izolatov *P. larvae* iz Slovenije, ki so pripadali vsem znanim (pod)tipom ERIC. Prisotnost gena za metaloproteinazo smo ugotavljali z algoritmom BLASTn; gen je bil prisoten, če je imel ≥ 90 % identičnost in ≥ 70 % pokritost z referenčnim zaporedjem. Poravnavo zaporedij smo izvedli in vizualizirali z orodjem Geneious v11.1.5 (Biomatters). Ugotovili smo visoko ohranjenost (≥ 97 % identičnost in 100 % pokritost) gena za metaloproteinazo znotraj vrste, zato smo izbrani gen in test qPCR uporabili skozi celotno raziskavo.

In silico ekskluzivnost smo opredelili na osnovi petih najsorodnejših vrst *Paenibacillus* z dostopnimi zaporedji celotnih genomov; te smo identificirali z orodjem EzBioCloud (Yoon in sod., 2017) na osnovi identičnosti v zaporedju gena za 16S rRNA. Ob uporabi mej ≥ 90 % identičnost in ≥ 70 % pokritost nismo ugotovili znanih homologov v drugih vrstah *Paenibacillus*. Nadalje smo morebitne homologe gena za metaloproteinazo ugotavljali v zbirki NCBI nr/nt; ob uporabi kriterijev ≥ 90 % identičnost in ≥ 70 % pokritost nismo ugotovili znanih homologov v drugih vrstah, zato smo izbrani test qPCR uporabili skozi celotno raziskavo.

In vitro inkluzivnost smo opredelili na osnovi 23 izolatov *P. larvae*, ki so pripadali različnim (pod)tipom ERIC. *In vitro* ekskluzivnost smo opredelili na osnovi dveh ozko sorodnih vrstah *Bacillus pumilus* in *Paenibacillus alvei* ter štirih pogostih čebeljih patogenih (*Lotmaria passim*, *Micrococcus plutonius*, *Nosema apis* in *Nosema ceranae*).

3.3.5. Validacija metode qPCR za vzorce medu in drobirja

Za pripravo umeritvene krivulje qPCR smo uporabili vzorec medu in vzorec drobirja iz klinično pozitivnega panja, iz vsakega pa smo izolirali celokupno DNA v treh bioloških ponovitvah (3×1 ml iz iste suspenzije). Iz vsake biološke ponovitve smo pripravili 5-kratno redčitveno vrsto DNA, ki smo jo analizirali z metodo qPCR v treh tehničnih ponovitvah, da smo za vsako redčitev pridobili devet meritev qPCR. Iz rezultatov smo izrisali umeritveno krivuljo s pripadajočo enačbo regresijske premice, iz katere smo izločili tiste redčitve, kjer je bilo sipanje rezultatov preveliko; na ta način je umeritvena krivulja zajela le linearno dinamično območje metode. Iz enačbe umeritvene krivulje smo izračunali tudi učinkovitost (angl. *efficiency*) metode qPCR po formuli $E = -1 + 10^{(-1/\text{naklon})}$. Za poenotenje načina za pridobivanje rezultatov smo glede na rezultate, pridobljene med validacijo metode, določili enotno vrednost za prag zaznave (angl. *threshold*), ki vpliva tudi na odčitane vrednosti Cq (kvantifikacijski ali prazni cikel, angl. *threshold cycle* ali *quantification cycle*), ki predstavljajo rezultat metode. Glede na vse pridobljene rezultate validacije smo določili mejne vrednosti metode (Kušar in sod., 2013): mejni Cq (angl. *Cq cut-off*; Mehle in sod., 2012), mejo detekcije (**LOD**, angl. *limit of detection*) in mejo kvantifikacije (**LOQ**, angl. *limit of quantification*). LOQ je vrednost metode [št. tarč/enoto vzorca], pod katero koeficient variacije (CV, angl. *coefficient of variation*) znatno naraste, tj. nad 33 % (Vaerman in sod., 2004; Žel in sod., 2012), LOD pa 5–10× nižja vrednost kot LOQ v kompleksnih vzorcih (Berdal in Holst-Jensen, 2001).

3.3.6. Umerjanje metode qPCR z metodo dPCR

Metoda qPCR omogoča relativno kvantifikacijo tarče v vzorcih, če pa jo umerimo, lahko pridobljene vrednosti Cq prevedemo v število tarč na enoto vzorca (t. i. absolutna kvantifikacija). Pri bakteriji *P. larvae* za umerjanje metode qPCR števena gojiščna metoda zaradi slabe in nekonsistentne kalitve spor ni primerna, zato smo jo umerili z molekularno metodo dPCR, ki zaradi izvedbe na čipu z 20.000 reakcijskimi jamicami (aparatura QuantStudio 3D Digital PCR System) in Poissonove statistične analize pridobljenih rezultatov ni podvržena inhibiciji in omogoča absolutno kvantifikacijo; za rutinsko uporabo je sicer precej manj primerna kot metoda qPCR (Papić in sod., 2017).

Z metodo dPCR smo za vzorec medu in vzorec drobirja, iz katerega smo izolirali DNA v treh bioloških ponovitvah za validacijo metode qPCR (poglavje 3.3.5.), določili število spor *P. larvae* (poglavje 3.3.3.); z metodo dPCR smo analizirali vsako od treh bioloških ponovitev, v več redčitvah in tehničnih ponovitvah, od katerih smo pri izračunu upoštevali tiste redčitve oz. čipe, kjer je bil rezultat ovrednoten kot zanesljiv (parameter '*precision*' < 10 %). Ker smo za pripravo umeritvene krivulje qPCR in za kvantifikacijo z metodo dPCR uporabili isto DNA in smo z metodo dPCR pridobili rezultat podan v številu tarč *P. larvae* na μl izolirane DNA, smo lahko izračunali število spor *P. larvae* na enoto medu [g] ali drobirja [ml] iz pridobljenih vrednosti Cq; ker se vzorci drobirja lahko precej razlikujejo glede vsebnosti vlage, podajanje števila spor *P. larvae* na masno enoto pri drobirju ni smiselna.

3.3.7. Kvantifikacija spor *P. larvae* v vzorcih medu in drobirja

Povezavo med številom spor v vzorcih **medu** in intenziteto kliničnih znakov HGČZ smo opredelili na osnovi nabora 69 vzorcev medu, ki so izvirali iz družin s kliničnimi znaki ($n = 41$) ter klinično negativnih družin ($n = 28$); od slednjih jih je bilo 26 iz HGČZ-pozitivnih čebelnjakov (nekateri od teh vzorcev so bili bakteriološko šibko pozitivni) in 2 iz HGČZ-negativnega čebelnjaka (potrjena kot negativna tudi z gojiščno preiskavo). Družine smo glede na klinično sliko razvrstili v štiri skupine (0–3) od najmanjše do največje intenzitete klinične slike, pri čemer skupina 0 ni kazala kliničnih znakov; samo en vzorec je izviral iz panja z intenziteto 4, zato smo ga za namen statističnih analiz priključili k skupini z intenziteto 3 (**priloga 2**). Število spor *P. larvae* na enoto [g] medu smo določili s števno gojiščno preiskavo in molekularno metodo qPCR. V primeru štetja na gojiščih smo inkubacijo vedno podaljšali do 7 dni, ker ne kalijo vse spore enako hitro. Število spor smo izračunali na osnovi preštetih kolonijskih enot (CFU, angl. *colony forming units*) pri posameznih suspenzijah ob upoštevanju faktorja redčitve. Pri izračunu smo upoštevali samo tiste plošče, ki so bile števne, tj. kjer je bilo na plošči pribl. 15–300 CFU. Rezultata nismo pomnožili s splošno uveljavljenim faktorjem 2000, ker ni na voljo znanstvenih podatkov o tem, kolikšen delež spor *P. larvae* v splošnem kali na gojiščih v laboratorijskih pogojih.

Vse pridobljene rezultate smo za potrebe statistične analize logaritmirali (funkcija $\log_{10}(x+1)$). Značilne razlike med skupinami smo določili s testom Kruskal-Wallis, ki mu je sledil *post-hoc* Dunnov test multiplih primerjav. Oba testa smo izvedli z orodjem GraphPad Prism v8.0.2; test je bil značilen, če je bila vrednost $p < 0,05$. Za izračun povprečnega faktorja kalitve spor smo uporabili vse vzorce, pri katerih je bilo število spor nad vrednostjo LOQ z obema metodama (poglavje 4.4.: 58 spor/g medu za metodo qPCR in 15 CFU/gojišče za števno gojiščno preiskavo; $n = 30$). Faktor kalitve smo definirali kot količnik med številom spor po gojiščni števni preiskavi in številom spor po metodi qPCR, izražen kot odstotek.

Povezavo med številom spor v vzorcih **drobirja** in intenziteto kliničnih znakov HGČZ nismo mogli opredeliti zaradi premajhnega števila vzorcev iz klinično pozitivnih čebeljih družin. Z metodo qPCR (ne pa tudi bakteriološko; zaradi potrebe po uporabi toksičnih organskih topil pri pred-pripravi vzorcev drobirja za gojiščno preiskavo) smo analizirali 30 vzorcev drobirja iz klinično negativnih družin, od teh jih je bilo 29 iz HGČZ-pozitivnih čebelnjakov in en iz HGČZ-negativnega čebelnjaka.

3.3.8. Primerjava metod qPCR in dPCR

Po začetni validaciji metode qPCR, ki smo jo umerili z metodo dPCR, smo ujemanje med metodama qPCR in dPCR (analiza skladnosti) preverili na neodvisnem naboru 14 vzorcev medu in 12 vzorcev drobirja; za dPCR smo naredili analizo za več vzorcev, ki so bili na voljo, ampak smo za primerjavo metod nabor zmanjšali, ker smo za zanesljivo primerjavo metod lahko upoštevali le tiste vzorce, ki so ustrezali naslednjim kriterijem: (i) 20–10.000 kopij tarče/ μl analizirane DNA in parameter '*precision*' $< 30 \%$ pri metodi dPCR in (ii) $\text{CV} < 33 \%$ med dvema tehničnima ponovitvama pri metodi qPCR. Z metodo qPCR smo vsak vzorec iz nabora analizirali v treh tehničnih ponovitvah in pri rezultatih upoštevali njihovo povprečje. Rezultate metod qPCR in dPCR smo analizirali z linearno regresijo (Excel), Pearsonovo korelacijo (Excel) in analizo Bland-Altman (GraphPad Prism v8.0.2). Število spor smo logaritmirali (funkcija $\log_{10}(x+1)$); statističen test je bil značilen, če je bila vrednost $p < 0,05$.

3.4. Tipizacija izolatov *P. larvae* z metodo ERIC-PCR (DS3)

Izbor izolatov *P. larvae* za tipizacijo ERIC smo pripravili tako, da je vseboval vsaj po en izolat vsakega čebelarja, ki je imel v čebelnjaku potrjeno prisotnost *P. larvae* v zalegi in/ali medu. Če sta bila za posamezen panj pozitivna tako zalega kot med, smo dali prednost izolatom iz zalege, ker so ti direktno povezani z vzorčenjem ob odkritju kliničnih znakov v družini in potrditvijo HGČZ. Tipizirali smo tudi po en izolat *P. larvae* iz medu iz klinično bolnega čebelnjaka, če je bil na voljo. Če za čebelnjak izolata iz zalege ni bilo, smo za tipizacijo izbrali izolat iz medu. V tipizacijo ERIC smo zajeli po več izolatov, če so pripadali istemu kužnemu krogu in so epizootiološki podatki, pridobljeni od vzorčevalcev, kazali na njihovo povezanost, ali če smo odkrili pojavljanje enega od novih profilov ERIC. Za prikaz geografske in časovne porazdelitve tipov ERIC na zemljevidu Slovenije smo uporabili orodje Microreact (Argimón in sod., 2016). Za preverjanje raznolikosti bakterije *P. larvae* znotraj istega panja, čebelnjaka in čebelarstva smo izbrali čebelnjak s potrjeno hudo gnilobo in ERIC tipizirali večje število pridobljenih izolatov *P. larvae* (tj. 16 iz zalege in 70 iz medu; poglavje 4.1.).

Tipizacijo ERIC smo izvedli po predhodno opisanem protokolu (Genersch in Otten, 2003; Genersch in sod., 2006), ki smo ga optimizirali, da je omogočal analizo s kapilarno elektroforezo. Prilagodili smo koncentracijo začetnih oligonukleotidov (ERIC1R in ERIC2; Versalovic in sod., 1994) in izbor DNA polimeraze. Reakcijska mešanica (25 µl) je vsebovala 1 × 'Multiplex PCR Master Mix' (Qiagen), 2 µM vsakega začetnega oligonukleotida in 5 µl izolirane DNA. Pomnožke smo analizirali s kapilarno elektroforezo QIAxcel (Qiagen), s kartušo 'QIAxcel DNA High Resolution Kit'. Uporabili smo program ločevanja OM500 in čas injiciranja 10 s. Pri ločevanju smo uporabili velikostni marker 'QX Alignment Marker 15–5000 bp' in poravnalni marker 'QX Size Marker 100–2500 bp' (oba Qiaxcel).

3.4.1. Izolacija DNA iz bakterijskih kultur *P. larvae* za tipizacijo ERIC

Za izolacijo DNA iz čistih bakterijskih kultur *P. larvae* smo tako kot za izolacijo iz čebeljih vzorcev uporabili komplet 'DNA isolation from complex samples' (IMMT, Institute of Metagenomics and Microbial Technologies Slovenija) po navodilih proizvajalca, vendar po prilagojenem protokolu s skrajšanimi časi inkubacije in centrifugiranja; običajen protokol s segrevanjem in centrifugiranjem se je med optimizacijo tipizacije ERIC izkazal kot neprimeren. Za izolate, ki smo jih odbrali za tipizacijo WGS, smo uporabili drug komplet in način izolacije DNA (za zagotavljanje DNA zadostne kakovosti in integritete za izvedbo metode WGS; poglavje 3.5.2.), ki je bila primerna tudi za tipizacijo ERIC.

3.5. Tipizacija izolatov *P. larvae* z metodo WGS (DS3)

3.5.1. Nabor izolatov *P. larvae* za WGS

Iz celotnega nabora izolatov *P. larvae* z znanim tipom ERIC (poglavje 4.1.) smo za ugotavljanje poti širjenja in opredelitev izbruhov HGČZ ter za ugotavljanje populacijske strukture bakterije *P. larvae* v Sloveniji odbrali **202** izolata (131 iz klinično spremenjene zalege in 71 iz medu) za sekvenciranje celotnih genomov glede na njihove pridružene podatke, kot so npr. oskrbovalec in lokacija čebelnjaka, vključenost v kužni krog, premik čebel na pašo in ugotovljeni tip ERIC. V nabor smo zajeli vse statistične regije, celotno obdobje (2017–2019), oba tipa vzorcev (med in zalega), čim večje število čebelnjakov znotraj kužnega kroga (skupaj 76 čebelnjakov) in vse pridobljene profile ERIC

(ERIC I, 'Ia', 'Ib' in II). Za ugotavljanje poti širjenja HGČZ smo število tipiziranih izolatov na čebelarstvo povečali v primeru (i) sočasnega pojava več žarišč HGČZ znotraj istega kužnega kroga ali (ii) epidemiološko povezanih primerih bolezni v geografsko oddaljenih čebelnjakih (isti oskrbovalec ali prevoz čebel na skupno pašo).

Za analizo raznolikosti izolatov *P. larvae* znotraj panja, čebelnjaka in čebelarstva smo izbrali izolate iz treh čebelnjakov, ki jih je oskrboval isti čebelar in so se nahajali v istem kužnem krogu. Izolate smo pridobili jeseni 2019 iz vzorcev bolne zalege (16 izolatov) ter medu (iz 14 panjev pred sežigom; skupaj 70 izolatov iz medu za tipizacijo ERIC, od teh pa 26 za tipizacijo WGS; poglavje 4.1.).

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

Iz 202 izolatov *P. larvae*, ki smo jih odbrali za tipizacijo WGS, smo DNA izolirali s kompletom 'DNeasy Blood & Tissue Kit' (Qiagen) po protokolu za Gram-pozitivne bakterije. Po izolaciji smo preverili integriteto DNA (z agarozno gelsko elektroforezo) in njeno koncentracijo (s fluorometrom Qubit 3.0, za katerega smo uporabili komplet 'Qubit 1x dsDNA High-Sensitivity Assay Kit'; Thermo Fisher Scientific). Izolate so sekvencirali v sekvencijskem centru Oxford Genomics Centre (Združeno kraljestvo) s kompletom 'NEBNext Ultra DNA Sample Prep Master Mix Kit' (NEB) in tehnologijo Illumina (2 × 150 bp) na aparaturi NovaSeq 6000 System (Illumina) do minimalne pokritosti 130 ×.

3.5.3. Izdelava stabilne sheme wgMLST

Stabilno shemo za tipizacijo bakterije *P. larvae* s pristopom wgMLST smo izdelali na osnovi nabora 179 genomov *P. larvae*, od katerih je 51 genomov izviralo iz Slovenije (sekvencirali smo jih v okviru projekta, v sklopu prve serije vzorcev). Za vse genome smo zbrali tudi pridružene podatke, kjer je bilo to mogoče: leto, država in vir izolacije, izbruh (da/ne), tip MLST in tip ERIC. Vse genome, ki niso bili že sestavljeni (podatki FASTQ), smo v soseske (angl. *contigs*) *de novo* sestavili z orodjem SPAdes v3.7.1 (Bankevich et al., 2012), implementiranim v programski opreml BioNumerics v7.6.3 (Applied Maths NV, bioMérieux). Genome smo anotirali s programom Prokka v1.14 (Seemann, 2014).

Za izdelavo stabilne sheme wgMLST smo iz začetnega nabora 179 genomov *P. larvae* odbrali 125 genomov visoke kakovosti. Shemo smo izdelali v sodelovanju z razvijalci programske opreme BioNumerics. Ti genomi so izvirali iz 12 držav po celem svetu in pripadali vsem petih tipom ERIC, s čimer smo zajeli globalno raznolikost bakterije *P. larvae*. Izvedli smo tudi obširno tehnično validacijo sheme (podatki niso prikazani). Končna shema *P. larvae*, ki vsebuje 5745 lokusov wgMLST, je dostopna vsem uporabnikom komercialne programske opreme BioNumerics.

3.5.4. Bioinformacijska analiza podatkov WGS

In silico MLST. Vsem 179 genomom *P. larvae* iz zbirke za izdelavo sheme wgMLST smo *in silico* določili tip MLST. Za ta namen smo uporabili shemo *P. larvae*, ki temelji na sedmih lokusih (Morrissey in sod., 2015) in je implementirana v zbirki PubMLST (Jolley et al., 2018). Z analizo WGS smo pri dveh izolatih *P. larvae* iz Slovenije ugotovili novo alelno različico lokusa *ftsA*, ki smo jo potrdili tudi s sekvenciranjem po Sangerju z obeh smeri in nov tip deponirali v zbirko PubMLST (kot ST30; poglavje 4.6.).

Tipizacija wgMLST. Tipizacijo wgMLST smo izvedli s programsko opremo BioNumerics, pri čemer smo uporabili tako alele, ki temeljijo na sestavljenih genomskih zaporedjih (angl. *reference-based allele calls*) kot tudi alele, ki so rezultat prileganja odčitkov na referenčno zaporedje (angl. *assembly-free allele calls*). Dendrogram wgMLST smo izrisali z metodo UPGMA. Za analizo gruč, tj. razvrščanje izolatov v ozko sorodne (klonalne) skupine izolatov, smo uporabili minimalno vpeto drevo (angl. *minimum spanning tree*, MST), pri čemer smo za zamejitev gruč uporabili mejo 35 alelov wgMLST (to mejo smo določili na osnovi preiskave izbruha hude gnilobe v Sloveniji; poglavje 4.6.). Za anotacijo in vizualizacijo dreves smo uporabili orodje iTol v4 (Letunic in Bork, 2019). Za prikaz geografske (glede na koordinate čebeljakov) in časovne (glede na datum odvzema vzorcev iz čebeljakov) porazdelitve tipov WGS na zemljevidu Slovenije smo uporabili orodje Microreact (Argimón in sod., 2016).

3.5.6. Populacijska struktura izolatov *P. larvae* iz Slovenije

Za namen ugotavljanja ustreznosti 3-km kužnega kroga smo preučili geografsko razširjenost ugotovljenih klonov *P. larvae*, pri analizi njihovega pojavljanja pa smo upoštevali tudi njihovo časovno zaporedje. Za izolate smo imeli podatek o tem, iz katerega čebelnjaka izvirajo in kdaj so bili vzorci odvzeti, za čebelnjake pa njihove geografske koordinate; na čebeljak smo analizirali 1–16 izolatov. Za čebelnjake smo pripravili matriko parnih razdalj v geografskem sistemu ArcGIS, z dodano Python zanko za iskanje sosednjih čebeljakov (doc. dr. Blaž Repe, Oddelek za geografijo, Filozofska fakulteta UL). Pridobljene podatke, tj. izris pojavljanja klonov *P. larvae* na zemljevidu Slovenije (Microreact; Argimón in sod., 2016) ter ugotovljene parne razdalje (ArcGIS), smo interpretirali v povezavi s pridruženimi epizootiološkimi podatki.

4. REZULTATI

4.1. Nabor izolatov *P. larvae*

V projekt smo vključili izbrane izolate *P. larvae* iz zalege in medu, ki so bili pridobljeni v letih 2017–2019, skupno **583** izolatov iz različnih regij Slovenije. Vse smo tipizirali z metodo ERIC-PCR, 202 odbranih pa z metodo WGS. Sicer je bilo za leto 2017 shranjenih 333 izolatov (189 iz spremenjene zalege in 144 iz medu), od teh jih je bilo 120 ERIC-tipiziranih (66 iz zalege in 54 iz medu). Za leto 2018 je bilo shranjenih 367 izolatov (253 iz zalege in 114 iz medu), od teh jih je bilo 146 ERIC-tipiziranih (96 iz zalege in 50 iz medu). Za leto 2019 je bilo shranjenih 573 izolatov (342 iz zalege in 231 iz medu; zaradi projekta so številke večje), od teh jih je bilo 247 ERIC-tipiziranih (142 iz zalege in 105 iz medu). Za vsa leta 2017–2019 skupaj je bilo shranjenih 1.273 izolatov *P. larvae* od 259 čebelarjev (784 iz zalege in 489 iz medu), od teh jih je bilo **513** ERIC-tipiziranih (304 iz spremenjene zalege in 209 iz medu); za 2 od 513 izolatov nismo imeli točnega podatka o geografskih koordinatah čebelnjaka. V končno analizo pojavnosti tipov ERIC v Sloveniji smo zajeli 504 izolate *P. larvae* (302 iz zalege in 202 iz medu, skupaj iz 250 čebeljakov, ki jih je oskrbovalo 228 čebelarjev), za katere smo imeli na voljo vse potrebne epizootiološke podatke, ID čebelnjaka in geografske koordinate čebelnjaka za izris na zemljevidu Slovenije.

Dodatno smo tipizirali še **70** izolatov *P. larvae* iz medu iz izbranega čebelarstva za namen ugotavljanja raznolikosti bakterije *P. larvae* znotraj panja, čebelnjaka in čebelarstva; od tega smo v analizo zajeli

tudi 16 izolatov iz zalege (znotraj nabora vseh ERIC-tipiziranih izolatov). Odbrali smo 14 panjev z različno izraženo klinično sliko, panji so pripadali trem čebelnjakom istega lastnika (po štirje ali dvakrat po pet panjev na čebelnjak). Iz panjev smo pred sežigom pridobili med, iz medu pa z gojiščno preiskavo iz vsakega vzorca namesto ene za nadaljnje analize izbrali po pet kolonij *P. larvae*. Vseh 70 izolatov (po pet iz 14 panjev) smo ERIC-tipizirali, izbranih 26 pa tudi z metodo WGS (po enega na panj za 11 panjev in po pet na panj za tri panje, ki so pripadali istemu čebelnjaku).

4.2. Anketni vprašalnik za epidemiološko poizvedovanje

V raziskavi je sodelovalo 84 čebelarjev iz cele Slovenije, od katerih je imelo 60 čebelarjev HGČZ-pozitivne čebelnjake, ostali pa negativne. V povprečju je imel čebelar 18 čebeljih družin na eni lokaciji (čebelnjaku), največ pa 93 družin na šestih lokacijah. Pri tem je potrebno poudariti, da so se odgovori nanašali na čebelnjak na pregledani lokaciji. Večina anketiranih čebelarjev (77/84) je uporabljala listovne oz. AŽ (Alberti-Žnideršičeve) panje, med njimi jih je 13 uporabljalo tudi nakladni panj. Samo nakladni panj je uporabljalo sedem čebelarjev, en pa je uporabljal Kirerjev panj. Čebelarji so imeli 3–80 let izkušenj, v povprečju 25 let, stari pa so bili 25–89 let. Med njimi je bilo pet žensk. Večina čebelarjev je bila upokojenih (56/84), trije so bili kmetovalci, ostali pa različnih drugih poklicev (proizvodni in pisarniški delavci, samostojni podjetniki, strokovnjaki in visoki uradniki) in en nezaposlen. Večina je končala srednjo poklicno šolo (50/84) ali diplomo 1. bolonjske stopnje (24/84), ostali pa vse od osnovne šole do doktorata. Večina anketiranih se s čebelarjenjem ukvarja popolnoma ljubiteljsko (53/84), tretjina ljubiteljsko in jim predstavlja tudi majhen del dohodka (28/84), štirje pa so navedli, da je njihova dejavnost komercialna. Največ se jih s čebelarjenjem ukvarja zaradi proizvodnje medu za lastno uporabo (79/84) ali prodajo (37/84), poleg tega pa jih skoraj polovica za razlog navaja tudi pomoč čebelam in okolju (38/84) ter opraševanje (39/84).

Od leta 2017 do pregleda v 2019 je izgubo čebeljih družin beležilo 68/84 čebelarjev, pri čemer so v povprečju izgubili 2–5 družin, največ pa 62 v enem letu. Dva čebelarja v zadnjih treh letih nista beležila drugih bolezni in težav, najpogostejše bolezni pri ostalih so bile varoza (58/84), poapnela zalega (35/84), težave z maticami (33/84) in ropanje (30/84). Čebelarji menijo, da so glavni razlogi za pojav žarišč HGČZ opuščeni čebelnjaki in ropanje (41/84) ter slaba skrb za higieno v čebelnjaku in da se bolezni ne prijavi (31/84). Razmere oz. okolico v kateri čebelarijo so najpogostejše ocenjevali kot dobro (25–37/84), zelo dobro pa so ocenili razpoložljivost časa za čebelarjenje (44/84). Zelo dobro so ocenili tudi higieno čebelnjaka in opreme ter preprečevanje dostopa drugim osebam do čebelnjaka (34–37/84). Svoje poznavanje vzrokov za širjenje bolezni so največkrat ocenili kot dobro (36/84), medtem ko so označevanje satja v primeru premeščanja večinoma ocenili kot slabo (27/84). V povprečju zamenjajo tretjino satja na leto. V letu 2018 le en čebelar čebel ni zdravil, ostali pa so za zdravljenje največkrat uporabili pripravke z amitrazom (62/84), oksalno kislino (51/84) in mravljinčno kislino (32/84). Za krmljenje čebel večina uporablja sladkorno raztopino (83/84) in komercialne pogače (39/84). Le devet čebelarjev si je opremo izposojalo ali jo posojalo drugim, od tega pet od enega čebelarja, trije od čebelarskega društva, en pa si izposoja ali posoja opremo več čebelarjem. Med njimi dva posojene opreme ne očistita. Slaba tretjina matice vzreja (25/84), medtem ko jih ostali dokupujejo občasno ali vedno. Od leta 2017 je čebeljo družino ali paketne čebele kupilo 21/84 čebelarjev in sicer od ene do deset družin ali paketnih čebel; 18 čebelarjev je navedlo, da niso imeli urejene dokumentacije za vse nakupe. Čebelje družine ali paketne čebele je v zadnjih treh letih prodalo osem čebelarjev, od katerih jih je pet navedlo, da niso imeli urejene dokumentacije za vse

prodaje. Prav tako je pet od 18 čebelarjev, ki so v zadnjih treh letih čebele vozili na pašo, navedlo, da za to niso imeli vedno urejene dokumentacije. Od leta 2017 je 28/84 čebelarjev ujelo 1–15 rojev na leto. Med njimi je 12 čebelarjev roj takoj prestavilo v panj, ostali pa so roj ločili od ostalih čebel vsaj za en dan, dva med njimi za 30 dni.

Veterinarji so za razlog pregleda v 57/84 primerih navedli, da se pregled opravlja po odločbi, ker se čebelarstvo nahaja v kužnem krogu, v osmih primerih je šlo za kontrolni pregled po ugotovljeni HGČZ, 19 je bilo sumov na HGČZ in eno čebelarstvo je bilo pregledano zaradi registracije vzreje matic. V povprečju so pregledali 23 čebeljih družin na čebelnjak. Navedli so, da so ob sumu na HGČZ čebelarji najpogosteje najprej poklicali veterinarja (16/19), en čebelar je najprej poklical svetovalca na Čebelarski zvezi Slovenije (ČZS), dva pa sta najprej ukrepala sama. Poleg HGČZ so v čebelnjakih v 24/84 primerih ugotovili tudi druge bolezni oz. težave, najpogosteje poapnelo zalego (11/24), brezmatičnost (9/24) in varozo (7/24). Razmere čebelarjenja so ocenili, podobno kot čebelarji, kot dobro ali srednje (37–42/84), medtem ko so higieno in izvajanje biovarnostnih ukrepov v čebelnjaku ocenili nekoliko slabše kot čebelarji in sicer kot dobro (45 in 33/84). Poleg tega so s pomočjo tabele z 39 spremenljivkami ocenjevali tudi prisotnost različnih kliničnih znakov v čebeljih družinah.

Spremenljivki s statistično značilno razliko med HGČZ-pozitivnimi in negativnimi čebelnjaki sta bili izkušnje čebelarja v letih ($p = 0,0173$) in število ujetih rojev v zadnjih treh letih ($p = 0,0265$). Pri tem sta bili statistično značilni razlike v številu ujetih rojev v letu 2017 ($p = 0,0048$) in 2018 ($p = 0,0305$). Čebelarji s pozitivnimi panji so imeli v povprečju 30 let izkušenj, medtem ko so imeli čebelarji z negativnimi panji v povprečju 17 let izkušenj s čebelarjenjem. Čebelarji s pozitivnimi panji so v povprečju ujeli 2,92 roja v zadnjih treh letih, medtem ko so čebelarji z negativnimi panji ujeli le 0,2 roja. Ostale spremenljivke so bile opisne in smo zato primerjali povezanost s statusom HGČZ. Tri spremenljivke, ki so bile vezane na namen čebelarjenja, so se izkazale kot statistično značilno povezane s statusom HGČZ. Izključno ljubiteljsko čebelarjenje je bilo povezano z nižjim deležem HGČZ-pozitivnih čebeljakov, medtem ko je bil delež pozitivnih pri komercialnih in delno komercialnih višji ($p = 0,0255$). Čebelarji, ki so za razlog čebelarjenja navedli pomoč čebelam in okolju ($p = 0,0126$) ter opraševanje ($p = 0,0187$), so imeli nižji delež pozitivnih čebeljakov, kot bi jih pričakovali, če spremenljivki ne bi bili povezani s statusom HGČZ. Statistično značilna je bila tudi povezava med zgodovino HGČZ in trenutnim stanjem, saj je bilo 15/16 čebeljakov, ki so bili v preteklosti potrjeni pozitivni, ponovno pozitivnih ($p = 0,0313$). S statusom HGČZ je bila statistično značilno povezana tudi ocena čebelarjev glede higiene čebeljaka ($p = 0,0082$) in opreme ($p = 0,0272$) ter preprečevanje dostopa drugim osebam do čebeljaka ($p = 0,0465$), saj so imeli tisti čebelarji, ki so razmere ocenili zelo dobro in dobro, več HGČZ-pozitivnih čebeljakov kot tisti, ki so razmere ocenili srednje in slabo. Prisotnost tipa ERIC I je bila statistično značilno povezana s številom ujetih rojev v preteklih treh letih ($p = 0,0353$) in tudi posamezno v letu 2018 ($p = 0,0143$), medtem ko je bila prisotnost tipa ERIC II povezana le s številom ujetih rojev v letu 2017 ($p = 0,0140$).

Več kot polovica (21/39) spremenljivk, ki so opisovale klinične znake HGČZ in spremembe na zalegi, ličinkah, satju in moči čebelje družine, je bila statistično značilno povezana s HGČZ-statusom čebeljaka, pri čemer so bile vse prisotne pogosteje ali izključno v HGČZ-pozitivnih čebeljakih (p od 0,03 do $< 0,0001$). Poleg teh so se še dodatni trije klinični znaki pokazali za statistično značilno povezane s prisotnostjo oziroma odsotnostjo tipa ERIC I ali II. Petnajst od teh spremenljivk je bilo statistično značilno povezano z enim tipom ERIC in ne z drugim, pri treh pa je bila statistično značilna

tudi povezanost, ko smo primerjali izražanje teh znakov le med tipoma ERIC. Trije klinični znaki, ki so bili statistično značilno povezani le s tipom ERIC I, so bili mrtve ličinke v obliki mešička ($p = 0,0201$), bolezenske spremembe prisotne na treh ali več satih ($p = 0,0089$) in vidna varoja pod pokrovčki celic ($p = 0,0336$). Prva dva klinična znaka sta pogostejše izražena pri tipu ERIC I kot pri tipu ERIC II, medtem ko v primeru ERIC I v čebelnjaku pod pokrovčki celic ni bilo prisotne varoje. Glede prisotnosti varoje sicer dopuščamo možnost naključja, saj je odvisna od stopnje napadenosti čebelje družine z varojami, ki pa je v okviru projekta pri preiskovanih družinah nismo ugotavljali. Dvanajst kliničnih znakov, ki so statistično značilno povezani s tipom ERIC II in ne z ERIC I, se pri tipu ERIC II pojavlja bolj pogosto kot bi pričakovali, če povezave ne bi bilo. Ti klinični znaki so zalega neenakomerne starosti ($p = 0,0225$), mrtve ličinke v celicah ($p = 0,0145$), ličinke spremenjene barve ($p = 0,0389$), vlecljiva vsebina celic belega ($p = 0,0167$) ali rjavega ($p < 0,0001$) odtenka, posamezne poapnele ličinke ($p = 0,0273$), bolezenske spremembe prisotne na svetlem ($p = 0,0094$) in temnem ($p = 0,0640$) satu, spremembe na enem ($p = 0,0003$) ali dveh ($p < 0,0001$) satih, delno oslabela ($p = 0,0447$) ter izropana ($p = 0,0610$) čebelja družina.

4.3. Identifikacija bakterije *P. larvae* z metodo MALDI-TOF

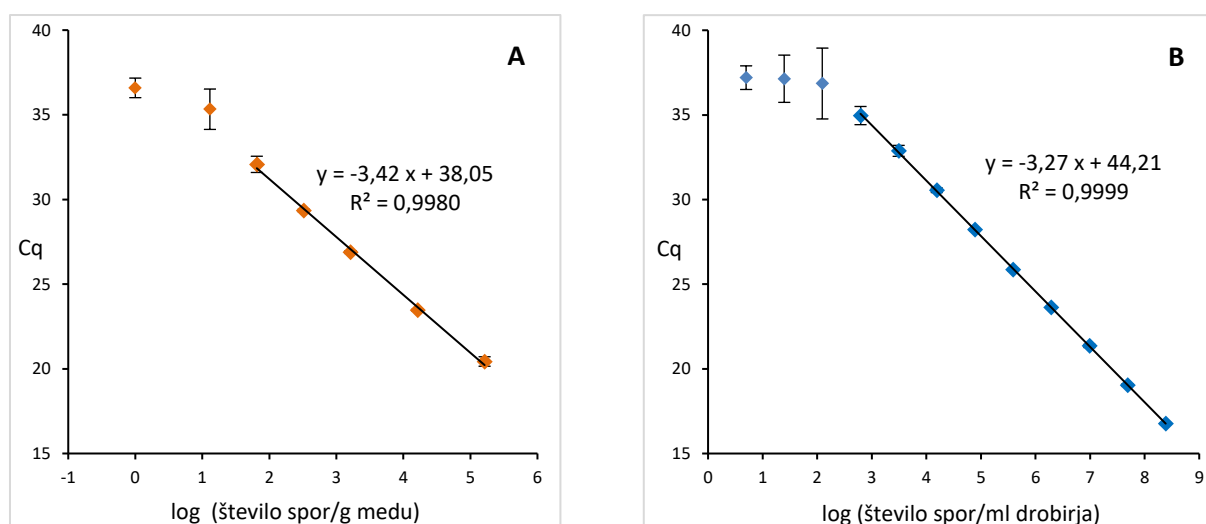
V vseh fazah validacijskega postopka je bila identifikacija referenčnih in ostalih kontrolnih sevov pravilna in zanesljiva, zato smo metodo vključili v rutinsko delo za determinacijo bakterije *P. larvae*. V primerjavi s klasičnimi metodami je identifikacija z masno spektrometrijo MALDI-TOF veliko cenejša in hitrejša, saj izolat v čisti kulturi lahko zanesljivo identificiramo v 10–15 min. Slednje je izjemno pomembno zlasti takrat, kadar gre za klinične primere hude gnilobe, ko je potrebno ukrepati hitro in zanesljivo. Uporabljena aparatura naj bi omogočala tudi razlikovanje tipov ERIC I in II na osnovi analize masnega spektra (Schäfer in sod., 2014), vendar se to ni izkazalo kot izvedljivo na uporabljeni aparaturi Bruker Daltonics.

Identifikacija z metodo MALDI-TOF nam je omogočila tudi identifikacijo različnih drugih bakterij in kvasovk, ki se občasno lahko namnožijo v celicah zalege in prehodno prav tako lahko vplivajo na zdravstveno stanje čebelje družine. Tako smo npr. v nekaj primerih ugotovili intenzivno preraščanje gojišč z bakterijo *Morganella morganii*, vendar je pri tem potrebna velika previdnost pri interpretaciji pomena take bakterije, ki nam lahko tudi prekrije pravo sliko in vzrok bolezni.

4.4. Kvantifikacija spor *P. larvae* v medu in drobirju

Test qPCR (tj. začetna oligonukleotida F in R ter sonda za pomnoževanje gena za metaloproteinazo pri bakteriji *P. larvae*) je pokazal 100 % ekskluzivnost in inkluzivnost tako *in silico* kot tudi *in vitro*. Poleg tega ni imel znanih homologov pri drugih vrstah, medtem ko so bile regije prileganja začetnih oligonukleotidov in sonde pri vseh izolatih *P. larvae* popolnoma ohranjene (podatki niso prikazani). Gen za metaloproteinazo je bil pri vseh preiskovanih izolatih prisoten v eni kopiji.

Umeritveni krivulji qPCR za oba tipa vzorcev sta prikazani na **sliki 1**. Analitska učinkovitost (inkluzivnost in ekskluzivnost) ter med validacijo in umerjanjem pridobljeni parametri (predvsem LOD in LOQ; **preglednica 4**) kažejo na visoko zanesljivost in občutljivost vpeljane metode qPCR. Učinkovitost metode blizu 100 %, tako za med kot za drobir, kaže na odsotnost vpliva inhibitorjev na pomnoževanje tarčne DNA.



Slika 1. Umeritvena krivulja za kvantifikacijo spor *P. larvae* v vzorcih medu (A) in drobirja (B) z metodo qPCR. Na grafih sta prikazani enačbi umeritvene krivulje oz. regresijske premice; točke umeritvene krivulje s prevelikim sipanjem rezultatov niso vključene v izračun. Standardni odkloni so prikazani kot intervali napake.

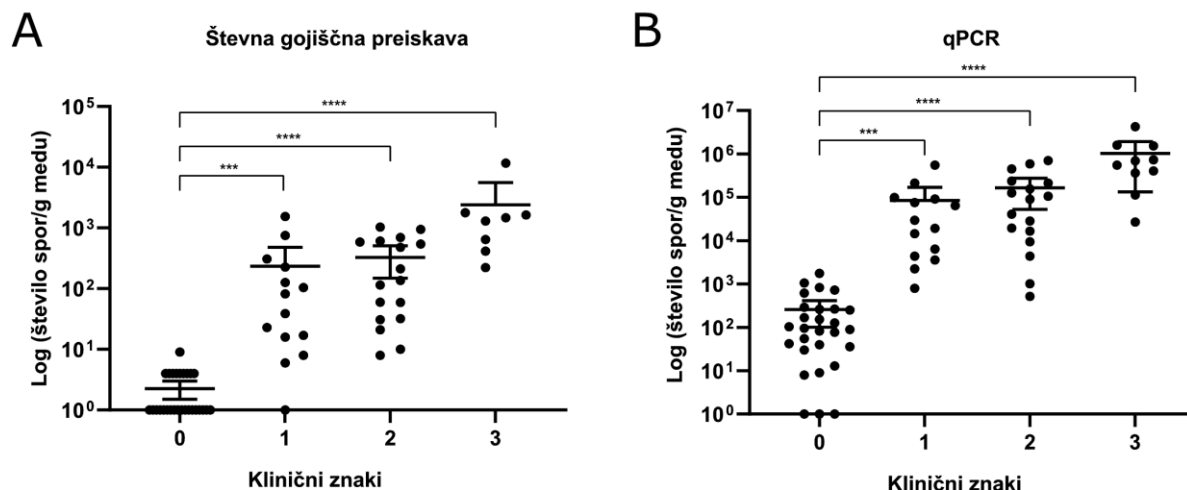
Preglednica 4. Analitski parametri metode qPCR za vzorce medu in drobirja.

	Med	Drobir
Mejna vrednost Cq	38,0	38,0
LOD [št. spor/enoto vzorca]	8	188
LOQ [št. spor/enoto vzorca]	58	707
Učinkovitost (%)	95,6	102,1

LOD, meja detekcije; LOQ, meja kvantifikacije

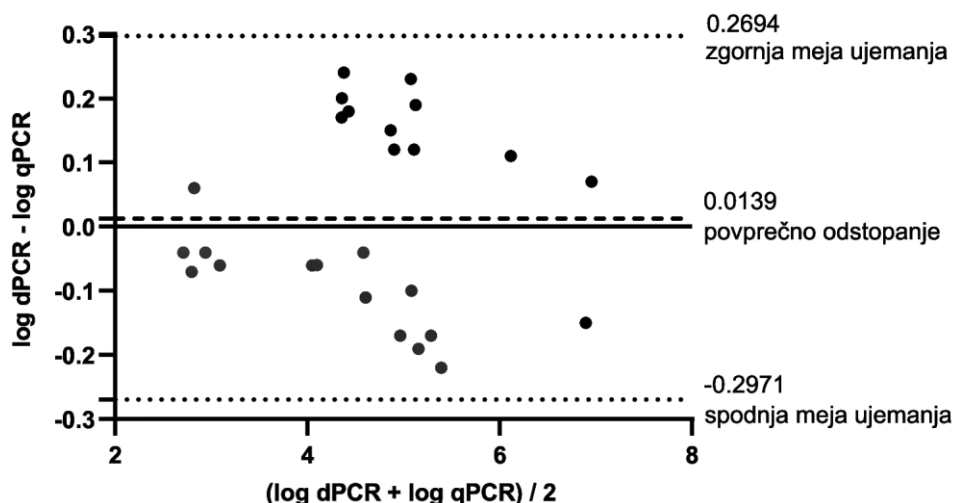
Povezava med številom spor v medu in klinično sliko. Število spor v vzorcih medu iz klinično negativnih družin je bilo močno značilno manjše kot tisto iz klinično pozitivnih družin tako po številni gojiščni preiskavi kot po metodi qPCR (**slika 2**). Čeprav se je pri obeh kvantifikacijskih metodah kazal trend večjega števila spor z večjo intenziteto kliničnih znakov, te razlike niso bile značilne pri nobeni od metod (**slika 2**). Število spor po metodi qPCR je bilo pri vseh vzorcih večje kot tisto po gojiščni številni metodi. Povprečni faktor kalitve spor je znašal 0,52 % (razpon: 0,04–6,05 %). V grobem so klinično pozitivni vzorci medu vsebovali več kot 10 spor/g medu po številni gojiščni preiskavi in več kot 1000 spor/g medu po metodi qPCR (**slika 2**). Z metodo qPCR ugotovljeno najmanjše število spor iz klinično pozitivnih družin je znašalo 516 spor/g medu. Izpostaviti velja, da je en vzorec, ki je izviral iz klinično pozitivne družine, bil po številni gojiščni preiskavi negativen, medtem ko smo z metodo qPCR v njem ugotovili 799 spor/g medu.

Pri vzorcih medu iz klinično *pozitivnih* družin ($n = 41$) je metoda qPCR pri vseh (41/41) pokazala pozitiven rezultat nad vrednostjo LOQ, medtem ko je gojiščna preiskava pri večini vzorcev (40/41) pokazala pozitiven rezultat, vendar le pri 30 vzorcih nad mejo kvantifikacije (≥ 15 CFU/gojišče). Pri vzorcih medu iz klinično *negativnih* družin ($n = 28$) je metoda qPCR pokazala pozitiven rezultat nad vrednostjo LOQ pri več kot polovici vzorcev (17/28) (nad vrednostjo LOD pri 24 vzorcih); pri dveh vzorcih iz klinično negativnih družin, ki sta izvirali iz HGČZ-negativnih čebelnjakov, je metoda qPCR pokazala negativen rezultat. Pri vzorcih medu iz klinično negativnih družin je gojiščna metoda pokazala pozitiven rezultat pri tretjini vzorcev (10/28), vendar le pri enem nad mejo kvantifikacije.



Slika 2. Povezava med številom spor/g medu in klinično sliko v pripadajoči čebelji družini po števeni gojiščni preiskavi (A) in kvantifikaciji z metodo qPCR (B). Analizo smo izvedli na naboru 69 vzorcev medu, ki so izvirali iz družin s podrobno opredeljeno klinično sliko (41 iz klinično pozitivnih, 28 iz klinično negativnih). Klinične znake smo po intenziteti razvrstili v štiri skupine (0–4), pri čemer 0 pomeni odsotnost znakov, 4 pa največjo intenziteto znakov (**priloga 2**). Z zvezdicami so označene vse statistično značilne razlike (vrednost $p < 0,05$). Legenda: ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$.

Število spor v vzorcih drobirja. Pri vzorcih drobirja iz klinično *negativnih* družin ($n = 30$), ki so izvirale iz HGČZ-pozitivnih čebeljakov (29/30), je metoda qPCR vedno pokazala pozitiven rezultat, vendar nad vrednostjo LOQ pri 27 vzorcih. Pri vzorcu (1/30) iz HGČZ-negativnega čebeljnaka je bil rezultat negativen.



Slika 3. Grafikon Bland-Altman, ki prikazuje ujemanje metod qPCR in dPCR. Analizo smo izvedli na naboru 14 vzorcev medu in 12 vzorcev drobirja, ki so imeli število spor nad mejo kvantifikacije po obeh metodah.

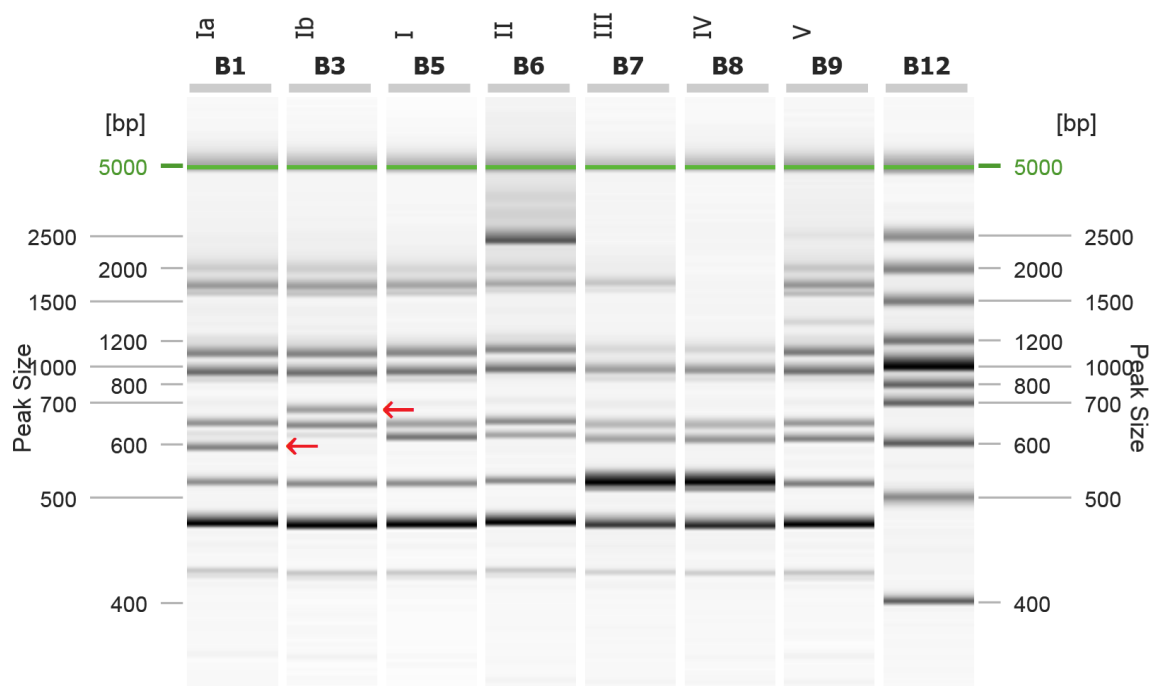
Primerjava metod qPCR in dPCR. Analiza Bland-Altman je pokazala visoko ujemanje med metodama qPCR in dPCR za oba tipa čebeljih vzorcev (med in drobir) (**slika 3**), kar kaže na možnost nadomestitve ene metode z drugo. Povprečno odstopanje $\pm$ standardni odklon (SD) je znašalo $0,0139 \pm 0,1445$.

Spodnja in zgornja meja skladnosti, ki sta definirana kot povprečno odstopanje $\pm 1,96$ SD, sta znašali $-0,2694$ in $0,2971$, kar potrjuje majhna odstopanja med metodama. Obe metodi sta močno korelirali (Pearsonov koeficient korelacije $r = 0,9918$; $p < 0,0001$). Regresijska analiza je prav tako pokazala značilno in pozitivno korelacijo med metodama ($p < 0,0001$).

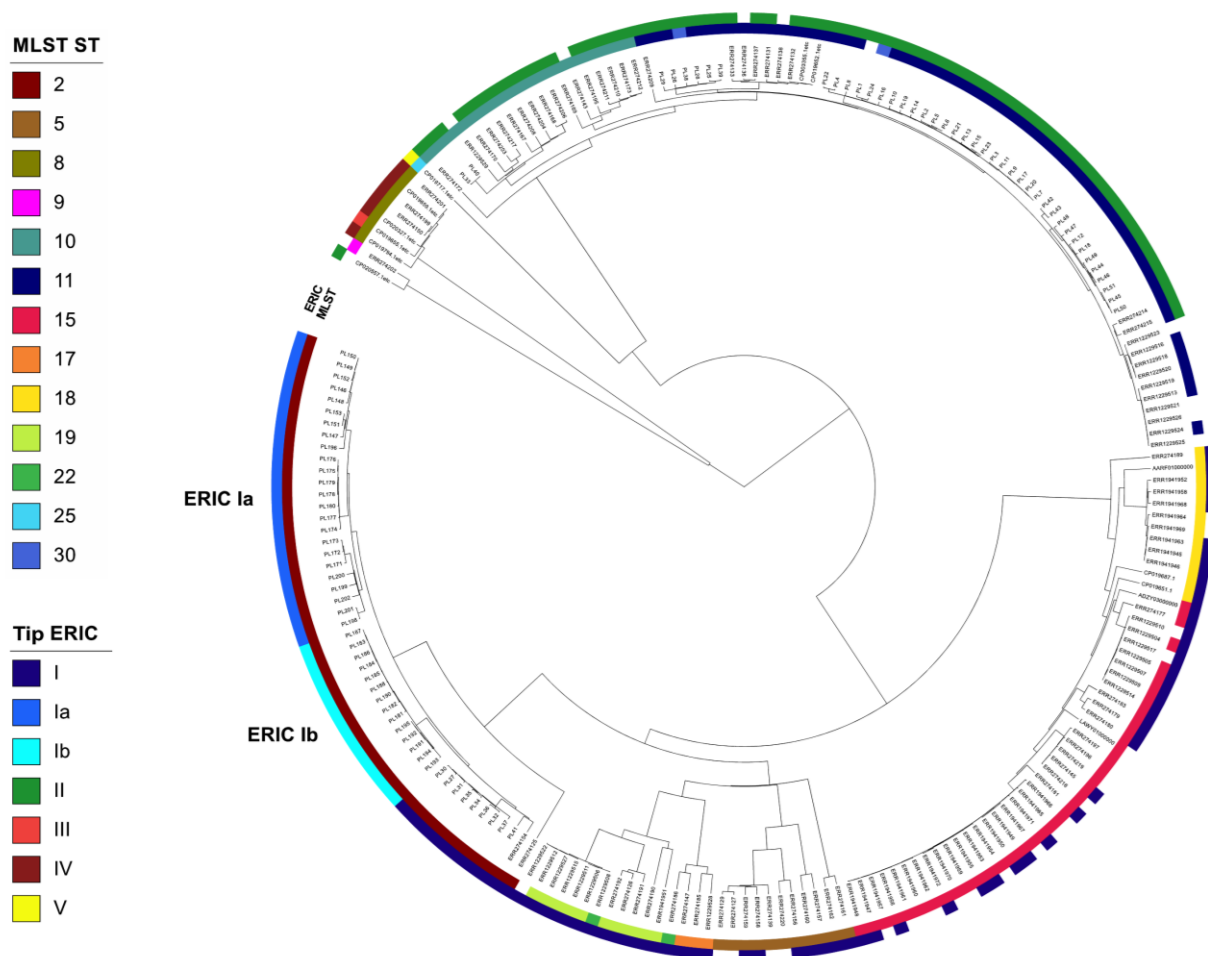
4.5. Tipizacija izolatov *P. larvae* z metodo ERIC-PCR

Skupno smo z metodo ERIC-PCR tipizirali 583 izolatov *P. larvae* (513 iz cele Slovenije in 70 dodatnih za ugotavljanje raznolikosti bakterije *P. larvae* znotraj panja, čebelnjaka in čebelarstva); v končno analizo smo vključili 504 od 513 izolatov (pojavnost tipa ERIC v Sloveniji) ter vseh 70 dodatnih.

Profili ERIC. Izolati so izkazovali štiri različne profile ERIC (I, 'Ia', 'Ib' in II), od katerih sta se 'Ia' in 'Ib' razlikovala od klasičnega tipa ERIC I v enem pasu (**slika 4**); pri odkritju novih profilov 'Ia' in 'Ib' velja izpostaviti velikost nabora izolatov *P. larvae* za tipizacijo ERIC in prednost uporabe kapilarne elektroforeze. Ker so se izolati, ki so izkazovali nekoliko spremenjen profil prog ('Ia' in 'Ib'), na ravni celotnega genoma (analiza wgMLST; poglavje 4.6.) uvrščali v skupino (klad) ERIC I (**slika 5**), smo novo odkrita profila ERIC uvrstili v klasičen tip ERIC I; analiza WGS je pokazala, da delitev na nove (pod)type ERIC v tem primeru ni upravičena (tipizacija WGS je nadrejena tipizacijam z manjšo močjo razlikovanja, tj. tipizaciji ERIC in MLST). Kljub ozki sorodnosti izolatov s profiloma 'Ia' in 'Ib' z izolati s klasičnim profilom ERIC I so izolati 'Ia' in 'Ib' oblikovali svoji podgruči znotraj klada ERIC I; izolati 'Ia' in 'Ib', ki smo jih tipizirali z metodo WGS ($n = 38$), so izvirali iz 21 čebelnjakov, ki jih je oskrbovalo 19 čebelarjev.

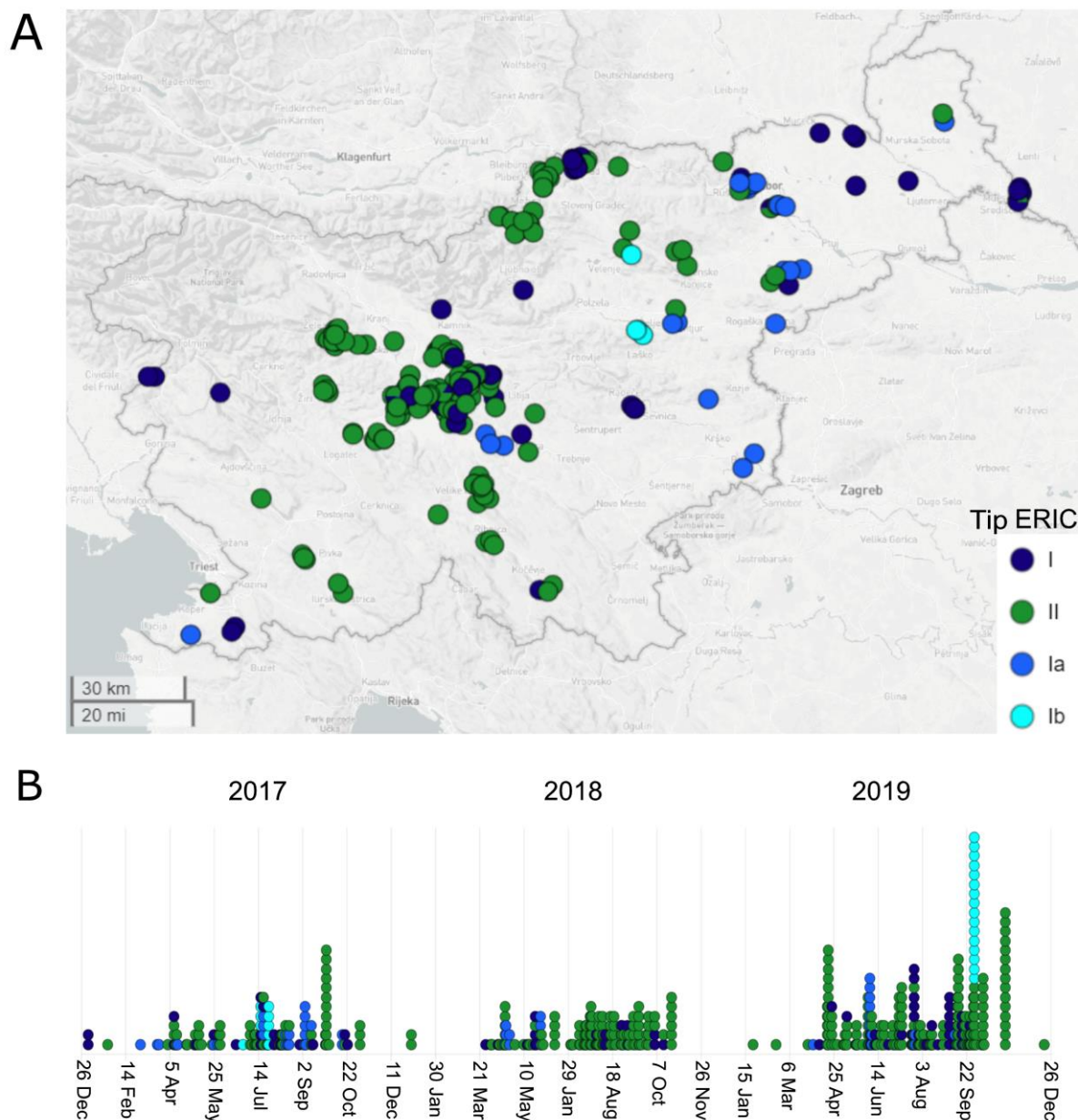


Slika 4. Profili ERIC, ki smo jih pridobili po ločitvi pomnožkov s kapilarno elektroforezo Qiaxcel (Qiagen). Profili so označeni nad vzorci, v analizo pa je vključen tudi na novo opisan tip ERIC V. Pomnožka, ki razlikujeta novo odkrita profila 'Ia' in 'Ib' od klasičnega profila ERIC I, sta označena z rdečo puščico. Pri ločevanju smo uporabili velikostni marker 'QX Alignment Marker 15–5000 bp' in poravnalni marker 'QX Size Marker 100–2500 bp' (oba Qiaxcel).



Slika 5. Filogenetsko drevo wgMLST za globalni nabor genomov *P. larvae* ($n = 179$), v katerega so vključeni tudi izolati iz slovenskega izbruha, dodani pa genomi izolatov z ERIC profili 'Ia' in 'Ib' ($n = 38$). V legendi so vsi profili ERIC navedeni pod kategorijo 'Tip ERIC', ki vsebuje pet tipov (ERIC I–V); profila 'Ia' in 'Ib' se glede na tipizacijo WGS uvrščata v tip ERIC I (ne gre za nove (pod)tipa ERIC). Drevo je izdelano na osnovi primerjave 5745 lokusov wgMLST z metodo UPGMA. Na sliki so z barvo označeni tipi MLST in tipi/profili ERIC.

Pojavnost tipov ERIC v Sloveniji. Tip ERIC II je bil prevladujoč tip (70,2 %), sledil pa mu je tip ERIC I (s klasičnim profilom prog pri 51,0 % ERIC I izolatov, profilom 'Ia' pri 32,3 % ERIC I izolatov in profilom 'Ib' pri 16,7 % ERIC I izolatov). Geografska in časovna razporeditev tipov ERIC v Sloveniji v obdobju 2017–2019 je predstavljena na **sliki 6**. Posebnih trendov v razporeditvi nismo ugotovili; izjema so bili izolati s profilom 'Ib', ki so bili geografsko omejeni in jih nismo ugotovili v letu 2018.



Slika 6. Pojavnost tipov/profilov ERIC v Sloveniji glede na lokacijo (A) in čas (B). V legendi so vsi profili ERIC navedeni pod kategorijo 'Tip ERIC'; profila 'Ia' in 'Ib' se uvrščata v tip ERIC I. V analizo smo zajeli 504 izolate *P. larvae* iz let 2017–2019. Vsak krog predstavlja čebelnjak (A) ali izolat (B) in je obarvan glede na tip/profil ERIC. V 107 primerih je bil analiziran več kot en izolat na čebelnjak; velikost krogov ni sorazmerna številu izolatov. Za prikaz smo uporabili orodje Microreact (Argimón in sod., 2016).

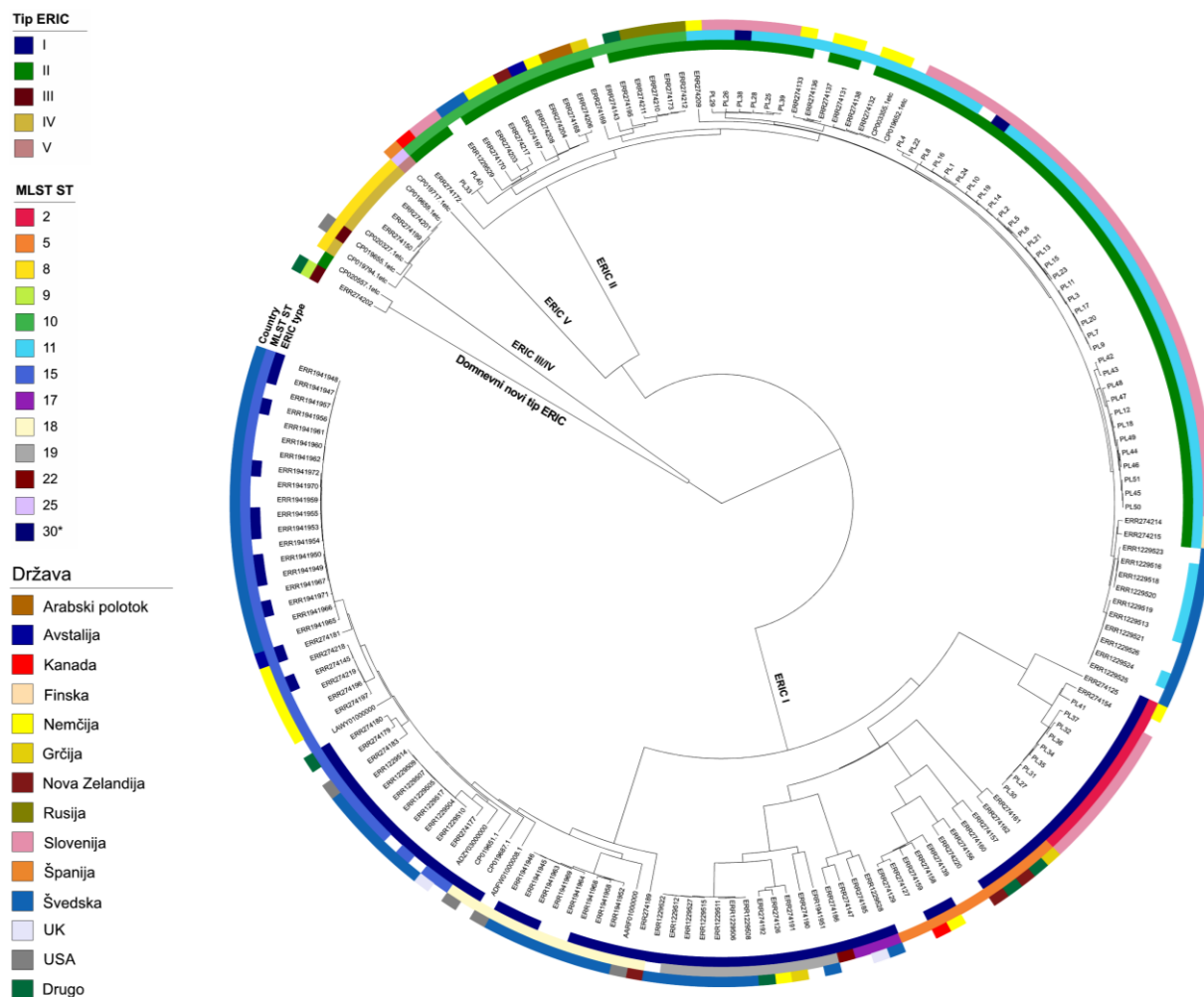
Raznolikost izolatov *P. larvae* znotraj čebelarstva. Po analizi 70 izolatov *P. larvae* iz medu in 16 izolatov iz spremenjene zalege iz izbranega čebelarstva s tremi HGČZ-pozitivnimi čebeljnaki smo ugotovili, da je vseh 86 izolatov pripadalo tipu ERIC II. Izbrane izolate (26 iz medu in 14 iz zalege) smo za ugotavljanje raznolikosti bakterije *P. larvae* znotraj panja, čebeljnaka in čebelarstva tipizirali še z metodo WGS (poglavje 4.6.).

4.6. Tipizacija izolatov *P. larvae* z metodo WGS

Obsežna tehnična validacija sheme wgMLST je pokazala, da je analiza podatkov WGS z izdelano stabilno shemo ponovljiva in zajame večino genov, ki so prisotni v globalnem naboru genomov (t. i. pangénom) *P. larvae* (podatki niso prikazani). Nadalje smo epidemiološko uporabnost izdelane sheme wgMLST za tipizacijo bakterije *P. larvae* opredelili na obsežnem naboru izolatov *P. larvae*, predstavljenem v nadaljevanju.

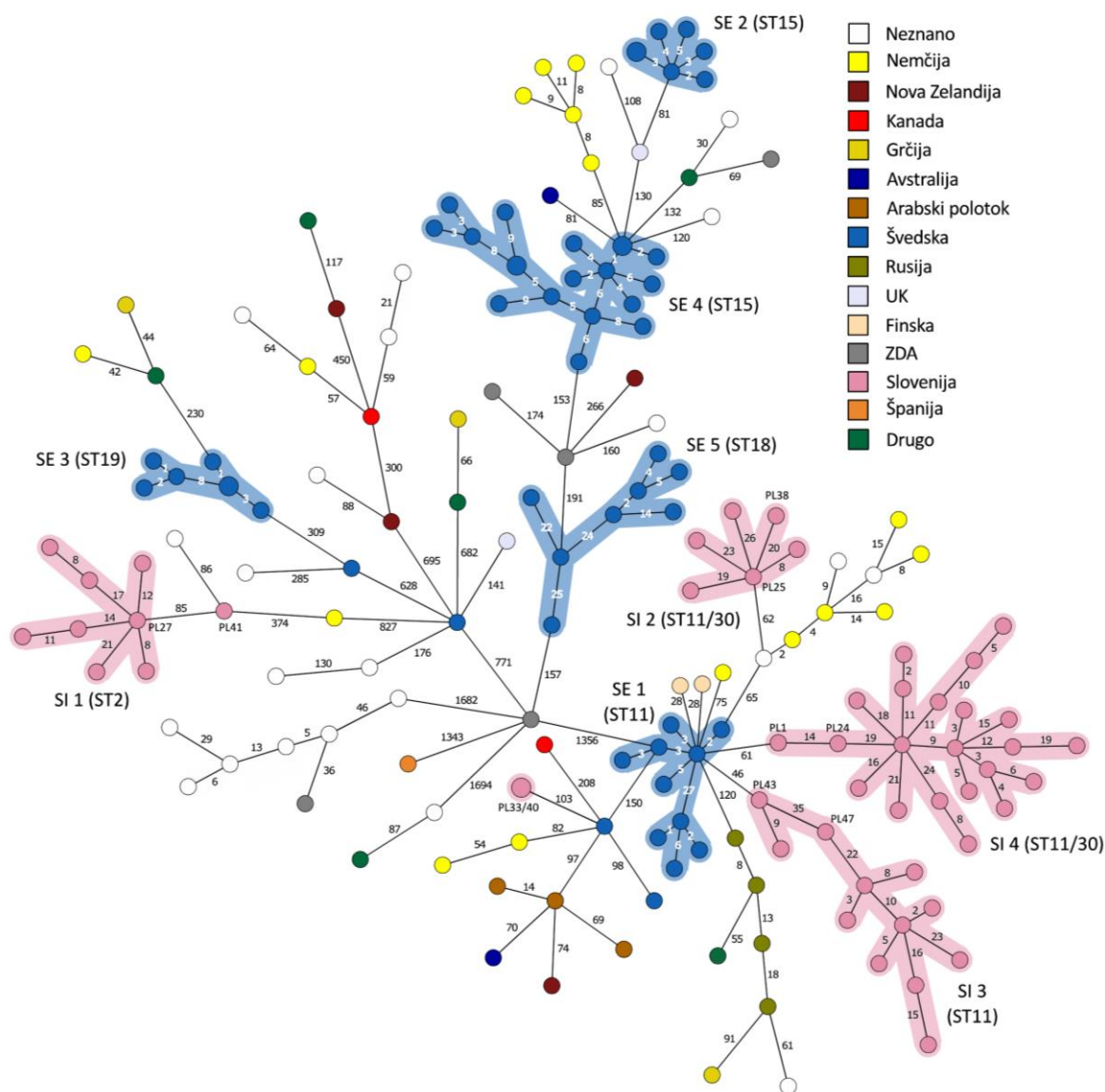
Globalna populacijska struktura bakterije *P. larvae*. Populacijsko strukturo bakterije *P. larvae* smo ugotavljali na globalnem naboru 179 genomov *P. larvae*, ki je obsegal vse tipe ERIC. Filogenetsko drevo wgMLST je pokazalo pet večjih skupin (kladov), ki so pripadale tipom ERIC I, II, III/IV in V ter kandidatnemu novemu tipu ERIC (ST9) (**slika 7**); dva javno dostopna genoma *P. larvae* CP020557.1 (neznani ST) in ERR274202 (ST9) smo z analizo wgMLST določili kot predstavnika kandidatnega novega tipa ERIC. Pokazali smo, da epidemiološko najpomembnejša tipa ERIC I in II oblikujeta jasno ločena klada ter da je genetska raznolikost tipa ERIC I večja kot raznolikost tipa ERIC II.

Ugotovili smo, da lahko iz podatkov WGS zanesljivo napovemo tudi tip ERIC (glede na razvrščanje na filogenetskem drevesu) in MLST (iz genomske zaporedij); topologija filogenetskega drevesa MLST se ni popolnoma ujemala s topologijo filogenetskega drevesa wgMLST in ni imela zadostne moči razlikovanja za opredelitev gruče klonalnih izolatov, zato metoda MLST ni primerna za dokončno potrditev izbruhov. Na naboru 51 izolatov *P. larvae* iz Slovenije smo ugotovili popolno (100 %) ujemanje med konvencionalnim tipom ERIC (ERIC-PCR) in tipom ERIC, ki smo ga napovedali na osnovi razvrščanja izolatov na drevesu wgMLST (WGS) (**slika 7**). Med slovenskimi izolati smo ugotovili dva izolata (PL24 in PL38), ki nista pripadala nobenemu od obstoječih sekvenčnih tipov, saj sta imela novo alelno različico lokusa *ftsA* in sta bila ozko sorodna izolatoma ST11-ERIC II. V podatkovno zbirko PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/paenibacillus-larvae/>) smo ta sekvenčni tip deponirali kot nov tip ST30. En slovenski izolat (PL1) ni imel enega od sedmih preiskovanih lokusov pri tipizaciji MLST (gen *Natrans*), kar smo potrdili z metodama WGS in PCR.

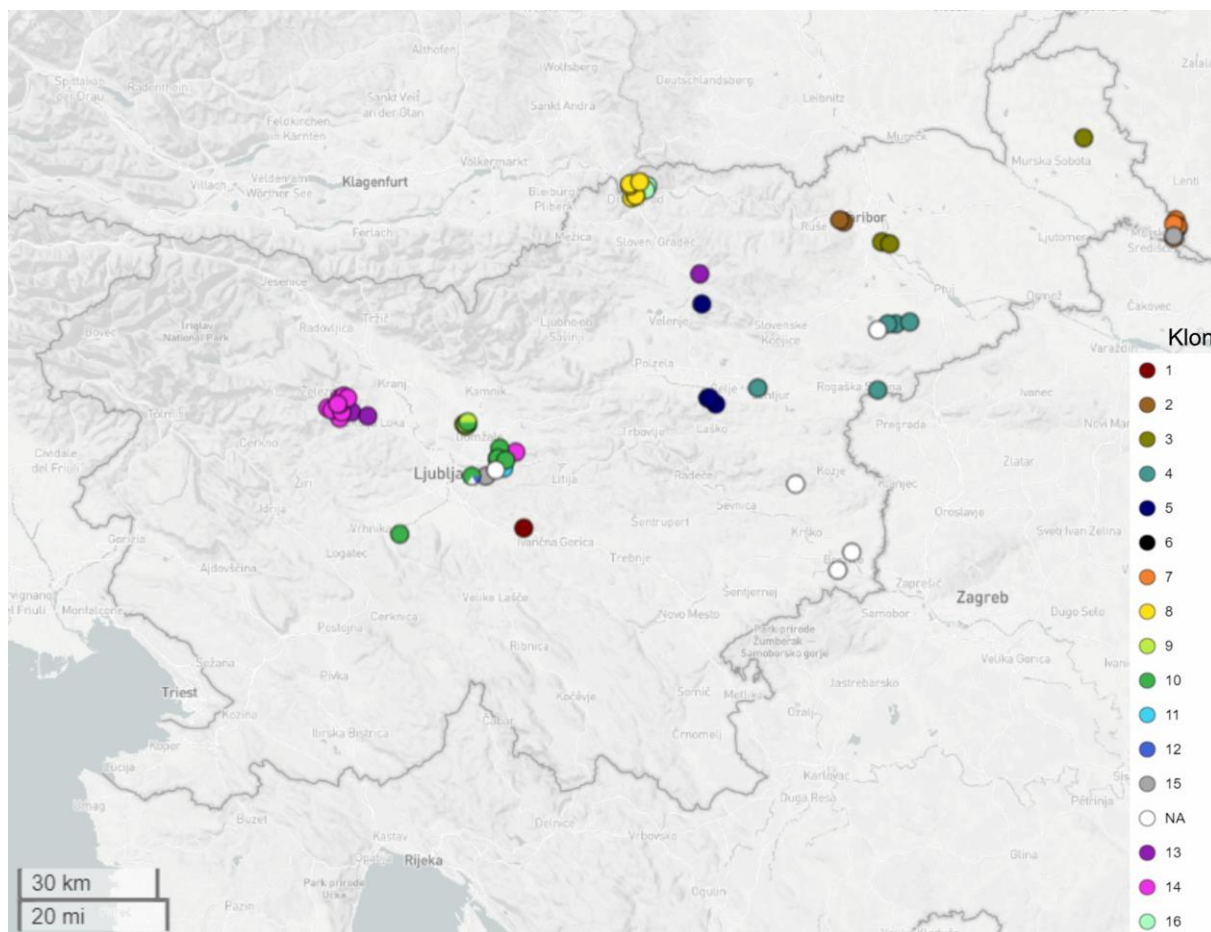


Slika 7. Filogenetsko drevo wgMLST za globalni nabor genomov *P. larvae*, v katerega so vključeni tudi izolati iz slovenskega izbruha. Drevo je izdelano na osnovi primerjave 5745 lokusov wgMLST z metodo UPGMA. Na sliki so z barvo označeni tip MLST, tip ERIC in država izvora. V analizo smo zajeli 179 izolatov *P. larvae* iz globalnega nabora genomov; od tega je 51 izolatov izviralo iz Slovenije, ki smo jih sekvencirali v okviru projekta in so pripadali izbruhu, predstavljenem na **sliki 11**.

Populacijska struktura izolatov *P. larvae* iz Slovenije. Skupno smo z metodo wgMLST tipizirali 202 izolata *P. larvae* iz Slovenije iz obdobja 2017–2019. Za analizo gruč (identifikacijo gruč izolatov klonalnega izvora) smo uporabili mejo 35 alelov na MST wgMLST (**slika 8**). S to mejo smo namreč dosegli najbolj optimalno (najvišjo) specifičnost in občutljivost, pri čemer je specifičnost pomenila sposobnost razlikovanja genetsko in epidemiološko povezanih izolatov od nepovezanih, občutljivost pa sposobnost identifikacije vseh genetsko in epidemiološko povezanih izolatov. Ugotovili smo 16 različnih gruč (klonov) bakterije *P. larvae* v Sloveniji (**slika 9**). Z analizo klonov *P. larvae* glede na njihovo geografsko in časovno pojavljanje smo ugotovili, da je bila večina gruč geografsko omejenih, nekatere gruče pa so poleg geografsko bližnjih izolatov vključevale tudi izolate iz geografsko lahko zelo oddaljenih regij, ki niso bili del istega kužnega kroga (**slike 9, 10 in 11**).



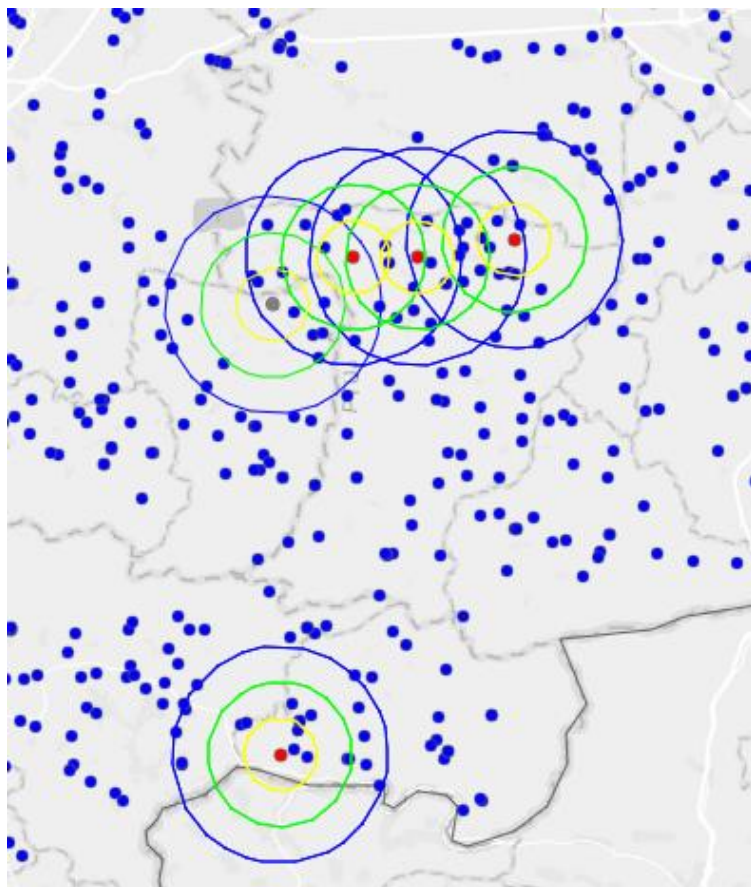
Slika 8. Minimalno vpeto drevo (MST) wgMLST za globalni nabor genomov *P. larvae*, v katerega so vključeni tudi izolati iz slovenskega izbruha. Drevo je izrisano na osnovi primerjave 5745 lokusov wgMLST. V analizo smo zajeli 179 izolatov *P. larvae* iz globalnega nabora genomov; od tega je 51 izolatov izviralo iz Slovenije, ki smo jih sekvencirali v okviru projekta in so pripadali izbruhu, predstavljenem na **sliki 11**. Krogi predstavljajo izolate in so obarvani po državi izvora. Številke na povezavah predstavljajo število razlik v alelih wgMLST. Genetsko povezani (klonalni) izolati (≤ 35 alelov razlike) imajo barvno obrobo. Na sliki so poleg izbruha HGČZ v Sloveniji (SI) predstavljeni tudi predhodno opisani izbruhi HGČZ na Švedskem (SE).



Slika 9. Geografska porazdelitev klonov *P. larvae* v Sloveniji, pridobljenih z metodo WGS. Klone smo opredelili glede na analizo wgMLST, v katero smo zajeli 202 izolata *P. larvae*. V isti klon (gručo) smo razvrstili izolate z ≤ 35 aleli razlike. Vsak krog predstavlja čebelnjak s pripadajočim klonom izolata (ali kloni), ki so različno obarvani; belo obarvani izolati niso imeli pripadajoče gruče (angl. *not assigned*, NA). Za prikaz smo uporabili orodje Microreact (Argimón in sod., 2016).

Za vsako od 16 ugotovljenih gruč (klonov) bakterije *P. larvae* smo identificirali prvi čebelnjak, pri katerem je bila HGČZ prvič potrjena (t. i. '*index*' čebelnjak). Od '*index*' čebelnjaka smo izračunali najmanjšo razdaljo do sosednjih čebelnjakov s klinično potrjeno boleznijo, ki so se nahajali v polmeru < 10 km in imeli isti klon *P. larvae*; s tem smo zagotovo zajeli največjo preletno razdaljo čebel, s katero bi lahko prišlo do prenosa klona z aktivnostjo čebel. Največja razdalja do sosednjega čebelnjaka je bila 2632 m. Rezultati kažejo, da 3-km kužni krog uspešno zaobjame naravni prenos HGČZ z aktivnostjo (preletom) čebel; v primeru ugotovitve zelo sorodnih sevov *P. larvae* na večjih razdaljah je najverjetneje šlo za širjenje bolezni zaradi človeške aktivnosti, npr. s prevozom (potencialno bolnih) čebeljih družin na oddaljeno pašo ali zaradi prodaje. Širjenje klonov *P. larvae* znotraj in med kužnimi krogi smo opredelili tudi z izrisom zemljevida, na katerem smo okoli vsakega HGČZ-pozitivnega čebelnjaka, iz katerega smo imeli na razpolago tipizirane izolate *P. larvae*, izrisali kroge z različnim polmerom (1, 2 oz. 3 km) (**slika 10**). Tudi s tem prikazom smo potrdili, da 3-km kužni krog uspešno zaobjame vse klinično pozitivne čebelnjake, med katerimi lahko širjenje klona *P. larvae* pojasnimo s preletom čebel. Z zmanjšanjem polmera kroga na 1 oz. 2 km v kužni krog ne bi zajeli vseh klinično pozitivnih čebelnjakov, v katerih smo ugotovili isti klon *P. larvae* (**slika 10**). Primer, predstavljen na **sliki 10**, je informativen tudi zato, ker smo isti klon *P. larvae* ugotovili tudi v

geografsko oddaljenem čebelnjaku (> 10 km), zato v tem primeru širjenja klona *P. larvae* ne moremo pojasniti z aktivnostjo čebel, temveč z aktivnostjo čebelarjev.



Slika 10. Primer širjenja klona *P. larvae* znotraj kužnega kroga in med kužnimi krogi. Točke na zemljevidu predstavljajo čebelnjake. Z rdečo so predstavljeni klinično pozitivni čebelnjaki, pri katerih smo ugotovili prisotnost istega klona *P. larvae*. S sivo je predstavljen sporadičen sev *P. larvae* iz klinično pozitivnega čebelnjaka, ki smo ga ugotovili v istem časovnem obdobju, vendar je bil genetsko drugačen kot rdeče označen klon. Z modro so označeni vsi preostali registrirani čebelnjaki brez potrjene HGČZ. Okoli klinično pozitivnih čebelnjakov smo izrisali kroge s polmerom 1 km (rumena), 2 km (zelena) in 3 km (modra).

Po drugi strani smo znotraj 3-km kužnih krogov ugotovili prisotnost nesorodnih sevov *P. larvae*, kar kaže na kompleksne poti širjenja bakterije *P. larvae* in mešane (multiklonalne) izbruhe HGČZ; ker smo slednje odkrili zaradi pregleda drugih čebelnjakov okoli 'index' čebelnjaka znotraj ustanovljenega kužnega kroga, lahko sklepamo tudi na prikrite, neprepoznane ali neprijavljene primere HGČZ v teh čebelnjakihih.

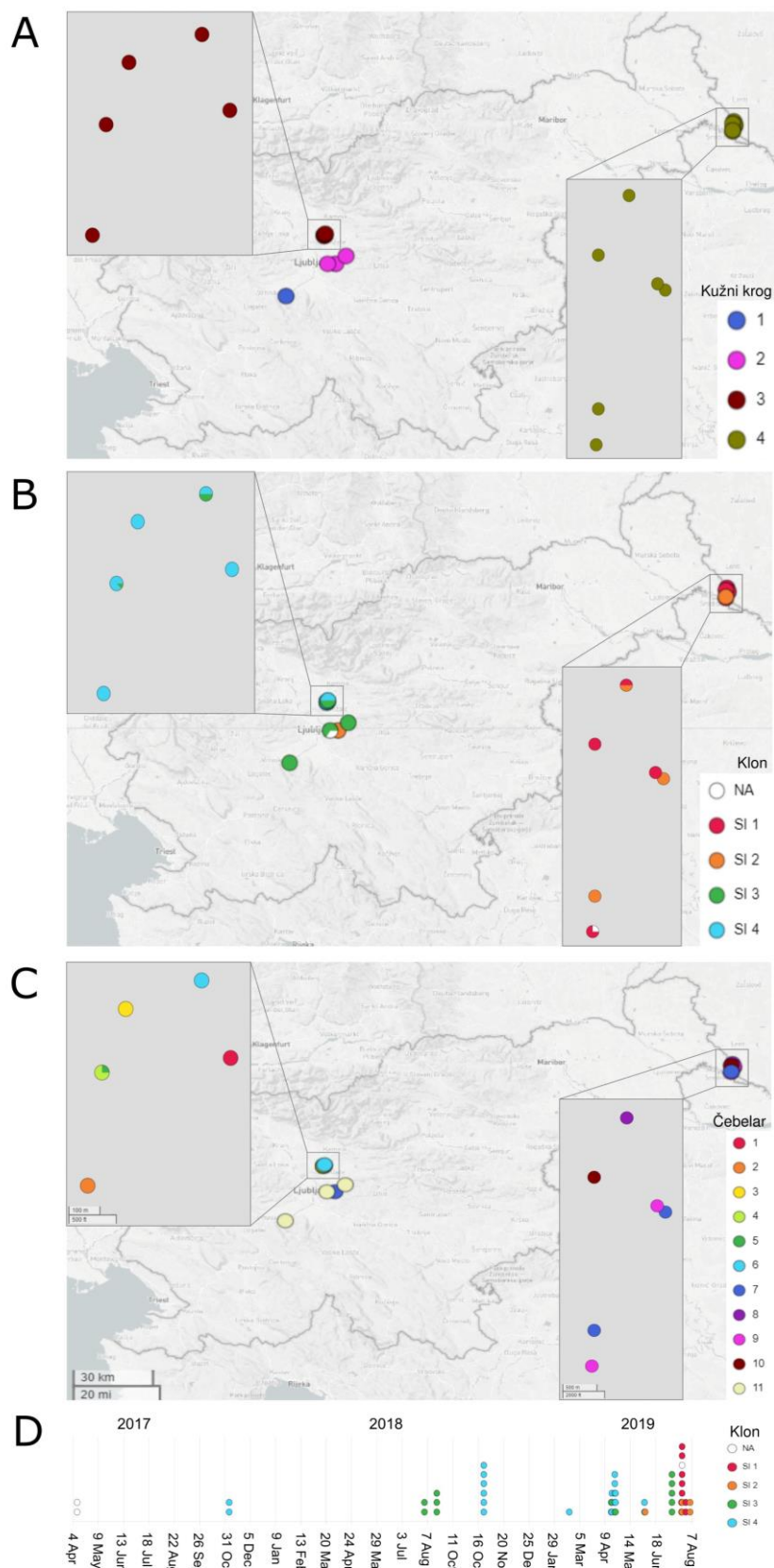
Raznolikost izolatov *P. larvae* znotraj čebelarstva. Za opredelitev raznolikosti izolatov *P. larvae* znotraj čebelarstva smo z metodo WGS tipizirali 40 izolatov, ki so izvirali iz čebelarstva s tremi čebelnjaki v severozahodni Sloveniji. Od tega je 14 izolatov izviralo iz zalege, 26 pa iz medu; vsi izolati so bili iz leta 2019 in so pripadali tipu ERIC II-ST11. Na drevesu wgMLST (podatki niso prikazani) posebnega razvrščanja izolatov glede na vir izolacije ali čebelnjak nismo ugotovili. Mediana genetska razdalja med vsemi izolati je znašala 10 alelov wgMLST (minimum = 1, maksimum = 22).

Epidemiološko uporabnost sheme za opredelitev izbruhov hude gnilobe čebelje zalege smo ugotavljali na naboru izolatov iz izbruhov v Sloveniji (ta projekt) in na Švedskem (Ågren in sod., 2017).

Izbruh v Sloveniji (2017–2019). Uporabnost metode WGS in sheme wgMLST za dokončno opredelitev izbruhov hude gnilobe smo opredelili na primeru 51 izolatov iz Slovenije, ki so izvirali iz obsežnega izbruha HGČZ v letih 2017–2019 (**slika 11**). Ugotovili smo, da se izolati istega klona razlikujejo v največ 35 alelih wgMLST glede na MST (**slika 8**) oz. v največ 49 alelih wgMLST glede na razdalje v matriki parnih razdalj. Ugotovili smo, da so bili v izbruhu udeleženi trije kloni ERIC II (ST11/30) in en klon ERIC I (ST2) (**sliki 8 in 11**).

Genetske razdalje smo interpretirali v kontekstu spremljajočih epizootioloških podatkov. Ugotovili smo, da en kužni krog lahko vsebuje več klonov bakterije *P. larvae*, kar kaže na prisotnost mešanih (multiklonalnih) izbruhov HGČZ (**slike 9, 10 in 11**). Poleg tega je lahko en klon prisoten v več kužnih krogih, kar kaže na prenos klona med kužnimi krogi. Poleg prenosa klona znotraj kužnega kroga (preletne razdalje čebel) torej do njegovega prenosa prihaja tudi med kužnimi krogi npr. zaradi premika čebel na pašo in oskrbovanja več čebelnjakov s strani enega čebelarja (**sliki 9, 10 in 11**).

Izbruha na Švedskem (2012–2014). Epidemiološko uporabnost sheme wgMLST smo potrdili tudi na primeru dveh predhodno opisanih izbruhov HGČZ na Švedskem, ki so ju opredelili z metodo WGS (Ågren in sod., 2017). Ugotovili smo, da s predlagano mejo 35 alelov wgMLST na MST ugotovimo enake gruče klonalnih izolatov, kot so jih opisali avtorji na osnovi analize cgMLST. Izjema sta bili dve ozko sorodni gruči izolatov ERIC II-ST11, ki sta se razlikovali le v 27 alelih wgMLST in bili epizootiološko povezani, zato smo ju interpretirali kot genetsko povezani oz. kot isti klon (**slika 8**).



Slika 11. Obsežen izbruh HGČZ v Sloveniji, 2017–2019. V analizo wgMLST smo zajeli 51 izolatov *P. larvae*. Izolati so prikazani glede na pripadajoč kužni krog (A), klon wgMLST (≤ 35 alelov razlike; B), čebelarja (C) in čas izolacije (D). Vsak krog predstavlja čebelnjak (A–C) ali izolat (D). Za prikaz smo uporabili orodje Microreact (Argimón in sod., 2016).

5. RAZPRAVA

HGČZ je najhujša bakterijska okužba medonosne čebele (*A. mellifera*), ki jo povzroča sporogena bakterija *P. larvae*. Razumevanje genetske raznolikosti bakterije *P. larvae* je kljub njenemu pomenu slabo in do sedaj je samo ena raziskava vključevala tipizacijo povzročitelja s sekvenciranjem celotnih genomov (Ågren in sod., 2017), ki je trenutno ultimativna metoda za tipizacijo mikrobnih patogenov. Poleg tega ni zanesljivih molekularnih metod za kvantifikacijo spor *P. larvae* v čebeljih vzorcih, s katerimi bi lahko identificirali čebelje družine s povečanim tveganjem za pojav bolezni in zmanjšali ekonomske izgube v čebelarstvu zaradi HGČZ.

V tem projektu smo v rutinsko diagnostiko bakterije *P. larvae* vpeljali masno spektrometrijo MALDI-TOF, kar je pohitilo in poenostavilo identifikacijo omenjene bakterije. Izdelali smo test qPCR, ki omogoča zanesljivo molekularno kvantifikacijo spor *P. larvae* v vzorcih medu in drobirja ter potrdili povezavo med večjim številom spor *P. larvae* v vzorcih medu in prisotnostjo klinične slike. Z metodo ERIC-PCR smo tipizirali obsežen nabor izolatov *P. larvae* iz Slovenije (583 izolatov iz let 2017–2019) in za analizo profilov ERIC kot prvi uporabili kapilarno elektroforezo. Ugotovili smo, da v Sloveniji prevladuje tip ERIC II (70,2 % izolatov) in odkrili dva nova profila prog pri tipu ERIC I ('Ia' in 'Ib'); zanju je tipizacija WGS pokazala, da ne predstavljata novih (pod)tipov ERIC. Izdelali smo stabilno shemo wgMLST, kar sedaj omogoča standardizirano tipizacijo bakterije *P. larvae* z metodo WGS, ter z njo opredelili populacijsko strukturo izolatov *P. larvae* v Sloveniji in v svetu. Shemo wgMLST smo uspešno uporabili tudi za opredelitev izbruhov HGČZ. Poleg tega smo izvedli natančno epidemiološko anketo, s katero smo preučili vzorec populacije čebelarjev, čebelarke prakse, dejavnike tveganja in klinično sliko HGČZ. Zbrani rezultati predstavljajo pomemben doprinos k epidemiološkemu spremljanju HGČZ v svetovnem merilu.

Epidemiološko poizvedovanje. Glavnina čebelarjev vključenih v raziskavo je bila upokojencev s končano srednjo poklicno šolo, ki se s čebelarjenjem ukvarjajo predvsem ljubiteljsko. S čebelarjenjem se ne ukvarjajo le zaradi pridobivanja medu in drugih čebeljih proizvodov, ampak tudi zaradi skrbi za čebele, oprave in okolje. Prepoznanje tega širšega namena je bilo značilno povezano z nižjo pojavnostjo HGČZ v čebelnjakih. V nasprotju s pričakovanji so imeli čebelarji s potrjeno HGČZ v povprečju več let izkušenj s čebelarjenjem kot čebelarji pri katerih HGČZ ni bila prisotna. Poznavanje strukture populacije čebelarjev in njihovega vidika lahko pomembno pripomore k razvoju uspešnega programa za nadzor bolezni in načrtovanju komunikacije s tem ključnim deležnikom.

S prisotnostjo HGČZ sta bila v naši raziskavi značilno povezana dva dejavnika tveganja, in sicer pojav HGČZ v preteklosti ter lovljenje rojev. Drugi dejavniki se niso izkazali za statistično značilne v povezavi z HGČZ-statusom čebelnjaka, vendar to ne pomeni, da niso bili pomembni pri širjenju bolezni. Na primer, majhen delež čebelarjev, ki so si izposojali ali so posojali čebelarsko opremo, prodajali čebelje družine ali paketne čebele ter vozili čebele na pašo, je lahko razlog, da statistični testi niso pokazali značilnih razlik med HGČZ-pozitivnimi in negativnimi čebelnjaki. Pri ocenjevanju higiene čebelnjaka in opreme ter izvajanja drugih biovarnostnih ukrepov se je izkazalo, da so imeli čebelarji, ki so razmere ocenjevali kot boljše, višjo pojavnost HGČZ kot tisti čebelarji, ki so bili bolj samokritični. Iste dejavnike v čebelnjakih so nekoliko bolj kritično ocenili tudi veterinarji. Obe ocenjevanji in motivacija čebelarjev za čebelarjenje nakazujejo na možnost izboljšanja higiene in izvajanja biovarnostnih ukrepov z

ustreznim izobraževanjem čebelarjev, ki bi jim v prvem koraku pomagal objektivno oceniti stanje v čebelnjaku.

Čebelarji so v primeru suma na HGČZ v večini primerov najprej poklicali veterinarja, kar je zaželeno. Po drugi strani pa je precejšen delež čebelarjev, ki so čebele kupovali, prodajali ali jih vozili na pašo, navedel, da za opravljene aktivnosti niso imeli vedno urejene dokumentacije. To nakazuje na možnost, da so uradno beleženi podatki močno pomanjkljivi in kot taki neuporabni za epidemiološko poizvedovanje. Zanimivo bi bilo tudi zastaviti vprašanje, zakaj čebelarji ravnaajo tako različno, ko gre za zdravje njihovih čebel in preučiti, kako spodbuditi pravilno ravnanje.

Po pričakovanjih je bila pojavnost kliničnih znakov na zalegi, ličinkah, satju in moči čebelje družine odvisna od HGČZ-statusa čebelnjaka. Tudi tip ERIC je bil značilno povezan s temi in nekaj dodatnimi kliničnimi znaki. V raziskavi je bilo med HGČZ-pozitivnimi 14 čebelnjakov s tipom ERIC I, 38 s tipom ERIC II in štirje z obema tipoma ERIC. Značilne razlike smo ugotovili tudi med pojavnostjo kliničnih znakov glede na ugotovljeni tip ERIC. Ugotovljene povezave se ujemajo z navedbami v literaturi, saj je bil tip ERIC I povezan z večjim deležem spremenjenega satja, medtem ko je bil tip ERIC II povezan s spremembami na ličinkah in manjšim deležem spremenjenega satja. Genersch (2010) navaja, da so pri tipu ERIC II spremenjene le posamezne celice, ki jih čebelar in veterinar ob pregledu lahko spregledata. Predvidevamo, da je slednje, skupaj z ljubiteljsko naravo čebelarjenja pri nas, lahko eden od razlogov za večjo pojavnost tipa ERIC II v Sloveniji.

MALDI-TOF. V rutinsko diagnostiko HGČZ na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo VF smo uspešno vpeljali masno spektrometrijo MALDI-TOF, ki jo lahko uporabimo že na primarno izraženih kolonijah (Croxatto in sod., 2011; Clark in sod., 2013; Singhal in sod. 2015). S tem je diagnostika povzročitelja *P. larvae* v primerjavi s klasičnimi metodami, ki trajajo do 4–10 dni (Genersch in Otten, 2003; Genersch in sod., 2006), postala mnogo hitrejša in cenejša, saj presajanje kolonij in biokemijski testi za identifikacijo *P. larvae* niso več potrebni. Masna spektrometrija se je izkazala kot visoko specifična (ne daje pozitivnega rezultata z drugimi, ozko sorodnimi bakterijskimi vrstami) in občutljiva (identificira vse tipe ERIC *P. larvae*). Čeprav nam metoda ni omogočala ločevanja med tipoma ERIC I in II (Schäfer in sod., 2014), je njena vpeljava bistvena za samo bakteriološko diagnostiko, za ločevanje med tipi ERIC in odkrivanje morebitnih novih podtipov pa smo vpeljali mnogo bolj primerno metodo, tj. ERIC-PCR. Slednja namreč odkriva prisotnost zaporedij ERIC, zato tipizacija ni posredna preko beljakovinskih masnih spektrov, poleg tega pa omogoča odkrivanje vseh obstoječih tipov ERIC (I–V) ter morebitnih novih, ne samo tipov ERIC I in II.

Test qPCR. Do sedaj je bila za kvantifikacijo spor *P. larvae* najpogosteje uporabljena števna gojiščna metoda (Nordström in sod., 2002; Gende in sod., 2011; Forsgren in Laugen, 2014; Bassi in sod., 2018), pri kateri pa velik izziv predstavlja zanesljivost zaradi slabe in od različnih dejavnikov odvisne kalitve spor *P. larvae* (Genersch in sod., 2005; Beims in sod., 2020a; Crudele in sod., 2020); gojiščna preiskava je primerna za potrjevanje povzročitelja in je nepogrešljiva za pridobitev izolatov *P. larvae* za nadaljnje analize, glede kvantifikacije spor pa lahko podaja okvirne ocene (več/manj). V okviru projekta smo kot prvi vpeljali test qPCR za kvantifikacijo spor *P. larvae*, ki temelji na tehnologiji TaqMan, poleg tega pa metodo dPCR prvič uporabili za bakterijo *P. larvae*; metoda dPCR s sistemom za avtomatizirano razdeljevanje vzorca na zelo veliko število pod-reakcij, ki po izvedbi reakcije PCR in digitalizaciji podatkov omogoča verodostojno statistično analizo in izključi vpliv inhibitorjev, je na

voljo šele nekaj let (Kanagal-Shamanna, 2016). Pripravljeni test qPCR temelji na pomnoževanju gena za metaloproteinazo, ki je prisoten v eni kopiji na genom *P. larvae*. S tem smo znatno izboljšali kvantifikacijo spor *P. larvae* v vzorcih medu in drobirja, saj so vsi dosednji testi qPCR temeljili na manj zanesljivi tehnologiji SYBR (Matsenko in sod., 2008; Zhou in sod., 2017), omogočajo le detekcijo (in ne kvantifikacijo) bakterije *P. larvae* (Dainat in sod., 2018) ali temeljijo na pomnoževanju gena za 16S rRNA (Martínez in sod., 2010; Rossi in sod., 2018), ki se pojavlja v osmih kopijah na genom *P. larvae*, od katerih se nekatere lahko tudi razlikujejo, zato se z metodo PCR ne pomnožujejo z enako učinkovitostjo (Rossi in sod., 2018).

Potrdili smo že znano povezavo med večjim številom spor *P. larvae* v vzorcih medu in večjo verjetnostjo za pojav klinične slike. Pokazali smo, da je v medu iz klinično negativnih družin značilno manj spor kot v medu iz klinično pozitivnih družin, tako v primeru metode qPCR kot tudi v primeru številne gojiščne preiskave. Povprečno število spor v medu je naraščalo tudi z intenziteto kliničnih znakov, vendar ta povezava ni bila značilna. V grobem so imeli vzorci medu iz klinično pozitivnih družin več kot 1000 spor/g medu, tisti iz klinično negativnih družin pa manj. Predlagana meja (1000 spor/g medu) predstavlja grobo oceno za ugotavljanje družin z večjim tveganjem za pojav bolezni, vendar je ne smemo interpretirati kot absolutno, saj smo ob uporabi predlagane meje ugotovili tudi izjeme. Poleg tega je ugotovljeno število spor močno odvisno od uporabljene metodologije. V prihodnjih raziskavah bi morali predlagano mejo potrditi na večjem številu vzorcev medu in kvantifikacijo spor v čebeljih vzorcih razširiti še na vzorce drobirja in odraslih čebel, ki veljajo za boljši pokazatelj sanitarnega oz. zdravstvenega stanja družine (Lindström, 2008; Bassi in sod., 2018). Izpostaviti velja, da meja kvantifikacije za vpeljano metodo qPCR znaša 58 spor *P. larvae* na gram medu; to potrjuje, da lahko z metodo qPCR zanesljivo kvantificiramo vse vzorce medu s povečanim tveganjem za pojav bolezni (v tej raziskavi > 516 spor/g medu). Metoda qPCR je hitra in zanesljiva metoda, ki omogoča rutinske preiskave velikega števila vzorcev in ne zahteva izolacije povzročitelja v čisti kulturi. V primerjavi z gojiščno preiskavo bi z uporabo metode qPCR lahko dodatno skrajšali čas detekcije ter omogočili zanesljivo kvantifikacijo bakterije *P. larvae* v čebeljih vzorcih, zlasti v primerih, ko je potrebna natančna kvantifikacija povzročitelja ali analiza velikega števila vzorcev (npr. monitoring povzročitelja). Gojiščna preiskava ostaja nepogrešljiva takrat, ko je potrebna izolacija *P. larvae* v čisti kulturi, tj. za vse tipizacijske metode, kot so ERIC-PCR, MLST in WGS.

Ugotovili smo nizek faktor kalitve spor (manj kot 1 %), ki je med vzorci tudi močno variiral. S tem smo potrdili predhodne ugotovitve, da je števna gojiščna metoda zaradi sporogene narave povzročitelja nezanesljiva (Forsgren in sod., 2008; Beims in sod., 2020b). Ker je kaljenje spor *P. larvae* v laboratorijskih pogojih tako nekonsistentno, ni mogoče določiti faktorja, s katerim bi zaradi slabe kalitve spor lahko pomnožili rezultate številne gojiščne preiskave in s tem pridobili podatek o dejanskem številu spor *P. larvae* na enoto vzorca; v praksi uveljavljen faktor 2000 za vzorce medu se je tekom projekta izkazal kot neuporaben. Metoda qPCR je v vseh primerih pokazala znatno večje število spor *P. larvae* kot števna gojiščna preiskava. Poleg tega je en vzorec medu iz klinično pozitivne družine po gojiščni metodi dal negativen rezultat, medtem ko je metoda qPCR dala pozitiven rezultat, kar kaže na slabšo občutljivost gojiščne preiskave. Na osnovi teh rezultatov in podobnih ugotovitev drugih avtorjev (Crudele in sod., 2020) predlagamo, da bi metoda qPCR morala nadomestiti števno gojiščno preiskavo za namen kvantifikacije spor *P. larvae* v čebeljih vzorcih.

Čeprav smo metodo qPCR umerili z metodo dPCR, smo za preverjanje zanesljivosti umerjanja določeno število vzorcev medu in drobirja kvantificirali tako z umerjeno metodo qPCR kot z umerjevalno metodo dPCR. Obe metodi temeljita na principu reakcije PCR, vendar metoda qPCR brez določanja absolutnega števila tarče v pripravljeni umeritveni krivulji omogoča samo relativno kvantifikacijo, izraženo v številu Cq. Analiza skladnosti je pokazala, da sta metodi zamenljivi, kar kaže na zanesljivost umerjanja metode qPCR. Ker metoda dPCR (zaradi tehnične in analitske zahtevnosti ter visoke cene in majhnega števila vzorcev, ki jih lahko analiziraš v enem dnevu) ni primerna za rutinsko uporabo, verjetno nikoli ne bo izpodrinila metode qPCR, lahko pa služi za njeno umerjanje, ki je zaradi skladnosti principa obeh molekularnih metod trenutno najboljše možno.

ERIC-tipizacija. Ta raziskava predstavlja največjo raziskavo pojavnosti tipov ERIC v svetovnem merilu. Za interpretacijo rezultatov metode smo v okviru projekta uspešno vpeljali kapilarno elektroforezo, ki jo sicer v molekularnem bakteriološkem laboratoriju že rutinsko uporabljamo. Metoda do sedaj še ni bila uporabljena v kombinaciji z ERIC-PCR, saj se je za analizo pridobljenih pomnožkov uporabljala klasična agarozna gelska elektroforeza (Genersch in sod., 2006; Dingman, 2015; Ebeling in sod., 2019; Beims in sod., 2020b). Čeprav gre za eno od najbolj razširjenih metod za tipizacijo bakterije *P. larvae*, je standardizacija omenjene metode težavna (Chulain in sod., 2006; Di Pinto in sod., 2011; Hamdi in sod., 2013). Kapilarna elektroforeza omogoča boljšo primerjavo profilov ERIC znotraj istega laboratorija in med laboratoriji.

Med izolati *P. larvae* iz Slovenije smo ugotovili močno prevlado tipa ERIC II (70,2 % vseh tipiziranih izolatov), neodvisno od tipa vzorcev (zalega ali med), medtem ko za prevladujoč tip v Evropi in v svetovnem merilu velja tip ERIC I (Lončarić in sod., 2009; Bassi in sod., 2015; OIE, 2018), ki je bil pri nas slabše zastopan (29,8 %). Tip ERIC II je bolj virulenten na ravni ličinke in povzroči smrt več ličink že pred zapiranjem satnih celic (Genersch in Otten, 2003; Genersch in sod., 2006). Čebele čistilke odmrlo zalego hitro in učinkovito odstranijo in s tem zmanjšajo količino spor v okuženi čebelji družini, po zaprtju satnih celic pa je njihov čistilni nagon manj učinkovit. Pri širjenju bolezni naj bi bili bolj učinkoviti manj virulentni sevi tipa ERIC I, ki povzročijo, da se zaradi odmiranja ličink po zaprtju celic v panju bolezensko spremeni večje število satnih celic. Pri sevih tipa ERIC II so lahko spremenjene le posamezne celice, ki se ob kliničnem pregledu panja lahko spregledajo. Zdi se, da oba tipa v Sloveniji in v svetu ostajata razširjena zaradi svoje visoke virulence na ravni ličinke (ERIC II; manjše število spremenjenih satnih celic, HGČZ se težje prepozna) ali družine (ERIC I; večje število spremenjenih satnih celic in zato veliko število nastalih spor, HGČZ se lažje prepozna) ter trdovratnosti spor v čebelnjaku.

WGS-tipizacija. Kot prvi smo razvili stabilno shemo wgMLST za tipizacijo bakterije *P. larvae*, kar predstavlja pomemben doprinos za njeno spremljanje tako nacionalno kot globalno; do sedaj pripravljene, vzdrževane in dostopne stabilne sheme cg/wgMLST so na voljo le za omejen nabor patogenov (Maiden in sod., 2013) in še to predvsem za humane patogene (Saltykova in sod., 2018). Implementacija sheme wgMLST v programsko opremo BioNumerics omogoča enostavno obdelavo podatkov WGS tudi za uporabnike brez specialnih bioinformacijskih znanj, saj gre za uporabniku prijazno programsko opremo z grafičnim vmesnikom. Poleg tega oprema omogoča harmonizirano obdelavo podatkov WGS s pristopom wgMLST in enostavno izmenjavo rezultatov analize wgMLST med laboratoriji; uporaba programskega paketa BioNumerics je med državami splošno razširjena, saj jo je mnogo laboratorijev do nedavnega uporabljalo za analize, primerjave in izmenjave podatkov

pridobljenih s tipizacijo PFGE. V tej raziskavi smo z metodo WGS tipizirali 202 izolata *P. larvae*, s čimer smo pomembno razširili zbirko prosto dostopnih genomov *P. larvae*, ki predstavlja pomemben temelj za raziskovalce, ki se ukvarjajo z bakterijo *P. larvae*. Pridobljeni genomi namreč predstavljajo osnovo za genomske raziskave, kot so analiza prisotnosti/odsotnosti determinant virulence in odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam ter njihove ohranjenosti znotraj različnih genotipov *P. larvae* ter iskanje novih kandidatnih determinant virulence. Odkritje novih profilov tipa ERIC I ('Ia' in 'Ib') ter sekvenčnega tipa ST30 kaže, da genomska raznolikost *P. larvae* ostaja še precej neraziskana.

Z analizo wgMLST smo opisali globalno populacijsko strukturo bakterije *P. larvae* na nacionalni in svetovni ravni in potrdili, da je tip ERIC I bolj genetsko raznolik kot tip ERIC II (Morrissey in sod., 2015). Posebnega filogenetskega razvrščanja izolatov glede na državo izvora nismo ugotovili, kar je v skladu s predhodnimi ugotovitvami (Morrissey in sod., 2015). Potrdili smo, da se tipa ERIC III in IV filogenetsko ne ločita zanesljivo, saj oblikujeta skupen klad na filogenetskem drevesu wgMLST. Nedavno opisani tip ERIC V (Beims in sod., 2020b) je tvoril jasno ločeno skupino na filogenetskem drevesu wgMLST, kar na ravni celotnega genoma potrjuje, da gre res za nov genotip *P. larvae*. Presenetljivo je, da smo na osnovi filogenetskega drevesa wgMLST ugotovili tudi domnevni novi tip ERIC, v katerega sta se uvrščala dva genoma iz prosto dostopne zbirke genomov *P. larvae*. Njun genotip in virulenca ostajata nejasna, zato so potrebne dodatne raziskave.

Uporabnost sheme za preiskave izbruhov in ugotavljanje poti širjenja HGČZ smo pokazali na primeru preiskave izbruha bolezni v Sloveniji. Znan je le en opis uporabe metode WGS za opredelitev izbruhov HGČZ (Ågren in sod., 2017; uporabili so nestabilno oz. *ad hoc* shemo cgMLST, ki je odvisna od nabora primerjanih izolatov in ne omogoča rutinske uporabe), ki smo ga ponovno analizirali tudi v tem delu in potrdili uporabnost izdelane sheme wgMLST. Ugotovili smo, da se izolati, ki so klonalni (genetsko povezani) in epizootiološko povezani, razlikujejo v največ 35 alelih wgMLST na minimalnem vpetem drevesu (MST). Z uporabo meje 35 alelov smo uspešno opredelili tako predhodno opisane izbruhe HGČZ na Švedskem (Ågren et al., 2017) kot tudi izbruh bolezni v Sloveniji (ta projekt). Predlagana meja za opredelitev klonalno povezanih izolatov *P. larvae* je velikega pomena za razumevanje genetike in evolucije omenjene bakterije ter za prihodnje epidemiološke preiskave HGČZ. Na primeru preiskovanih izbruhov smo pokazali prednosti metode wgMLST v primerjavi z metodama MLST in ERIC, ki nimata zadostne moči razlikovanja za opredelitev klonalnih izolatov. Ugotovili smo tudi več prenosov klona *P. larvae*, ki ga nismo mogli pojasniti s preletno razdaljo čebel (aktivnostjo čebel), temveč s človeško aktivnostjo (premik čebel na skupno pašo, skupni oskrbovalec čebelnjakov ali čebelarstva oprema in izmenjava čebeljih družin). To kaže, da izčrpni epidemiološki podatki ostajajo ključni za dokončno potrditev izbruhov in da je upoštevanje dobre čebelarstva prakse ključno pri omejevanju HGČZ.

V okviru projekta smo preučili tudi genetsko raznolikost bakterije *P. larvae* znotraj izbranega čebelarstva s tremi HGČZ-pozitivnimi čebelnjaki. Da bi opredelili to raznolikost ter tudi pristranskost zaradi izbire ene od vseh zraslih kolonij *P. larvae* za nadaljnjo tipizacijo, smo pri vzorcih medu iz izbranega čebelarstva izbrali po pet kolonij, od katerih smo vse ERIC-tipizirali, večje število pa tipizirali z metodo WGS. Ugotovili smo, da so vsi izolati iz medu in zalege pripadali enakemu tipu (ERIC II-ST11), analiza wgMLST pa prav tako ni pokazala posebnega razvrščanja glede na tip vzorca ali čebelnjak ter največjo genetsko razdaljo 22 alelnih razlik. To kaže na znatno genetsko raznolikost med izolati *P. larvae* iz istega čebelarstva, ki jo moramo upoštevati pri opredelitvi klonalnih odnosov med

izolati (preiskave izbruhov in ugotavljanje poti širjenja) in izboru števila kolonij za tipizacijo. V primerih, ko je opredelitev klonalnih odnosov težavna, nam lahko pri tem pomagajo (i) tipizacija večjega števila izolatov iz danega okolja (npr. čebelarstva), (ii) izčrpni epizootiološki podatki in (iii) izdelava statistično podprtega filogenetskega drevesa, ki temelji na pristopu SNP.

Pri ugotavljanju sorodnosti izolatov *P. larvae* glede na njihovo časovno in geografsko pojavljanje v Sloveniji smo ugotovili, da je največja razdalja med blizu lociranimi čebelnjaki, okuženimi z istim klonom *P. larvae*, približno 2,6 km. Skupno je bilo 9/16 klonov geografsko omejenih na isti kužni krog, 7/16 klonov pa se je hkrati pojavljalo tudi v geografsko oddaljenih regijah. Od tega smo v štirih primerih klon ugotovili v povezavi s klinično potrjeno boleznijo (tj. v zalegi). Iz rezultatov lahko sklepamo, da je 3-km kužni krog dovolj velik, če v ozir vzamemo naraven prenos HGČZ z aktivnostjo čebel, v približno polovici (7/16) primerov pa smo ugotovili prenos oz. prisotnost klona, ki je nismo mogli pojasniti s preletno razdaljo čebel, saj je bila oddaljenost prevelika. V teh primerih lahko upravičeno sklepamo na prenos med kužnimi krogi zaradi človeških aktivnosti, kot so nakup in prodaja čebel, premik čebel na skupno pašo ali isti oskrbovalec čebel. Ker smo v petih primerih znotraj povezanih 3-km kužnih krogov ugotovili prisotnost več kot enega klona *P. larvae*, to po drugi strani lahko kaže na pojavljanje mešanih (multiklonalnih) izbruhov HGČZ ali pa na prekrivanje izbruhov. Ostaja vprašanje, če bi brez tega, da se določen čebelnjak zaradi lokacije pojavi v novo odprtem kužnem krogu in je zanj določen obvezen klinični pregled, pojav HGČZ (in morda prisotnost nesorodnega klona *P. larvae* na tem območju) v tem čebelnjaku sploh odkrili; pomisliti je potrebno tudi na prikrite, neprepoznane ali neprijavljene primere HGČZ v določenih čebelnjakih. Vsi omenjeni rezultati, ki jih podpirajo tudi rezultati anketnih vprašalnikov, kažejo na velik pomen sledenja dobri čebelarški praksi, ki vključuje redno pregledovanje čebeljih družin, menjavo starega satja, izobraževanje o čebeljih boleznih ter zaupljiv odnos do pristojnega strokovnjaka za ZVČ, poleg tega pa obvezno prijavo vseh premikov čebel, tudi ob prodaji in nakupu čebeljih družin, ki jih mora čebelar predhodno natančno pregledati na prisotnost morebitnih bolezenskih sprememb, ter dosledno upoštevanje veterinarsko-sanitarnih ukrepov v primeru pojava HGČZ (prijava in uničenje klinično pozitivnih družin in pridruženega satja).

6. ZAKLJUČKI

V okviru projekta smo uspešno vpeljali več diagnostičnih in tipizacijskih metod za bakterijo *P. larvae*. V rutinsko bakteriološko preiskavo bakterije *P. larvae* smo vpeljali masni spektrometer MALDI-TOF, kar je pohitrilo in pocenilo determinacijo omenjene bakterije. Razvili smo test qPCR, ki omogoča zanesljivo kvantifikacijo spor *P. larvae* v vzorcih medu in drobirja. Za tipizacijo bakterije *P. larvae* smo vpeljali metodo ERIC-PCR in za analizo pomnožkov uporabili kapilarno elektroforezo (Qiaxcel). S sekvenciranjem celotnih genomov (WGS) smo tipizirali veliko število izolatov *P. larvae* ($n = 202$) in razvili stabilno shemo wgMLST za omenjeno bakterijo; ta je implementirana v programski opremi BioNumerics ter sedaj omogoča harmonizirano analizo podatkov WGS in izmenjavo rezultatov med laboratoriji. Vpeljava omenjenih metod predstavlja pomemben doprinos k epidemiološkem spremljanju bakterije *P. larvae* v svetovnem merilu. Ob koncu projekta se je pokazalo, da lahko glede obravnavane problematike še veliko doprinesejo prihodnje raziskave, v okviru katerih bi želeli z metodo WGS preučiti še večje število pridobljenih izolatov *P. larvae* za ugotavljanje njihovih genetskih lastnosti (npr. prisotnost zapisov za dejavnike virulence in odpornosti, tudi v odvisnosti od

tipa ali podtipa ERIC) in poti prenosa HGČZ, s tipizacijo ERIC še bolje raziskati pojavljanje morebitnih (pod)tipov ali spremenjenih profilov prog ter kvantifikacijo z metodo qPCR vpeljati še za odrasle čebele in preučiti njihovo napovedno vrednost za pojav HGČZ.

6.1. Posodobitev priporočil za omejitev širjenja hude gnilobe čebelje zalege

Ustreznost 3-km kužnega kroga. Na osnovi rezultatov projekta smo ugotovili, da je zapora premikov čebel, čebelarške opreme in orodja v polmeru 3 km okrog žarišča bolezni (t. i. kužni krog) dovolj obsežna, saj nismo potrdili naravnega prenosa okužbe preko te razdalje. V primeru potrditve zelo sorodnih sevov povzročitelja bolezni na večjih razdaljah, ponekod tudi 20 km in več, je šlo za širjenje bolezni s prevozom – bolnih čebeljih družin, rojev, narejencev in podobno, zaradi nakupa/prodaje ali prevoza na pašo. Ker je bilo potrjenih veliko takih primerov, lahko ugotovimo, da je v Sloveniji pomemben dejavnik širjenja HGČZ prevoz bolnih čebel.

Hkrati smo na posameznih področjih ugotovili dva ali več nesorodnih sevov povzročitelja *P. larvae* v čebelnjakih na razdalji, ki je bistveno manjša od 3 km, torej znotraj posameznega kužnega kroga. V več primerih je bila ta razdalja manjša od 2 km. Ker gre za seve, ki med seboj niso sorodni, v tem primeru ne moremo govoriti o naravnem prenosu povzročitelja med čebelnjaki zaradi aktivnosti čebel. Te okužbe smo odkrili naključno ob kliničnih pregledih čebeljih družin v kužnem krogu, ker genetsko niso povezane s sevom iz prvotno ugotovljenega žarišča bolezni. Iz navedenega lahko sklepamo, da je v čebelarstvih po Sloveniji prisotnih veliko čebelnjakov s prisotno klinično sliko HGČZ, v katerih bolezen ostane prikrita, ker čebelar bodisi ne opazi bolezenskih sprememb bodisi bolezni ne prijavi, v vsakem primeru pa predstavlja nevarnost širjenja okužbe.

Upoštevati moramo, da ne poznamo celotne slike pojavnosti različnih sevov na ozemlju Slovenije. V raziskavi smo namreč v okviru razpoložljivih finančnih sredstev z metodo WGS tipizirali le omejeno število ($n = 202$) izolatov *P. larvae*. Poleg tega na osnovi navedenega v prejšnjem odstavku lahko sklepamo, da je huda gniloba zelo verjetno prisotna tudi v nekaterih čebelnjakih, kjer iz različnih razlogov (še) ni bila ugotovljena. Zato na osnovi rezultatov projekta in omenjenih dejstev priporočamo uvedbo monitoringa, s katerim bi odkrili in tudi sanirali vsa žarišča bolezni. V primeru uvedbe takega načina ugotavljanja (monitoringa) bolezni po celotni državi kot trajnega ukrepa, bi lahko kužni krog, ki sedaj znaša 3 km, ustrezno zožili, s tem pa zmanjšali ekonomsko škodo v čebelarstvu zaradi zapor premikov čebel.

Priporočila za čebelarje, veterinarje in veterinarske inšpektorje glede ukrepov pri pojavu HGČZ. Na osnovi rezultatov projekta smo potrdili prenos bolezni s prevozom bolnih čebel kot enega od pomembnih dejavnikov širjenja bolezni. Po trenutno veljavnih predpisih za premik čebel na pašo, zaradi prodaje in podobno (Pravilnik o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege; Uradni list RS, št. 10/20 in 61/20), mora čebelar podpisati izjavo, da pri čebelah ni ugotovil sprememb, ki bi lahko pomenile sum na bolezen, nato pa si v avtomatiziranem sistemu sam natisne potrdilo ali pa mu ga izda veterinar za ZVČ, s katerim se potrdi, da čebele ne izvirajo s področja, kjer veljajo omejitve gibanja zaradi HGČZ. Ob tem se ne preverja, ali je čebelar izjavo podpisal na osnovi dejanskega pregleda čebel in če pozna omenjene bolezenske spremembe. Obstaja tudi možnost, da čebelar opažene spremembe zamolči. Na osnovi vseh naštetih ugotovitev lahko podamo mnenje, da bi bilo potrebno spremeniti trenutni sistem izdaje potrdil za premik čebel

in v postopek vključiti vsaj občasne klinične preglede prevoznih čebeljih družin s strani strokovnjaka, tj. veterinarja ZVČ na VF–NVI, ter laboratorijske preiskave vzorcev odvzetih v teh družinah. S tem bi hitreje izločili bolne čebele iz prometa, hkrati pa bi čebelarje motivirali, da si pridobijo ustrezno znanje in sami izvajajo redne preglede svojih čebeljih družin.

Iz rezultatov projekta je razvidno tudi, da pri okužbi ne gre vedno za širjenje povzročitelja bolezni v nekem širšem prostoru, saj smo ugotovili nesorodne seve *P. larvae* na razdaljah, ki so manjše od 2 km. Zato na osnovi omenjenih dejstev priporočamo uvedbo monitoringa, tj. presejalne diagnostične metode, kot je laboratorijska preiskava vzorcev medu, drobirja ali čebel negovalk na prisotnost spor *P. larvae* ter klinični pregled čebeljih družin na osnovi pozitivnih rezultatov laboratorijskih preiskav. S tem bi odkrili in tudi sanirali vsa žarišča bolezni, kjer čebelarji do sedaj bodisi niso opazili bolezenskih sprememb ali pa bolezni niso prijavili. V primeru uvedbe takega načina ugotavljanja (monitoringa) bolezni po celotni državi bi lahko kužni krog zmanjšali.

Na osnovi preiskav vzorcev medu in drobirja smo ugotovili, da so v čebelnjakih, kjer klinična oblika bolezni ni bila ugotovljena, pogosto prisotne spore *P. larvae*, ki predstavljajo grožnjo za klinični izbruh bolezni v prihodnosti. Zato je nujno, da čebelarji v vsakodnevno čebelarsko prakso uvedejo čim več tehnoloških posegov, s katerimi bodo te spore izločali iz panjev, to je predvsem redna menjava satja, pretresanje čebel na nove satnice v primeru večje obremenjenosti s sporami, čiščenje in razkuževanje opreme in orodja ter ostale ukrepe v smislu dobre čebelarske prakse.

Posodobitev sheme za redni monitoring medu. Ker trenutno v Sloveniji nimamo namenskih sredstev za monitoring medu oz. drobirja ali čebel na prisotnost (in število) spor *P. larvae*, lahko veterinarji za ZVČ VF–NVI na osnovi lastne strokovne presoje vsako leto vzorčijo le omejeno število vzorcev medu. Stroški laboratorijske preiskave na spore *P. larvae* v medu se pokrivajo s sredstvi za delovanje NVI, ki pa so strogo omejena. Ker sta prisotnost in povečano število spor v medu, drobirju ali čebelah pokazatelj, da se bodo lahko v preiskovanem čebelnjaku razvili tudi klinični znaki bolezni, bi bilo smiselno takih preiskav izvajati čim več. Zato predlagamo, da se določijo namenska sredstva za tovrstne preiskave, vzpostavi shema vzorčenja in monitoringa ter omogoči veterinarjem VF–NVI vzorčenje vedno, ko je to strokovno indicirano.

7. PRIPOROČILA

Glede na vse rezultate ugotavljamo, da je za uspešno zatiranje bolezni in zmanjšanje števila žarišč bolezni, s tem pa zmanjšanje gospodarske škode zaradi HGČZ, nujno potrebno uvesti stalni **monitoring** na HGČZ na celotnem ozemlju Slovenije. Z uvedbo laboratorijske preiskave čebeljih vzorcev (medu, drobirja ali čebel negovalk) in kliničnega pregleda domnevno pozitivnih čebeljih družin na osnovi rezultata laboratorijske preiskave bi lahko odkrili in sanirali trenutna žarišča bolezni ter s tem njeno pojavljanje zmanjšali na sporadični nivo.

Kot kažejo rezultati projekta, bi bilo potrebno tudi spremeniti način izdaje **dovoljenj** za premike čebel z uvedbo občasnih veterinarskih kliničnih pregledov čebelnjakov, ki se premikajo, in okrepiti uradni nadzor nad premiki v skladu z veljavnim pravilnikom (preverjanje izdaje potrdila za premik ob prodaji, prevozu na pašo in podobno).

Za zmanjšanje pojavnosti in širjenja HGČZ morajo čebelarji slediti načelom **dobre čebelarske prakse**, predvsem v smislu izvajanja tehnoloških ukrepov za izločanje spor *P. larvae* iz panjev (npr. menjava satja, pretresanje čebel na nove satnice, čiščenje in razkuževanje) in preprečevanje širjenja okužbe (higienski ukrepi pri delu v čebelnjaku, pravilno ravnanje z roji, premiki zdravih čebeljih družin, uporaba lastne opreme in orodja).

8. VIRI

- Ågren J, Schäfer MO, Forsgren E (2017) PLoS ONE 12(11): e0187924.
- Alippi AM, López AC, Aguilar OM (2004) Letters of Applied Microbiology 39(1): 25–33.
- Argimón S, Abudahab K, Goater R, Fedosejev A, Bhai J, Glasner C, Feil E, Holden M, Yeats C, Grundmann H, Spratt B, Aanensen D (2016) Microbial Genomics 2(11): 11 pp. doi: 10.1099/mgen.0.000093
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M in sod. (2012) Journal of Computational Biology 19(5): 455–477.
- Bassi S, Formato G, Milito M, Trevisiol K, Salogni C, Carra E (2015) The Veterinary Quarterly 35(1): 27–32.
- Bassi S, Carpana E, Bergomi P, Gallett G (2018) Bulletin of Insectology 71(2): 235–241.
- Beims H, Janke M, von der Ohe W, Steinert M (2020a) Open Veterinary Journal 10(1): 53–58.
- Beims H, Bunk B, Erler S, Mohre KI, Spröer C, Silke, CS, Pradella S, Günther G, Rohde M, von der Ohe W, Steinert M (2020b.) International Journal of Medical Microbiology 310(2): 151394. doi: 10.1016/j.ijmm.2020.151394.
- Berdal KG, Holst-Jensen A (2001). European Food Research and Technology 213: 432–438.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) Clinical Chemistry 55(4): 611–622.
- Chulain MN, Morris D, Cormican M (2006) Clin Infect Dis 42: 1805–1806. doi: <https://doi.org/10.1086/504432>
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM (2013) Clinical Microbiology Reviews 26(3): 547–603.
- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G (2011) FEMS Microbiology Reviews 36(2): 380–407.
- Crudele S, Ricchiuti L, Addolorato R, Rossi F. (2020) Journal of Apicultural Research 59(2): 218–222.
- Cunningham SA, Chia N, Jeraldo PR, Quest DJ, Johnson JA, Boxrud DJ, Taylor AJ, Chen J, Jenkins GD, Drucker TM, Nelson H, Patel R (2017) Journal of Clinical Microbiology 55(6): 1946–1953.
- Dainat B, Grossar D, Ecoffey B, Haldemann C (2018) Journal of Microbiological Methods 146: 61–63.
- Dingman DW (2015) Arch Microbiol 197: 789–795. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1113-4>
- Di Pinto A, Novello L, Terio V, Tantillo G (2011) Curr Microbiol 63: 416–419. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9996-z>
- Ebeling J, Knispel H, Fünfhaus A, Genersch E (2019) Environ Microbiol 21: 3091–3106. doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14709>
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2015) <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/food-and-waterborne-diseases-next-generation-typing-methods.pdf>.
- Forsgren E, Laugen AT (2014) Apidologie 45: 10–20.
- Forsgren E, Stevanovic J, Fries I (2008) Veterinary Microbiology 129: 342–349.

- Gende L**, Satta A, Ligios V, Ruiiu L, Buffa F, Fernandez N, Churio S, Eguaras M, Fiori M, Floris I (2011) *Bulletin of Insectology*, 62(2): 229–233.
- Genersch E** (2010) *Journal of Invertebrate Pathology* 103, Suppl 1: S10–S19.
- Genersch E**, Otten C (2003) *Apidologie* 34(3): 195–206.
- Genersch E**, Ashiralieva A, Fries I (2005) *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 7551–7555.
- Genersch E**, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I (2006) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 501–511.
- Hamdi C**, Essanaa J, Sansonno L, Crotti E, Abdi K, Barbouche N, Balloi A, Gonella E, Alma A, Daffonchio D, Boudabous A, Cherif A (2013) *BioMed Res Int* 2013:479893.
<https://doi.org/10.1155/2013/479893>
- OIE** (World Organisation for Animal Health) (2017)
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_criteria_diseases.pdf.
- OIE** (World Organisation for Animal Health) (2018)
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf
- Jenkins C**, Dallman TJ, Launder N, Willis C, Byrne L, Jorgensen F, Eppinger M, Adak GK, Aird H, Elviss N, Grant KA, Morgan D, McLauchlin J (2015) *Applied and Environmental Microbiology* 81(12): 3946–3952.
- Jolley KA**, Bray JE, Maiden MCJ (2018) *Wellcome Open Research* 3:124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
- Kanagal-Shamanna R** (2016) *Methods Mol Biol* 1392:43–50. doi: 10.1007/978-1-4939-3360-0_5.
- Köser CU**, Holden MTG, Ellington MJ, Cartwright EJP, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, Hsu LY, Chewapreecha C, Croucher NJ, Harris SR, Sanders M, Enright MC, Dougan G, Bentley SD, Parkhill J, Fraser LJ, Betley JR, Schulz-Trieglaff OB, Smith GP, Peacock SJ (2012) *The New England Journal of Medicine* 366(24): 2267–2275.
- Kušar D**, Vrezec A, Ocepek M in Jenčič V (2013) *Diseases of Aquatic Organisms* 103: 157–169.
- Ledina T**, Golob M, Djordjević J, Magas V, Colovic S, Bulajić S (2018) *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, doi: 10.1007/s00003-018-1164-y.
- Letunic I**, Bork P (2019) *Nucleic Acids Research* 47(W1): W256–W259. doi: 10.1093/nar/gkz239.
- Lindström A** (2008) *Microbial Ecology* 56(2): 253–259.
- Loncaric I**, Derakhshifar I, Oberlerchner JT, Köglberger H, Moosbeckhofer R (2009) *J Invertebr Pathol* 100: 44–46. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.09.003>
- Maiden MCJ**, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND (2013) *Nature Reviews Microbiology* 11(10): 728–736.
- Martínez J**, Simon V, Gonzalez B, Conget P (2010) *Letters in Applied Microbiology* 50: 603–610.
- Matsenko NU**, Rijikova VS, Kovalenko SP (2008) *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 145: 240–244.
- Mehle J**, Krt B, Šnajder B (1994) *Slovenski čebelar* 96(3): 77–81.
- Mehle N**, Nikolić P, Gruden K, Ravnihar M, Dermastia M (2012) V: Dickinson M, Hodgetts J (ur.) *Phytoplasma: methods and protocols* (Methods in molecular biology, vol. 938). Humana Press, New York, p 1–13.
- Morrissey BJ**, Helgason T, Poppinga L, Fünfhaus A, Genersch E, Budge GE (2015) *Environmental Microbiology* 17(4): 1414–1424.

- Moura** A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandru A, Criscuolo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse S, Lecuit M (2017) *Emerging Infectious Diseases* 23(9): 1462–1470.
- Nordström** S, Forsgren E, Fries I (2002) *Journal of Apicultural Science* 46(2): 5–12.
- Papić** B, Pate M, Henigman U, Zajc U, Gruntar I, Biasizzo M, Ocepek M, Kušar D (2017) *Front Microbiol* 2(8):331. doi: 10.3389/fmicb.2017.00331.
- Pislak** M (2018) *Slovenski čebelar: glasilo čebelarskih organizacij Slovenije* 120(6): 187–188.
- Poppinga** L, Genersch E (2015) *Current Opinion in Insect Science* 10: 29–36.
- Rauch** S, Ashiralieva A, Hedtke K, Genersch E (2009) *Applied and Environmental Microbiology* 75(10): 3344–3347.
- Rossi** F, Amadoro C, Ruberto A, Ricchiuti L (2018) *Insects* 9(4): 165. doi: 10.3390/insects9040165
- Saltykova** A, Wuyts V, Mattheus W, Bertrand S, Roosens NHC, Marchal K, De Keersmaecker SCJ (2018) *PLoS One* 13(2): e0192504, doi: 10.1371/journal.pone.0192504.
- Schäfer** MO, Genersch E, Fünfhaus A, Poppinga L, Formella N, Bettin B, Karger A (2014) *Veterinary Microbiology* 170(3–4): 291–297.
- Seemann** T (2014) *Bioinformatics* 30(14):2068–2069.
- Singhal** N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS (2015) *Frontiers in Microbiology* 6:791, doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791.
- Vaerman** JL, Saussoy P, Ingargiola I (2004) *J Biol Regul Homeost Agents* 18:212–214.
- Versalovic** J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994) *Methods Mol Cell Biol* 5:25–40.
- Yoon** SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J (2017) *Int J Syst Evol Microbiol* 67(5):1613–1617
- Zdovc** I, Pirš T, Jenko-Rogelj M (2005) *Veterinarske novice* 31(11/12): 317–322.
- Zhou** X, Zhang T, Song D, Huang T, Peng Q, Chen Y, Li A, Zhang F, Wu Q, Ye Y, Tang Y. (2017) *Molecular and Cellular Probes* 33: 36–41
- Žel** J, Milavec M, Morisset D, Plan D, van den Eede G, Gruden K (2012) *How to Reliably test for GMOs*. New York, NY: Springer. doi: 10.1007/978-1-4614-1390-5_1
- Žugelj** A, Lepen M, Golob M, Lešnik V, Jarc M, Zdovc I (2017) Povzetki predavanj strokovnega izpopolnjevanja sekcije veterinarjev v izobraževanju, raziskovanju, diagnostiki in industriji. Veterinarska zbornica Slovenije, Biotehniški izobraževalni center, Ljubljana: 7–8.
- Žugelj** A, Vreček Šulgaj J (2018) *Slovenski čebelar: glasilo čebelarskih organizacij Slovenije* 120(3): 70–71.

9. PRILOGE ELABORATA

Priloga 1. Anketni vprašalnik za čebelarje, uporabljen za vzorčenje v letu 2019.

Priloga 2. Intenziteta kliničnih znakov hude gnilobe čebelje zalege (HGČZ).

Priloga 1

VPRAŠALNIK ZA UGOTAVLJANJE POTI ŠIRJENJA HUDE GNILOBE ČEBELJE ZALEGE

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

Število čebeljih družin na lokaciji: _____

Število lokacij: _____ Skupno število čebeljih družin: _____

Katere vrste panjev uporabljate? _____

2. Koliko let se ukvarjate s čebelarjenjem? _____ let

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

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

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

- | | |
|--|---|
| ☐ Med za lastno uporabo | ☐ Darila |
| ☐ Drugi čebelji proizvodi za lastno uporabo | ☐ Raziskave in izobraževanje |
| ☐ Prodaja medu | ☐ Pomoč čebelam in okolju |
| ☐ Prodaja drugih čebeljih proizvodov | ☐ Vzreja matic |
| ☐ Apiterapija | ☐ Opraševanje |
| ☐ Drugo (prosimo, navedite): _____ | |

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

- ☐ Da
- ☐ Ne

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

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

6.1. Koliko čebeljih družin ste izgubili?

Leto: jesen/zima	Število propadlih čebeljih družin
2016/2017	
2017/2018	
2018/2019	

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

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

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

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

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

	Zelo slabo	Slabo	Srednje	Dobro	Zelo dobro
a. Jakost čebeljih družin (živalnost)	☐	☐	☐	☐	☐
b. Razpoložljivost pašnih virov v okolici čebelnjaka	☐	☐	☐	☐	☐
c. Ustreznost lokacije čebelnjaka (npr. senčna lega, hrup)	☐	☐	☐	☐	☐
d. Gostota stacionarnih ali začasnih čebelnjakov v bližini	☐	☐	☐	☐	☐
e. Sodelovanje s soslednjimi čebelarji	☐	☐	☐	☐	☐
f. Razpoložljivost časa za čebelarjenje	☐	☐	☐	☐	☐

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

	Zelo slabo	Slabo	Srednje	Dobro	Zelo dobro
a. Higiena v čebelnjaku	☐	☐	☐	☐	☐
b. Razkuževanje in čiščenje opreme	☐	☐	☐	☐	☐
c. Označevanje satja v primeru premeščanja satja	☐	☐	☐	☐	☐
d. Preprečevanje dostopa drugim osebam do čebelnjaka	☐	☐	☐	☐	☐
e. Vaše poznavanje vzrokov za širjenje bolezni	☐	☐	☐	☐	☐

11. Kolikšen delež satja povprečno zamenjate na leto? _____%

12. Ali ste v letu 2018 čebele zdravili?

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

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

- | | |
|---|--|
| ☐ Varidol (amitraz) | ☐ Oxuvar (oksalna kislina) |
| ☐ ApiGuard (timol) | ☐ Api-Bioxal (oksalna kislina) |
| ☐ ApiLife Var (timol) | ☐ Varromed (mravljinčna in oksalna kislina) |
| ☐ Thymovar (timol) | ☐ Bayvarol (flumethrin) |
| ☐ CheckMite (kumafofos) | ☐ Polyvar Yellow (flumethrin)Hops |
| ☐ Formivar (mravljinčna kislina) | ☐ Mlečna kislina |
| ☐ MAQS (mravljinčna kislina) | |
| ☐ Drugo (prosimo, navedite): _____ | |

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

- ☐ Sladkorno raztopino
☐ Domače pogače
☐ Komercialne pogače
☐ Med
☐ Invertni sladkor ali sirup
☐ Cvetni prah
☐ Apiherb
☐ BeeStrong
☐ Drugo (prosimo, navedite): _____

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

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

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

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

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

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

14.3. Ali izposojeno ali posojeno opremo očistite?

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

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

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

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

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

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

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

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

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

16.2. Ali ste imeli dokumentacijo urejeno za vse nakupe?

- ☐ Ne
☐ Da

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

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

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

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

17.2. Ali ste imeli dokumentacijo urejeno za vse prodaje?

- ☐ Ne
☐ Da

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

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

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

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

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

- ☐ Ne
☐ Da

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

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

19.1. Kako ravnate z ujetim rojem?

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

19.2. Prosimo, navedite število ujetih rojev.

Leto	Število ujetih rojev
2017	
2018	
2019	

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

20. Kakšna je vaša trenutna zaposlitev?

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

21. Katerega leta ste bili rojeni? _____

22. Katerega spola ste?

- ☐ Moški
- ☐ Ženska

23. Katera je vaša najvišja dosežena stopnja izobrazbe?

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

Najlepša hvala za vaše sodelovanje pri tej pomembni raziskavi.

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

IZPOLNI VETERINAR

1. Ime in priimek veterinarja: _____

2. Na ogledu zaradi:

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

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

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

- ☐ Ukrepal je sam ☐ Poklical je čebelarstvo društvo
☐ Poklical je drugega čebelarja ☐ Poklical je veterinarja
☐ Drugo (prosimo, navedite): _____

5. Ali so v čebelnjaku prisotne druge bolezni čebel?

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

5.1. Katere bolezni oz. problemi so prisotni?

- ☐ Varoza ☐ Spremenjeno obnašanje
☐ Poapnela zalega ☐ Spremembe na nepokriti zalegi
☐ Lakota ☐ Spremembe na pokriti zalegi
☐ Brezmatičnost ☐ Spremembe na odraslih čebelah
☐ drugo (prosimo, navedite): _____

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

	Zelo slabo	Slabo	Srednje	Dobro	Zelo dobro
a. Jakost čebeljih družin (živalnost)	☐	☐	☐	☐	☐
b. Razpoložljivost pašnih virov v okolici čebelnjaka	☐	☐	☐	☐	☐
c. Ustreznost lokacije čebelnjaka (npr. senčna lega, hrup)	☐	☐	☐	☐	☐
d. Higiena v čebelnjaku	☐	☐	☐	☐	☐
e. Izvajanje biovarnostnih ukrepov v čebelnjaku	☐	☐	☐	☐	☐

TABELA O KLINIČNIH ZNAKIH ZA K ZAPISNIKU O ODVZEMU VZORCEV

KLINIČNI ZNAK	Prisoten	Ni prisoten
Večje število mrtvih čebel pred panji	☐	☐
Pred panji čebele lazijo, ne morejo leteti	☐	☐
Temne, svetleče čebele pred panji	☐	☐
Posamezne čebele pred panji drgetajo	☐	☐
Čebelje ličinke in bube pred panji	☐	☐
Pročelje panjev onesnaženo s fecesom	☐	☐
Zalega je neenakomerne starosti	☐	☐
Presledkasta čebelja zalega	☐	☐
Prisotne samo še posamezne celice pokrite zalege	☐	☐
Celični pokrovcu spremenjene barve in/ali vlažnega videza	☐	☐
Posamezni celični pokrovcu vbočeni	☐	☐
Posamezni celični pokrovcu z luknjicami (do 5 na sat)	☐	☐
Večina celičnih pokrovcu naluknjanih	☐	☐
Mrtve ličinke v celicah	☐	☐
Ličinke v celicah imajo spremenjeno lego	☐	☐
Ličinke so spremenjene barve	☐	☐
Zalega ima kiselkast vonj	☐	☐
Vsebina celic vlecljiva – bel odtenek vlecljive mase	☐	☐
Vsebina celic vlecljiva – bel odtenek vlecljive mase	☐	☐
Vsebina celic vlecljiva – svetlo rjav odtenek vlecljive mase	☐	☐
Vsebina celic vlecljiva – temno rjav odtenek vlecljive mase	☐	☐
V celicah je posušena vsebina (krasta, jeziček)	☐	☐
Mrtve ličinke v obliki mešička	☐	☐
Posušena mrtva ličinka v obliki ladjice	☐	☐
Posamezne poapnele ličinke	☐	☐
Več kot 10% poapnelih ličink	☐	☐
Bolezenske spremembe so na svetlem satu/satih*	☐	☐
Bolezenske spremembe so na temnem satu/satih*	☐	☐
Bolezenske spremembe so na svetlih in temnih satih*	☐	☐
Bolezenske spremembe so prisotne na enem satu	☐	☐
Bolezenske spremembe so prisotne na dveh satih	☐	☐
Bolezenske spremembe so prisotne na treh ali več satih	☐	☐
Vidne čebele z deformiranimi krili	☐	☐
Vidna varoja na čebelah	☐	☐
Vidna varoja pod pokrovčki celic	☐	☐
Sati onesnaženi s čebeljimi iztrebki	☐	☐
Jakost čebelje družine ni spremenjena	☐	☐
Čebelja družina je delno oslabela	☐	☐
Čebelja družina je močno oslabela	☐	☐
V panju ni več čebel ali jih je le peščica	☐	☐
Družina je izropana	☐	☐

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

Priloga 2

Intenziteta kliničnih znakov hude gnilobe čebelje zalege (HGČZ), ocenjena ob kliničnem pregledu s strani strokovnjaka za zdravstveno varstvo čebel. Križi (+) so prikazani kot številke: 0, brez kliničnih znakov; +, intenziteta 1; ++, intenziteta 2; +++, intenziteta 3; +++, intenziteta 4

0	Ni kliničnih znakov HGČZ
1	Blago izražena presledkasta čebelja zalega Posamezni celični pokrovci vbočeni, spremenjene barve in/ali vlažnega videza (1–2 spremenjeni celici na satu) Vsebina posameznih celic vlecljiva – mlečne barve do svetlo rjav odtenek vlecljive mase Jakost čebelje družine ni spremenjena Bolezenske spremembe so na enem satu
2	Presledkasta čebelja zalega Zalega na posameznem satu je neenakomerne starosti Celični pokrovci spremenjene barve in/ali vlažnega videza Posamezni celični pokrovci z luknjicami (do 5 na sat) Vsebina celic vlecljiva – svetlo do temno rjav odtenek vlecljive mase Bolezenske spremembe so na do treh satih Čebelja družina je delno oslabela
3	Močno presledkasta čebelja zalega Zalega na satju je neenakomerne starosti Celični pokrovci spremenjene barve in/ali vlažnega videza Celični pokrovci z luknjicami (več kot 5 na sat) Vsebina celic vlecljiva – svetlo do temno rjav odtenek vlecljive mase Bolezenske spremembe so na več kot treh satih Čebelja družina je oslabela
4*	Prisotne samo še posamezne celice pokrite zalege Večina celičnih pokrovcev naluknjanih Vsebina celic vlecljiva – temno rjav odtenek vlecljive mase V celicah je posušena vsebina (krasta, jeziček) Čebelja družina je močno oslabela Družina je izropana, v panju ni več čebel ali jih je le peščica

*Za namen statistične analize smo vzorec z intenziteto klinične slike 4 združili z vzorci intenzitete 3.