

## Američke kuge pčelinjeg legla - epizootiološka situacija i značaj ranog otkrivanja bolesti

Nada Plavša\*, I. Stojanov, Dubravka Milanov, Jelena Petrović  
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

### Kratak sadržaj

Američka kuga pčelinjeg legla je zarazna bolest na listi bolesti obaveznih za prijavu po Programu mera zdravstvene zaštite životinja. Na epizootiološkom području Južnobačkog i Sremskog okruga u periodu od 2002-2007. potvrđena je u 5 opština, na 50 pčelinjih zajednica, odnosno na 19,76% pregledanih uzoraka pčelinjeg legla. Praćeno je utvrđivanje raširenosti američke kuge u zaraženom području na okolne pčelinjake, pri čemu je urađen klinički pregled 613 pčelinjih društava. Iz 82 pčelinja društva uzeti su uzorci meda na analizu prisustva spora *Paenibacillus larvae*. Nije bilo kliničkih znakova bolesti u pregledanim društvima, a spore su utvrđene u 28 društava (34,50%). U istim uzorcima sprovedena su ispitivanja na rezidue antibiotika, a rezultati su pokazali da su bile prisutne u 26 uzoraka (31,70%).

Ključne reči: pčele, američka kuga, spore *Paenibacillus larvae*, rezidue antibiotika

---

\* e-mail: nada@niv.ns.ac.yu

## American foulbrood – epizootological situation and the importance of early detecting

Nada Plavša, I. Stojanov, Dubravka Milanov, Jelena Petrović  
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

### Abstract

American foulbrood is a contagious disease and reports on the cases are obligatory according to the Directive on Animal Health Protective Measures for 2009. On the area of Southern Bačka and Srem district in the period between 2002 and 2007 this diseases was detected in 50 bee colonies in 5 municipalities. The prevalence of American foulbrood in contaminated area was monitored with the intention to detect its spreading. There were 613 colonies clinically examined. In 82 colonies the samples of honey were analyzed on *Paenibacillus larvae* spora. The examined colonies were without clinical signs, but in 28 colonies (34.5%) the spores were detected. In the same samples an examination on residua presence was carried out and it was present in 26 samples (31.70%).

Key words: bees, American foulbrood, *Paenibacillus larvae* spora, antibiotic residua

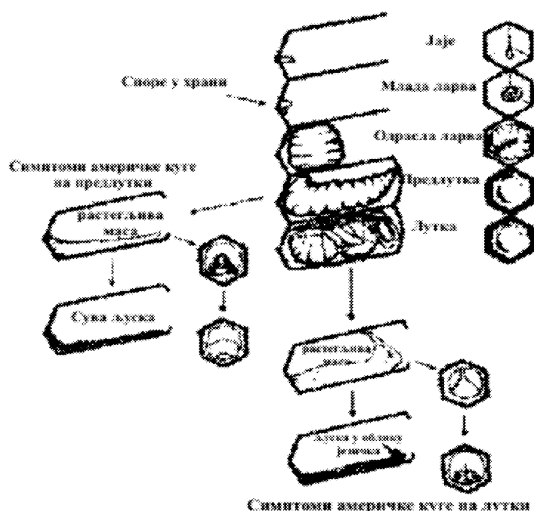
### UVOD

Američke kuge pčelinjeg legla je već duže vremena značajno prisutna u pčelarstvu Srbije. Prava epizootiološka slika je praktično nepoznata, ali je oboljenje prisutno na terenu i ima tendenciju daljeg širenja (Đuričić i sar., 1997; 2001). Ovome, svakako, doprinosi više razloga od kojih su najprisutnija dva: sa jedne strane nedovoljna stručna kontrola pčelinjaka i obavezno sprovođenje zakonskih mera za otkrivanje, suzbijanje i iskorenjivanje bolesti, a sa druge strane nekontrolisani promet pčelinjih proizvoda i meda, nekontrolisana seoba pčelinjih društava na veće pčelinje paše i nekontrolisana upotreba antibiotika (u „preventivne svrhe”). Sama činjenica da se kontrola pojave bolesti bazira na slobodnoj volji pčelara da zarazu prijavi, što se relativno retko dešava, do toga da je rad veterinara i veterinarskih inspektora na ovoj problematici na terenu skoro beznačajan, kao posledicu ima nepovoljnu epizootiološku situaciju.

Pojava američke kuge pčelinjeg legla u Srbiji u poslednjih dvadesetak godina kretala se od 3 do 20% i prema zvaničnim nalazima dijagnostičkih laboratorija u

Republici Srbiji bolest nije poprimila značajne razmere. Međutim, poslednjih godina, prema informacijama od pčelarskih udruženja i pčelara pojedinaca sa terena bolest je značajno prisutna u gotovo svim epizootiološkim područjima Republike Srbije. Uzročnik ove bolesti je bakterija *Paenibacillus larvae larvae* (Heundricks i sar., 1996) koja je u obliku spora izuzetno otporna i u pčelinjim proizvodima i opremi ostaje aktivna 30 i više godina. Američka kuga je prvi put opisana 1906. godine (White, 1906). I ako je bolest prisutna i poznata u pčelarstvu skoro pun vek, ona nije značajnije uticala na pčelinja društva tako da su se održavala i razvijala. Mada oboljenje ima lančasti tip zaraze i maligni tok, razlog njenog slabijeg širenja nalazio se u primitivnom pčelarenju, manjim i ređim seobama i komunikacijama, ali i u jačoj otpornosti pčelinjih društava, koja su živela i održavala se na medu i polenu, a ne zamenama za tu kvalitetnu hranu, što se danas najčešće dešava. Infekcija jednodnevne larve nastaje samo sporama *Paenibacillus larvae larvae*, a za nastanak bolesti potrebno je 8,49 spora po jednoj larvi u starosti do 24 sata. Kliničke promene se uočavaju u roku od 25 dana, dok sa starošću procesa od 60 dana masa uginule larve je na dnu ćelije sasušena i ima izgled „jezička” koji svetluca što je prikazano na šemi 1.

Šema 1. Razvoj legla inficiranog *Paenibacillusom larvae* (Goodwin i Eaton, 2002)



Uzročnik se može naći u dva oblika - vegetativnom, u inficiranoj larvi i sporogenom u uginuloj larvi, medu i drugim sredinama. Novija istraživanja su pokazala da uzročnik američke kuge može biti prisutan u košnici godinu i više dana, a da nema izraženih kliničkih simptoma bolesti (Hansen, 1984a; Hansen, 1984b; Hansen i Rasmussen, 1986; Werner, 2003).

Ritter (2003) na osnovu provedenih istraživanja ukazuje na značaj ranog otkrivanja američke kuge pčelinjeg legla analizom meda i voska na prisustvo spora *Paenibacillus larvae*. Pregled meda kao uzorka hrane na spore *Paenibacillus larvae* je usvojen kao obavezan dijagnostički metod u propisima u Nemačkoj koji se odnose na

infektivna oboljenja pčela. Isti autor iznosi da su na osnovu dobijenih rezultata pčelinja društva podelili u 2 kategorije, jednu sa manje od 5.000 spora/g meda i drugu sa više od 5.000 spora/g meda. U prvoj grupi 2% pčelinjih društava je imalo izražene i kliničke simptome bolesti, dok u drugoj grupi kliničke simptome bolesti (prošarano leglo, nazubljeni, ulegnuti poklopci tamne boje i larva boje čokolade, rastegljive mase) je imalo čak 88% pčelinjih društava.

Redovnim pregledom pčelinjih društava, po Programu mera zdravstvene zaštite životinja i na zahtev veterinarske službe po utvrđivanju zaraze, izvršen je pregled 253 uzorka pčelinjeg legla u periodu od 2002. do septembra 2007. godine.

Naša istraživanja su bazirana na ispitivanju raširenosti spora *Paenibacillus larvae* metodom rane detekcije, u okolini zaraženog pčelinjaka kao i prisustvo rezidua antibiotika u medu koji ne deluju na sporogenu formu uzročnika PLL, a predstavljaju veliku opasnost za ljude.

## MATERIJAL I METOD RADA

Redovnim pregledom po Programu mera zdravstvene zaštite životinja i po ugovornoj saradnji vrši se pregled pčelinjih društava na prisustvo američke kuge.

Ogled je obavljen na prirodno ograničenom lokalitetu, reka Dunav i padina Fruške gore. U pčelinjaku koji je imao 17 košnica američka kuga je utvrđena u 5 društava kliničkim i laboratorijskim pregledom. Svih 5 društava je spaljeno, saće i pčele, a med odstranjen za ljudsku upotrebu. Ostala društva na pčelinjaku su detaljno pregledana, još jedno društvo je spaljeno iako nije pokazivalo klinički znake bolesti, jer je dosta slabo. Od svih društava iz pčelinjaka uzeti su uzorci, isečak saća sa medom, veličine 10x10 cm, za laboratorijsku analizu i utvrđivanje spora *Paenibacillus larvae* u medu Hansenovom metodom.

Ostali pčelinjaci u okolini, ukupno 12, sa 613 pčelinjih društava, su detaljno klinički pregledani, svaki ram sa leglom je detaljno analiziran, i iz svakog pčelinjaka slobodnim izborom je uzeto oko 10% uzoraka saća sa medom za pregled na prisustvo spora *Paenibacillus larvae*. Ukupno su laboratorijski pregledana 82 uzorka meda u saću. Isti uzorci su pregledani i na prisustvo (rezidue) antibiotika.

## Postupak u laboratoriji: Hansenov metod

Podloga (medijum) za ovo ispitivanje sadrži: 20 g agara, 5 g triptona, 15 g ekstrakta kvasca, 3 g  $K_2HPO_4$  i 2 g glukoze po jednom litru demineralizovane vode. Medijum je sterilisan u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta. U petrijevu ploču sipa se 20 ml pripremljenog medijuma u aseptičnim uslovima. Od svakog uzorka meda koji se ispituje uzima se najmanje 5 g u sterilnu staklenu posudu i zagreva u vodenom kupatilu na 88-92°C 5 minuta, a zatim se od ovakvog uzorka vrši zasejavanje na 3 petri ploče sa pripremljenim medijumom, tako što se uzima po 80 mg meda standardnom platinskom ezom i uobičajeno raznese po svakoj ploči. Petri ploče se zatim stavljaju u termostatski na 36°C na inkubaciju u trajanju od 6 do 11 dana. Izrasle kolonije *Paenibacillus larvae* se identifikuju makroskopskim pregledom

(kolonije u vidu tipičnog cvetanja), mikroskopskim ispitivanjem, bojenjem po Gramu i katalaza testom. Uključeni su i dodatni testovi sa indolom, glukozom, arabinozom, ksilozom, manitolom i test rasta na 40°C. Za određivanje stepena kontaminacije meda sporama *Paenibacillua larvae* broje se izrasle kolonije na ploči nakon 5 dana. Svaka kolonija predstavlja 6.000 spora/g meda. Ukoliko ima više od 20 izraslih kolonija one se ne broje, već se procenjuje da je med visoko kontaminiran i da ima više od 120.000 spora u 1 g meda.

## Metoda dokazivanja rezidua antibiotika u medu

Ispitivanje antibiotika u medu vršeno je skrining mikrobiološkom metodom sa pozitivnim test mikroorganizmom *Bacillus subtilis* (BGA) prema Program i metode interlaboratorijske kontrole, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

Uzorak meda koji se ispituje prethodno se inaktivise u vodenom kupatilu na 80°C 10 minuta. Podloga se ohladi na 45°C, na 100 ml podloge doda se 2 kapi kulture *Bacillus subtilis*, stare 24 časa. U petri ploču se razliva po 10 ml podloge da bi debljina podloge bila 2 mm. Kada podloga očvrstne, izbuše se četiri otvora prečnika 10 mm. U otvore se stavi po 100 ml uzorka razblaženog sa puferom pH 6 (med : pufer = 1 : 1,5). Ploče sa uzorkom se stavljaju u frižider na +4 – 5°C dva časa. Iza toga ploče se inkubiraju na 37°C 12 do 18 časova.

### Čitanje rezultata

Ako su u uzorku prisutne antimikrobne aktivne rezidue antibiotika u zoni difuzije ekstrakta meda u podlogu, neće se primetiti rast test mikroorganizma – uočice se zona inhibicije. Širina zone inhibicije se meri od ivice otvora u agaru do granice rasta test mikroorganizma.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Redovnim pregledom po Programu mera zdravstvene zaštite životinja i po ugovornoj saradnji vrši se pregled pčelinjih društava na prisustvo američke kuge što je prikazano u tabeli 1.

Tabela 1. Broj pregledanih i pozitivnih uzoraka američke kuge pčelinjeg legla

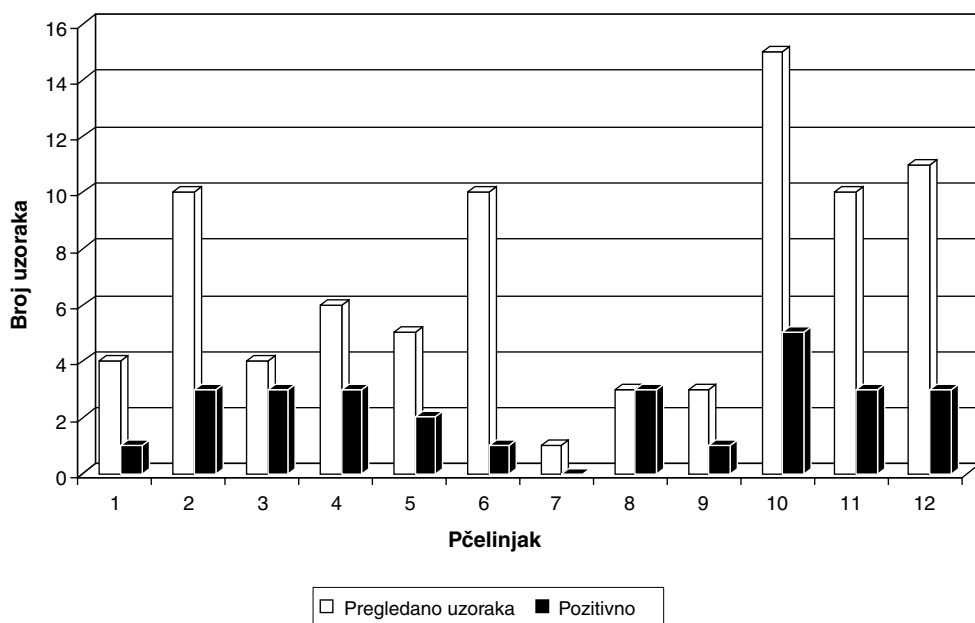
Godina	Broj opština	Broj pregledanih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	%
2002.	5	9	2	22,2
2003.	7	45	0	0
2004.	4	26	1	3,84
2005.	5	64	14	21,8
2006.	9	64	24	37,5
2007.	6	45	9	20,0
UKUPO	36	253	50	19,76

Tabela 2. Raširenost spora *P. larvae*

Pčelinjak br.	Broj košnica u pčelinjaku	Pregledano uzoraka u laboratoriji	Pozitivno na spore <i>P. larvae</i>
1.	41	4	1
2.	107	10	3
3.	27	4	3
4.	47	6	3
5.	48	5	2
6.	45	10	1
7.	27	1	0
8.	29	3	3
9.	17	3	1
10.	105	15	5
11.	109	10	3
12.	11	11	3
?	<b>613</b>	82	28

Iz prikazanih rezultata dobijenih ispitivanjem prisustva *P. larvae* u medu na pčelinjacima u neposrednoj blizini zaraženog društva može se videti da je ovaj metod epizootiološki veoma značajan. Iz tabele 2 se vidi da je izvršen klinički pregled u 613 pčelinjih društava pri čemu je od 82 društva uzet uzorak za laboratorijski pregled na prisustvo spora *P. larvae* i rezidue antibiotika.

### Raširenost spora *P. larvae*



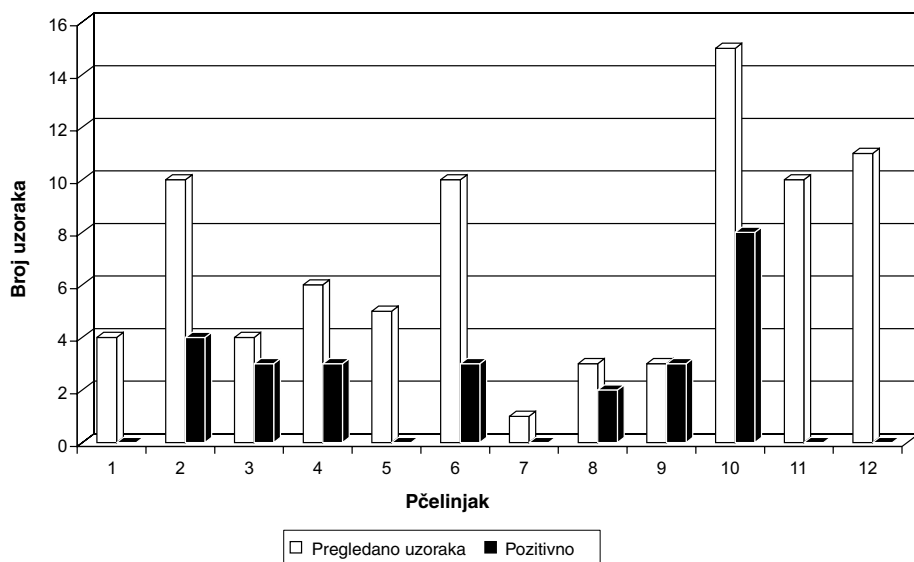
Dobijeni rezultati (tabela 2) ukazuju da su spore nađene u 28 pčelinjih društava (34,15%) i to u 17 uzoraka na ploči su izrasle po 2 kolonije, u 8 uzorka po 3 kolonije, u 2 uzorka po 9 kolonija, a samo u 1 uzorku je bilo 11 izraslih kolonija. Raširenost spora *Paenibacillus larvae* na pčelinjake u neposrednoj blizini zaraženog društva je veoma značajno. Rezidue antibiotika (tabela 3) su utvrđene u 26 uzoraka od ukupno 82 pregledana (odnosno 31,70 %).

Tabela 3. Prisustvo rezidua antibiotika u ispitivanim medovima

Pčelinjak broj	Broj košnica u pčelinjaku	Pregledano uzoraka u laboratoriji	Pozitivno na rezidue antibiotika
1.	41	4	0
2.	107	10	4
3.	27	4	3
4.	47	6	3
5.	48	5	0
6.	45	10	3
7.	27	1	0
8.	29	3	2
9.	17	3	3
10.	105	15	8
11.	109	10	0
12.	11	11	0
?	<b>613</b>	82	26

Hansen i Rasmusen (1986) su ispitivali prisustvo spora u pčelinjaku gde nije bilo znakova američke kuge i od 521 pregledanih uzoraka spore su utvrđene u 47 uzoraka (9,1%), dok je u 11 uzoraka uzetih iz pčelinjaka sa izraženim kliničkim simptomima spora bilo čak u 9 uzoraka (81,8%). U toku ovih istraživanja potvrđena je kontaminacija meda sporama *Paenibacillus larvae* čak 6 godina pre pojave kliničkih znakova bolesti.

## Prisustvo rezidua antibiotika u ispitivanim medovima



Na osnovu značajnih literaturnih podataka, kao i naših istraživanja, vidimo da je problem prisustva spora *Paenibacillus larvae* u pčelinjim društvima veoma značajan. Spore *Paenibacillus larvae* mogu biti prisutne u pčelinjem društvu u velikom broju, čak do 15 miliona, a da klinički znaci bolesti nisu izraženi (Hornitzku i Clark, 1993). Sama klasifikacija pčelinjih društava prema izraslom broju spora na hranljivoj podlozi (cfu) je dosta različita, što znači da još nije precizno utvrđeno koji broj spora i za koji vremenski period sigurno dovodi do pojave američke kuge.

## ZAKLJUČAK

Američka kuga pčelinjeg legla prisutna je u 50 pčelinjih društava, odnosno u 19,76% ispitanih uzoraka, u periodu od 2002. do septembra 2007. godine na epizootiološkom području Južnobačkog i Sremskog okruga.

Na osnovu rezultata rane dijagnostike spora *Paenibacillus larvae* u medu Hansenovom metodom utvrđeno je da je raširenost spora *Paenibacillus larvae* nađena kod 34,50% ispitanih pčelinjih društava, dok su rezidue antibiotika potvrđene kod 31,70% društava. Sve ovo ukazuje da je američka kuga značajno raširena u našoj zemlji, a da se antibiotici vrlo često nekontrolisano koriste u suzbijanju ove bolesti iako se pouzdano zna da antibiotici ne deluju na sporu, a ostavljaju tretirana društva kao trajan izvor zaraze, a ostale veoma poželjne i dragocene pčelinje proizvode čine neupotrebljivim.

Neophodno je prihvatiti činjenicu da redovan pregled i rana dijagnostika bolesti, uz dobru pčelarsku praksu, predstavljaju pravo i trajno rešenje za dobrobit i razvoj pčelarstva u našoj zemlji.



## LITERATURA

1. Đuričić, B., Obrenović S., Milošević, B., Radojčić S.: Upotreba antibiotika u mednim pogačama i njihov uticaj na raširenost američke kuge pčelinjeg legla. U: Radovi III. Savetovanja o lekovima za upotrebu u veterini. Igalo, 47-51, 1997.
2. Đuričić B., Ilić Z., Bošnjak M., Plavša N.: Epizootiološka slika američke kuge pčelinjeg legla sa posebnim osvrtom na moguće greške u terapiji. U: Zbornik plenarnih referata. I Savetovanje o biologiji i zdravstvenoj zaštiti pčela. Beograd, 1-7, 2001.
3. Goodwin, M., Eaton, C. V.: Symptoms of American Foulbrood. A Practical Manual for Beekeepers. Pest management Strategy – Elimination of American Foulbrood Without the use of Drugs. ([www.beekeeping.co.nz/disease](http://www.beekeeping.co.nz/disease)), 2002.
4. Hansen, H.: Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus* larvae in honey. *Dan. J Plant Soil Sci* 88, 325-328, 1984a.
5. Hansen H: The incidence of the foulbrood bacterium *Bacillus* larvae in honeys retailed in Denmark. *Dan J Plant Soil Sci* 88, 329-336, 1984b.
6. Hansen, H. Rasmusen, B: The investigation of honey from bee colonies for *Bacillus* larvae. *Tidsskrift for Planteavl* 90, 81-86, 1986.
7. Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N. A., Ali, N., and Berkelay, R. C.: Reclassification of *Paenibacillus* (former *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984), Ash et al.1994. a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) larvae (White 1906). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, pp. 270-279, 1996.
8. Hornitzky M. A. Z., Clark, N.: Honey bee diseases. In: Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases. Commonwealth Scientific and Industrial Research. Victoria, Australia, 3-7, 1993.
9. Ritter W.: Early detection of American Foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta* 38, 125-130, 2003.
10. Werner von der Ohe: Efficient prophylactic measures against AFB by bacterial analysis of honey for spore contamination. *Am. Bee Journal* 137, (8), 177-191, 1997.
11. White, G. F.: The bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases. United States Department of Agriculture. Bureau of Entomology. Technical Series 14, 1906.

Primljeno: 10.02.2009.  
Odobreno: 03.03.2009.