

Značenje dijagnostičkog pretraživanja zimskih ostataka s podnice košnice za zdravstveno stanje pčelinjih zajednica (*Apis mellifera*)

Zubak-Novak, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:199617>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

KLARA ZUBAK-NOVAK

**Značenje dijagnostičkog pretraživanja zimskih ostataka s podnice košnice za
zdravstveno stanje pčelinjih zajednica (*Apis mellifera*)**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet
Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela

Predstojnik:

prof. dr. sc. Emil Gjurčević

Mentori:

prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

dr. sc. Metka Pislak Ocepek

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Srebrenka Nejedli

2. dr. sc. Metka Pislak Ocepek

3. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

4. doc. dr. sc. Krešimir Matanović (zamjena)

ZAHVALE

Srdačno se zahvaljujem svojim mentoricama, profesorici dr. sc. Ivani Tlak Gajger i asist. dr. sc. Metki Pislak Ocepek na njihovom strpljenju, razumijevanju i svoj pruženoj pomoći oko izrade ovoga rada. Hvala Vam što ste moj završetak studiranja upotpunile ugodnim, lijepim i korisnim iskustvom.

Veliko hvala asist. dr. sc. Metki Pislak Ocepek, Urški Zajc, dr. vet. med., te izv. prof. dr. Ivanu Toplaku i Lauri Šimenc, dr. vet. med. s Veterinarskoga fakulteta Univerze u Ljubljani, koji su me vodili kroz laboratorijski rad i nesebično dijelili svoje znanje.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uz šale i smijeh olakšali svakodnevne borbe na fakultetu. Posebno hvala najboljoj veterinarici Mirni bez koje bi moj život išao u skroz drugom smjeru i mojoj dragoj Ciski koja je bila moj glas razuma kada ga ja nisam imala. Hvala vam na svakom savjetu, razgovoru i smijehu.

Veliko hvala mojem zaručniku Frani koji je završetak mog školovanja učinio ljepšim, bezbolnijim i smislenijim.

Najljepše hvala mojim roditeljima koji su mi bili najveća podrška, i emotivna i financijska kroz dugi period mojega obrazovanja. Hvala mojoj cijeloj obitelji, posebno sestri Ani i mojim nećacima, Jakovu i Juraju, što su mi uljepšali svaki dan, a pogotovo one dane koje sam provodila za stolom uz knjige.

Rad je izrađen na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Institutu za mikrobiologiju i parazitologiju pri Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani.

Popis kratica

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

RNA - ribonukleinska kiselina

VMP – veterinarsko medicinski proizvod

CCD (eng. Colony Collapse Disorder) - poremećaj propadanja pčelinjih zajednica

ELISA (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) – imunoenzimni test

PCR (eng. polymerase chain reaction) – lančana reakcija polimerazom

Popis slika

Slika 1. Grinja *V. destructor* na odrasloj pčeli.

Slika 2. Klinički znakovi karakteristični za invaziju *N. apis* (a) i *N. ceranae* (b).

Slika 3. Mali kornjaš košnice u životnoj fazi ličinke (a) i fazi odrasle jedinice (b).

Slika 4. Uginule pčele pred košnicom kod akutne pčelinje paralize.

Slika 5. Crne ličinke u matičnjaku inficirane virusom crnih matičnjaka.

Slika 6. Klinički znakovi bolesti karakteristični za infekciju virusom izobličenih krila.

Slika 7. Ličinka pčele inficirana virusom mješastog legla.

Slika 8. Klinički znakovi američke gnjiloće medonosne pčele.

Slika 9. Ličinke žute boje kod europske gnjiloće pčelinjeg legla.

Slika 10. Rezultati pretraživanja na prisutnost *P. larvae*.

Slika 11. Rezultati pretraživanja na prisutnost *C. melliferae* i *L. passim*.

Slika 12. Rezultati pretraživanja na prisutnost virusa akutne pčelinje paralize.

Popis tablica

Tablica 1. Prikaz specifičnih oligonukleotidnih početnica korištenih za utvrđivanje *Nosema* spp.

Tablica 2. Prikaz specifičnih oligonukleotidnih početnica za utvrđivanje *C. melliferae* i *L. passim* s Hymenoptera genom kao internom kontrolom.

Tablica 3. Prikaz TaqMan sonda za dijagnostiku *C. melliferae* i *L. passim* uz Hymenoptera gen kao internom kontrolom.

Tablica 4. Prikaz specifičnih oligonukleotidnih početnica za utvrđivanje *M. plutonius* i *P. larvae*.

Tablica 5. Prikaz korištenih TaqMan sonde za utvrđivanje *M. plutonius* i *P. larvae*.

Tablica 6. Prikaz specifičnih oligonukleotidnih početnica za utvrđivanje *A. tumida*.

Tablica 7. Prikaz korištenih TaqMan sonde za utvrđivanje *A. tumida*.

Tablica 8. Sekvence početnica korištene za RT-qPCR test.

Tablica 9. TaqMan sonde korištene za RT-qPCR test.

Tablica 10. Standardi korišteni za kvantifikaciju četiri pčelinjih virusa putem RT-qPCR testa.

Tablica 11. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P1.

Tablica 12. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P2.

Tablica 13. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P3.

Tablica 14. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P4.

Tablica 15. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P5.

Tablica 16. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P6.

Popis grafikona

Grafikon 1. Rezultati pretraživanja na prisutnost virusnih uzročnika bolesti.

Grafikon 2. Rezultati pretraživanja na virusne uzročnike bolesti po pojedinom pčelinjaku.

Grafikon 3. Prikaz utvrđenih uzročnika bolesti u svim pretraženim uzorcima ostataka s podnice košnice.

Grafikon 4. Udio grinja *V. destructor* u jednom gramu uzoraka ostataka s podnice košnica, uzetih zimi na svim pčelinjacima.

Grafikon 5. Broj grinja *V. destructor* u svakoj košnici izbrojanih iz uzoraka ostataka s podnica košnica prikupljenih u zimu i u proljeće.

SADRŽAJ

1. UVOD

2. PODACI IZ LITERATURE

2.1. Uzorci gubitka u pčelarstvu

2.2. Bolesti zajednica medonosne pčele

2.2.1. Nametničke bolesti medonosne pčele

2.2.1.1. Varooza

2.2.1.2. Nozemoza

2.2.1.3. Etinioza

2.2.1.4. Tripanosomijaze

2.2.2. Virusne bolesti medonosne pčele

2.2.2.1. Akutna pčelinja paraliza

2.2.2.2. Virus crnih matičnjaka

2.2.2.3. Virus izobličenih krila

2.2.2.4. Virus mješastog legla

2.2.3. Bakterijske bolesti medonosne pčele

2.2.3.1. Američka gnjiloća pčelinjeg legla

2.2.3.2. Europska gnjiloća pčelinjeg legla

2.3. Dijagnostički postupci za utvrđivanje prisutnosti uzročnika bolesti medonosne pčele

2.3.1. Općenito o metodama dijagnostike

2.3.1.1. Klinički pregled pčelinjih zajednica

2.3.1.2. Mikroskopska metoda dijagnostike

2.3.1.3. Metoda uzgoja na selektivnim hranjivim podlogama

2.3.1.4. Molekularne metode dijagnostike

2.3.2. Dijagnostički postupci za pojedine nametnike i patogene mikroorganizme

2.3.2.1. Utvrđivanje prisutnosti *V. destructor*

2.3.2.2. Utvrđivanje prisutnosti *Nosema* spp.

2.3.2.3. Utvrđivanje prisutnosti malog kornjaša košnice

2.3.2.4. Utvrđivanje prisutnosti tripanosomijaza

2.3.2.5. Utvrđivanje prisutnosti virusnih uzročnika bolesti

2.3.2.6. Utvrđivanje prisutnosti bakterijskih uzročnika bolesti

2.4. Monitoring bolesti pčela primjenom rane dijagnostike

2.5. Uzorci zimskih ostataka s podnice košnica

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pčelinjaci

3.2. Uzorkovanje i pohrana uzorka

3.3. Priprema uzoraka za DNA ekstrakciju

3.4. Izdvajanje DNA

3.5. Ispitivanje uzoraka primjenom molekularne metode PCR/qPCR

3.5.1. Identifikacija *Nosema* spp. vrste pomoću PCR testa

3.5.2. Trostruki TaqMan real-time PCR za utvrđivanje *C. mellificae* i *L. passim*

3.5.3. Dvostruki real-time PCR za utvrđivanje *M. plutonius* i *P. larvae*

3.5.4. TaqMan real-time PCR za utvrđivanje *Aethina tumida*

3.6. Priprema uzoraka za RNA ekstrakciju

3.7. Izdvajanje RNA

3.8. Ispitivanje uzoraka primjenom molekularne metode real-time RT-PCR (RT-qPCR)

3.9. Utvrđivanje prisutnosti i kvantifikacija grinja *V. destructor*

3.10. Klinički pregled pčelinjih zajednica u proljeće i utvrđivanje prirodnog pada *V. destructor*

4. REZULTATI

6. RASPRAVA

7. ZAKLJUČCI

8. POPIS LITERATURE

9. SAŽETAK

10. SUMMARY

11. ŽIVOTOPIS

1. UVOD

Medonosne pčele, solitarne pčele, bumbari i mnogi drugi kukci oprašivači djeluju kao biosenzori zdravlja prirodnih ekosustava. Oprašivanjem cvjetova povrća, voća, orašastih plodova i slobodno živućih biljaka osiguravaju hranjive tvari za prehranu ljudi i životinja (KANE i FAUX, 2021.). Iako postoji više vrsta kukaca oprašivača, najznačajnija je europska medonosna pčela (*Apis mellifera*) koja može činiti i do 80 % cjelokupne populacije oprašivača (ROBINSON i sur., 1989.), što ovisi o broju pčelinjih zajednica na nekom području. Osim što igraju ključnu ulogu u održavanju bioraznolikosti, oprašivanje pčelama je važno za proizvodnju kvalitetnih plodova ljepšeg izgleda, veće mase i dužeg roka trajanja što rezultira i povećanom tržišnom vrijednosti (KLATT i sur., 2014.). Shodno tome, procjenjuje se da je ekonomska vrijednost oprašivanja pčelama nekoliko desetaka puta veća od vrijednosti pčelinjih proizvoda. Budući da trećina ljudske prehrane, izravno ili neizravno ovisi o njihovom oprašivanju, zdravlje pčela i drugih kukaca oprašivača ključno je za opskrbu hranom (VAN ENGELSDORP i sur., 2008.).

Iako su se neobjašnjivo veliki gubici pčelinjih zajednica javljali tijekom povijesti u pojedinim zemljama (VAN ENGELSDORP i sur., 2007.), od zime 2006./2007. godinu, diljem SAD-a i Europe zabilježeno je značajno povećano izvještavanje o uginuću pčelinjih zajednica (VAN ENGELSDORP i sur., 2007., 2008.), od kada pčelari svake zime bilježe i do 30% gubitaka (VAN ENGELSDORP i MEIXNER, 2010.). U Republici Hrvatskoj (RH), uobičajenih 10% zimskih gubitaka pčelinjih zajednica, poraslo je 2007./2008. godinu na 41,71% u panonskoj regiji, 37,46% u mediteranskoj regiji i 32,71% u gorskoj regiji (SVEČNJAK i sur., 2008.).

Takva zabrinjavajuća činjenica povećala je interes znanstvene zajednice i šire javnosti. Međutim, dugogodišnja intenzivna istraživanja nisu otkrila specifični uzrok propadanja pčelinjih zajednica, zbog čega se smatra da je on uzrokovan istodobnim djelovanjem više uzročnika bolesti i drugih nepovoljnih okolišnih čimbenika. Negativni čimbenici kao što su gubitak staništa, upotreba pesticida, nametnici i štetnici, zarazne bolesti i klimatske promjene djeluju istovremeno i uzrokuju povećanu prijemljivost pčelinjih zajednica prema bolestima (KANE i FAUX, 2021.). Iako je uzrok različit, ovisno o regiji ili zemljopisnom području, uginule zajednice najčešće su povezane s visokim stupnjem invadiranosti nametnicima

Varroa destructor i *Nosema* spp., u kombinaciji s drugim patogenim mikroorganizmima (PRISCO i sur., 2016.).

Širenje bolesti medonosnih pčela, zbog grabeža ili zalijetanja pčela u tuđe košnice, povećava se ako je velika gustoća zajednica na nekom području. Kod utvrđivanja pojave ekonomski značajne bolesti važno je spriječiti širenje zaraze pri čemu su ušteda vremena i rano uočavanje bolesti sastavni dio ograničavanja prenošenja zaraze na nova područja (BIOVA, 2021.).

Glavna prednost uzoraka ostataka s podnice košnice kao materijala za dijagnostičko pretraživanje je mogućnost njegovog uzorkovanja tijekom zimskih mjeseci, što nam omogućava analizu subkliničkih koncentracija patogenih uzročnika bolesti, odnosno procjenjivanje statusa zdravstvenog stanja pčelinjih zajednica prije pojave kliničkih znakova. Jednostavno i brzo prikupljanje zimskih ostataka s podnica košnica ubrzava rano otkrivanje i pravodobno kontroliranje ili suzbijanje bolesti te smanjuje štetne gospodarske i ekonomske učinke za pčelare. Iz toga razloga je rana dijagnostika subkliničkih koncentracija patogenih uzročnika bolesti u košnici ili pčelinjaku prioritet za učinkovitu prevenciju bolesti u pčelarskoj praksi (FORSGREN i LAUGEN, 2015.).

Međutim, još uvijek se nedostavno zna o dosljednosti utvrđivanja i kvantifikacije patogenih uzročnika bolesti iz uzoraka ostataka s podnica košnica (FORSGREN i LAUGEN, 2015.).

U tom smislu postavljen je primarni cilj ovoga rada. Na prikupljenim uzorcima zimskih ostataka s podnica košnica sa šest različitih pčelinjaka smještenih u kontinentalnom dijelu RH utvrditi prisustvo ekonomski važnih uzročnika bolesti i procijeniti koliko je uzorak ostataka s podnice košnica relevantan i koliko dobro prikazuje stvarno zdravstveno stanje pčelinjih zajednica u proljeće. Testirali smo pretpostavku da su uzorci zimskih ostataka s podnica košnice prikladni za ranu dijagnostiku različitih patogenih uzročnika bolesti putem lančane reakcije polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR). U proljeće je obavljen klinički pregled pčelinjih zajednica.

2. PODACI IZ LITERATURE

2.1. Uzroci gubitaka u pčelarstvu

Tijekom posljednjih dvadeset godina širom svijeta zabilježen je porast gubitka pčelinjih zajednica. Godine 2006. pojavio se fenomen pod nazivom poremećaj propadanja pčelinjih zajednica (eng. *Colony Collapse Disorder*, CCD) koji označava iznenadi i brzi gubitak zajednica bez jasnog uzroka. CCD je definiran isključivo gubitkom pčelinjih zajednica u kojima nisu prisutne odrasle pčele, dok su pčelinje leglo, matica, te dostatne zalihe meda i peluda prisutni. Uzrok CCD-a do danas nije u potpunosti razjašnjen, a smatra se da pojavu izaziva sinergijsko djelovanje više negativnih čimbenika (SMITH i sur., 2013.).

Negativni čimbenici kao što su pesticidi, nametnici i patogeni uzročnici bolesti, nedostatak kvalitetne hrane u prirodi, nepravilan smještaj pčelinjaka, nepovoljni vremenski uvjeti i loša pčelarska praksa mogu djelovati zasebno ili u kombinaciji.

Osnovu zdravlja pčelinjih zajednica čini kvalitetna prehrana nektarom i peludom. Nektar je izvor ugljikohidrata koji im osigurava energiju, a pelud je izvor proteina koji je nužan za prihranjivanje legla. Visokokvalitetna hrana osigurava im dobar imunološki odgovor, razmnožavanje i preživljavanje zbog čega je dobra prehrana nužan uvjet za veću održivost i otpornost na infekcije patogenim uzročnicima bolesti, te posebice na invazije grinjom *V. destructor* i popratne virusne infekcije. Međutim, današnje velike poljoprivredne površine su pod usjevima monokultura koje pružaju količinski značajne, ali jednolične i vremenski ograničene izvore hrane što negativno utječe na nutritivnu raznolikost, a time i otpornost pčela (HRISTOV i sur., 2020.).

Drugi čimbenik intenzivne poljoprivrede koji negativno utječe na zajednice su izloženost kemijskim pesticidima koji u visokoj dozi mogu uzrokovati naglo uginuće odraslih pčela i legla, ili u niskoj dozi, ali dugotrajnoj izloženosti oštetiti imunosni sustav, sposobnost učenja i pamćenje, što povećava mogućnost da se nikada ne vrate u svoje košnice (HRISTOV i sur., 2020.).

Budući da pčela živi kao socijalna zajednica unutar košnice u kojoj prevladavaju uvjeti visoke temperature i vlažnosti te prisutnosti velikog broja pčela koje su u stalnom međusobnom izravnom kontaktu, njena životna sredina je pogodna za umnažanje niza patogenih uzročnika bolesti i nametnika od bilo kojeg drugog kukca. Različite zarazne bolesti

i nametnici oslabljuju imunitet pojedine pčele kao i zajednice, a zbog oslabljene imunokompetentnosti gube sposobnost suočavanja sa stresom koji se javlja unutar ekosustava košnice (PRISCO i sur., 2016.). Nakon invazije zajednice medonosne pčele s grinjama *V. destructor* i istodobno mikrosporidijom *N. ceranae*, koje su izvorno nametnici azijskih medonosnih pčela, zdravlje zajednica je značajno ugroženo budući da naša europska medonosna pčela ne posjeduje dovoljno dobre obrambene mehanizme protiv spomenutih nametnika. Zbog imunosupresivnog djelovanja nametnika povećava se osjetljivost pčela na druge patogene uzročnike bolesti i sekundarne infekcije (TLAK GAJGER, 2015.).

Ključni čimbenik preživljavanja zajednice je veličina populacije pčela koja ovisi o sposobnosti matice da polaže dovoljno jaja, te duljina života odraslih pčela. Pčele zbog manjka zaliha peluda ili zbog utjecaja određenih patogenih uzročnika bolesti ranije postaju skupljačice i kraće žive zbog čega se jačina zajednice ne povećava. Male pčelinje zajednice podložnije su propadanju zbog gladovanja, utjecaja bolesti i nametnika, te nesposobnosti za uspješno zimovanje (TLAK GAJGER, 2019.).

2.2. Bolesti medonosnih zajednica

2.2.1. Nametničke bolesti medonosne pčele

2.2.1.1. Varooza

Ektoparazit *V. destructor* zasigurno je vodeća prijetnja medonosnoj pčeli još od sedamdesetih godina prošlog stoljeća kada je prenesena s područja na kojem obitavaju azijske vrste pčela (OLDROYD, 1999.). Azijske pčele su tijekom evolucije stekle određene mehanizme obrane od nametnika, dok europska medonosna pčela do sada nije razvila zadovoljavajuće obrambene mehanizme (NOEL, 2020.), zbog čega je ova invazija u posljednjih pedeset godina prouzročila uginuće milijuna zajednica (PRISCO, 2016.). *V. destructor* se brzo proširila i do 2020. godine je ustanovljena u većini zemalja, osim Australije, nekoliko afričkih zemalja i pojedinih otoka (BONCRISTIANI i sur., 2020.).

Nekoliko čimbenika doprinosi negativnom učinku *V. destructor* na populaciju medonosnih pčela. Primarno oštećenje nastaje zbog hranjenja grinje na leglu i odraslim pčelama. Do sada se smatralo da se *V. destructor* hrani samo hemolimfom medonosne pčele, međutim dokazano je da se primarno hrani masno-bjelančevinastim tkivom, odnosno tkivom koje je analogno jetri sisavaca. Shodno tome, parazitizam *V. destructor* povezan je sa oslabljenim razvojem mladih pčela, smanjenom sintezom proteina i lipida, oslabljenom metaboličkom i imunološkom funkcijom, smanjenoj toleranciji na pesticide i smanjenoj dugovječnosti (RAMSEY i sur., 2019).

Nadalje, brojnim istraživanjima je utvrđena važna uloga *V. destructor* i pratećih virusnih patogenih uzročnika bolesti u poremećajima zdravlja pčelinje zajednice. *V. destructor* ima status prijenosnika pet potvrđenih virusa: virusa izobličenih krila (eng. *Deformed Wing Virus*, DWV), Kašmirskog pčelinjeg virusa (eng. *Kashmir Bee Virus*, KBV), virusa mješastog legla (eng. *Sacbrood Virus*, SBV), virusa akutne pčelinje paralize (eng. *Acute Bee Paralysis Virus*, ABPV) i Izraelskog pčelinjeg virusa akutne paralize (eng. *Israeli Acute Paralysis virus*, IAPV) te potencijalno 13 drugih virusa (BOECKING i GENERSCH, 2008.).

Osim što djeluje kao prijenosnik virusa istovremeno povećava i njihovu virulenciju tako da uobičajeno asimptomatska bolest postaje jasna i očita. Iz toga razloga jasno je da

kontroliranje broja *V. destructor* u košnici ima neizravan utjecaj na kontroliranje pojave klinički vidljivih virusnih infekcija (KANE i FAUX, 2021.).

Kada se invadirana pčelinja zajednica ne tretira primjenom veterinarsko medicinskih proizvoda (VMP) i kada je u zajednici prisutno nekoliko tisuća grinja dolazi do vidljivih karakterističnih kliničkih znakova varooze, prvenstveno pojačanog nemira odraslih pčela unutar košnice, smanjenje njihove tjelesne težine i različitih morfoloških malformacija. Zaražene pčele imaju 6,3% do 25% manju tjelesnu težinu od zdravih pčela (DE JONG i sur., 1982 a.), mladi trutovi su nesposobni za parenje, a mlade radilice zbog nedovoljno razvijene mliječne žlijezde prijevremeno postaju skupljačice i kraće žive (AMDAM, 2004.).

Varooza se stoga kontrolira sukladno zakonskim propisima i obavezno je tretiranje pčelinjih zajednica VMP-ima, uz primjenu drugih biološko-tehničkih mjera tijekom cijele godine. Međutim, zbog višekratno rabljenih i nepravilno primijenjenih VMP-a grinja svake godine povećava rezistentnost na primjenjivane akaricide što znači da i najbolje metode uklanjanja ovih štetnika možda neće biti učinkovite u budućnosti.



Slika 1. Grinja *V. destructor* na odrasloj pčeli.

(Izvor: <https://news.utexas.edu/2020/01/30/bacteria-engineered-to-protect-bees-from-pests-and-pathogens>).

2.2.1.2. Nozemoza

Nozemoza je najraširenija gljivična nametnička zarazna bolest medonosnih pčela uzrokovana mikrosporidijama iz roda *Nosema*. Bolest se godinama pripisivala invaziji isključivo *N. apis*. Međutim, prenošenjem *N. ceranae* s azijske pčele, prevalentna je i u europskoj medonosnoj pčeli. Budući da se infekcija sa *N. ceranae* razlikuje od *N. apis* u epizootiologiji, patogenezi i kliničkoj slici nazvana je nozemoza tipa C, a povezana je s gubitkom zajednica diljem SAD-a i Europe te predstavlja ozbiljnu prijetnju sektoru pčelarstva (KANE i FAUX, 2021.; TLAK GAJGER, 2019.).

Odrasle pčele se invadiraju oralnim unošenjem spora *Nosema* spp. koje su izrazito otporne u okolišu. Spore se nalaze u onečišćenoj hrani ili vodi, ostacima fecesa ili bolesnih i uginulih pčela iz košnice. *N. ceranae* primarno parazitira u epitelnim stanicama srednjeg crijeva gdje zbog umnažanja velikog broja spora dolazi do porasta osmotskog tlaka, pucanja membrana stanica i njihovog potpunog propadanja. Time uzrokuje poremećaj probavne funkcije i energetski stres koji izaziva glad, povećani apetit, dezorijentiranost i gubitak sposobnosti učenja te, na kraju, uginuća pčela zbog iscrpljenosti (TLAK GAJGER, 2019.).

Usljed atrofije hipofaringealne žlijezde inficirane mlade pčele njegovateljice ne mogu proizvesti matičnu mliječ. Takve pčele preskakajući svoje uloge kućnih pčela prerano postanu pčele skupljačice što u konačnici dovodi do skraćivanja njihovog životnog vijeka. Inficirani trutovi imaju manju tjelesnu masu, smanjenu količinu energije i posljedično smanjenu mogućnost letenja, a inficirane matice zbog smanjene proizvodnje mandibularnog feromona i vitelogenina smanjuju ili potpuno prestaju polagati jajašca (ALAUX i sur., 2011.).

Karakteristični znakovi bolesti uzrokovane *N. apis* kao što su proljev ili puzanje i drhtanje pčela nisu prisutni kod invazija uzrokovanih *N. ceranae*. Nozemoza tipa C najčešće prolazi asimptomatski i često se naziva *tihim ubojicom* pčelinjih zajednica. Kroničnog je tijeka karakterizirana naglim slabljenjem pčelinje zajednice u vidu naglog smanjenja broja odraslih pčela (TLAK GAJGER, 2019.). Jako invadirane pčelinje zajednice teško prezimljavaju i ne troše pohranjene zalihe hrane zbog čega često dolazi do velikog broja uginulih pčela na podnici košnice u proljeće (MICHALCZYK i sur., 2011.).

Također, zbog mehaničkih oštećenja srednjeg crijeva i imunoloških zapreka uzrokuje i povećanu osjetljivosti pčela na virusne patogene uzročnike bolesti. Prema istraživanju COSTA i suradnika (2011.) ustanovljena je interakcija između *N. ceranae* i virusa izobličanih

krila što je rezultiralo pojavi složenije bolesti i smanjenoj vitalnosti zajednica. Između ostalog, interakcija između *Nosema* spp. i neonikotinoidnih pesticida dokazano povećava ugibanje pčelinjih zajednica (ALAUX i sur., 2010.).



Slika 2. Klinički znakovi karakteristični za invaziju *N. apis* (a) i *N. ceranae* (b).

(Izvor: <https://rugbybeekeepers.org/cms/index.php/about-us/events/298-bee-health-day-2019>).

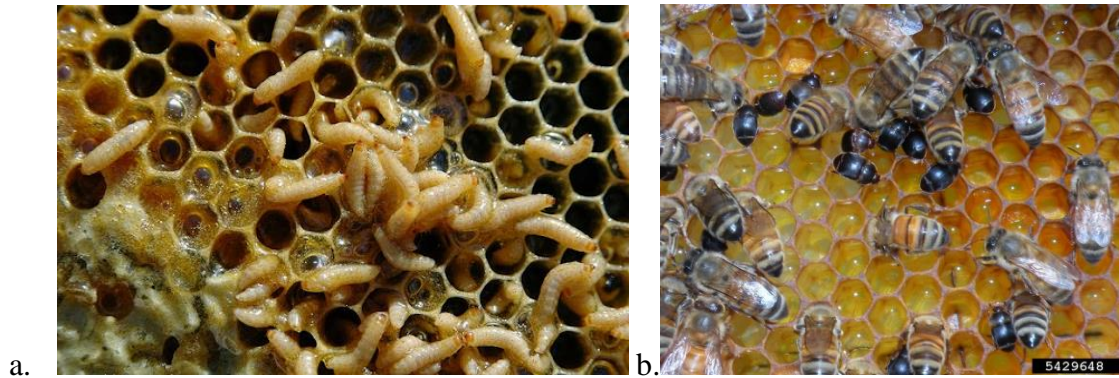
2.2.1.3 Etinioza

Mali kornjaš košnice (*Aethina tumida*) opasan je štetnik pčelinjih zajednica koji se iz afričkih zemalja trgovinom i transportom zaraženih pčelinjih zajednica proširio u SAD, Kanadu, Australiju, Egipat, Koreju, Filipine i Europu (OIE, 2019; NEUMANN i sur., 2013.). Za afričke pčele ovaj štetnik ne predstavlja veliku opasnost budući da su one razvile korisne mehanizme obrane, međutim zamjena nositelja ovog kornjaša na europske vrste pčela čini velike ekonomski značajne štete. Europska medonosna pčela je puno osjetljivija i trpi znatno veće štete zbog čega je zakonskim propisima određeno obavezno prijavljivanje sumnje na bolest i poštivanje strogih uvjeta za uvoz paketnih rojeva ili pčelinjih zajednica iz trećih zemalja (ANONYMOUS, 2021.).

Malog kornjaša u košnicu privlači miris saća, svježe skupljenog i pohranjenog peluda, nezrelog meda i propolisa. Ženka polaže jaja izravno na saće ili buši rupe nad poklopljenim leglom kako bi položila svoja jaja na pčelinje kukuljice. Iako zbog visoke invazije odraslim primjercima malog kornjaša košnice pčelinja zajednica može pobjeći iz zaražene košnice (ELLIS i sur., 2003.), ličinke malog kornjaša košnice najrazornija su životna faza za zajednicu medonosne pčele. One buše tunele i stvaraju labirinte kroz saće, a hrane se medom, peludom

ili pčelinjim leglom. Zbog izlučivanja ekskremenata malog kornjaša košnice, med fermentira što ga čini higijenski neispravnim proizvodom za konzumaciju (KANE i FAUX, 2021.).

Mali kornjaš košnice može biti prijenosnik za druge patogene uzročnike bolesti kao što je bakterija *Paenibacillus larvae* (SCHAFER i sur., 2010.).



Slika 3. Mali kornjaš košnice u životnoj fazi ličinke (a) i fazi odrasle jedinke (b).

(Izvor:http://windowbee.com/aethinatumida_en/; www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5429648).

2.2.1.4. Tripanosomijaze

Tripanosomi su crijevni protozoarni nametnici koji pripadaju porodici Trypanosomatidae. Iako je utvrđeno više vrsta tripanosoma, primarni uzročnici koji su povezani s velikim zimskim gubicima zajednica su *Crithidia mellificae* i *Lotmaria passim* (WILLIAMS i sur., 2019.). Premda je *C. mellificae* više puta izolirana tijekom šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog stoljeća, tek pretraživanjem molekularnim metodama 2015. godine otkrivena je nova vrsta, *L. passim* koja je trenutno predominantni tripanosomatid medonosne pčele (SCHWARZ i sur., 2015.).

Infekcija *C. mellificae* mijenja sastav mikrobioma crijeva pčele te utječe na promjene u ponašanju i imunosnom odgovoru. Iako je široko rasprostranjena *L. passim* do danas je slabo proučavana i točna patogeneza bolesti nije u potpunosti razjašnjena. Poznato je da, poput *C. mellificae*, ima pozitivnu korelaciju sa stupnjem infekcije *N. ceranae* što može značajno utjecati na lokalnu i sustavnu imunološku funkciju unutar pčela (SCHWARZ i EVANS, 2013.). U Srbiji, koinfekcije *L. passim* i *N. ceranae* dokazane su u 60,5 % ispitanih slučajeva (STEVANOVIĆ i sur., 2016.). *L. passim* za razliku od *N. ceranae* koja kolonizira

srednje crijevo, više preferira tkivo rektuma (SCHWARZ i sur., 2015.), što može ukazivati na određenu sinergiju između nametnika (ALIZON i LION, 2011.).

2.2.2. Virusne bolesti medonosne pčele

Virusne bolesti pčelinjih zajednica stvaraju sve veću brigu za znanstvenike i pčelare budući da čine najveću skupinu patogenih uzročnika bolesti pčela s do sada utvrđenih i identificiranih više od trideset vrsta (KANE i FAUX, 2021.). Iako se virusne infekcije često manifestiraju u subkliničkom obliku, određeni virusi ovisno o jačini invazije grinjom *V. destructor*, koinfekcijama s drugim bakterijskim mikroorganizmima te ovisno o okolišnim prilikama (pesticidi, nedovoljna količina peluda i nektara u prirodi, hladnoća i vlaga) sposobni su uzrokovati ozbiljne i letalne posljedice u pojedinačnih pčela ili cijeloj pčelinjoj zajednici (TANTILLO i sur., 2015.; BEAUREPAIRE i sur., 2020.; ŠIMENC i sur., 2020.).

Četiri najpatogenija i najučestalija utvrđivana RNA virusa medonosne pčele su virus mješinstog legla i virus izobličenih krila koji pripadaju rodu *Iflavirus* (porodica *Iflaviridae*) te virus crnih matičnjaka i virus akutne pčelinje paralize koji su klasificirani u rod *Cripavirus* (*Dicistroviridae*). Ovi virusi mogu inficirati sve stadije pčelinjeg razvoja, ličinku, kukuljicu i odrasle pčele.

2.2.2.1. Akutna pčelinja paraliza

Akutna pčelinja paraliza jedna je od najčešćih virusnih bolesti pčela u Europi i svijetu. Uobičajeno je prisutna u niskom titru bez očitih kliničkih znakova, ali u stresnim okolišnim uvjetima, posebice kod jakih invazija nametničkom grinjom *V. destructor* može biti izrazito virulentna (TANTILLO i sur., 2015.). Iako nema dokaza da se virus umnaža unutar grinje *V. destructor*, incidencija klinički vidljivih znakova karakterističnih za infekcije virusom se povećava u kasno ljeto kada je populacija *V. destructor* visoka (KANE i FAUX, 2021.).

Od infekcije do pojave kliničkih znakova potrebno je dva do šest dana. U visoko inficiranim zajednicama može izazvati ugibanje pokrivenog i nepokrivenog legla uzrokujući sličnu kliničku sliku kao i kod američke i europske gnjiloće pčelinjeg legla, što otežava dijagnosticanje bolesti. Kod odraslih pčela uzrokuje paralizu i tremor, nemogućnost letenja i brzo uginuće.



Slika 4. Uginule pčele pred košnicom kod akutne pčelinje paralize (ljubaznošću prof. Nowotny, N.; 2010.).

2.2.2.2. Virus crnih matičnjaka

Virus crnih matičnjaka najrašireniji je virus pčelinjih zajednica sa stalnom godišnjom učestalošću u odrasloj populaciji. Najčešći je uzrok uginuća ličinke matice u razvoju, stoga je velika šteta u uzgojima za proizvodnju matica. Stijenke matičnjaka prekrivene su karakterističnim tamnim mrljama, a sama ličinka iz bijele boje prelazi u blijedo žutu te slično kao i kod bolesti mješinastog legla, poprima vrećasti izgled. Iako ne izaziva vidljive simptome kod zaraženih odraslih pčela, virus može ugroziti njihovu orijentaciju zbog čega dolazi do povećanog zalijetanja i širenja bolesti u druge košnice (KANE i FAUX, 2021.).

Incidencija virusa usko je povezana s infekcijom zajednice mikrosporidije *Nosema* spp. Oštećujući srednje crijevo pčela *Nosema* spp. povećava njihovu osjetljivost na viruse i tako smanjuje zimsko preživljavanje. Također, dokazano je da subletalne doze pesticida povećavaju titar virusa, a s time i mortalitet pčela (SPURNY i sur., 2017.).

grinja *V. destructor*, ubikvitaran je i sezonskog karaktera pa je tako najaktivniji od proljeća do jeseni (MARTIN i BRETTELL, 2019.). Zbog svega toga virus izobličjenih krila je globalno proširen virus sa subletalnim i letalnim učinkom na pčele (WILFERT i sur., 2016.).



Slika 6. Klinički znakovi bolesti karakteristični za infekciju virusom izobličjenih krila.

(Izvor: <https://txbeeinspection.tamu.edu/deformed-wing-virus/>).

2.2.2.4. Virus mješastog legla

Virus mješastog legla je prvi opisani virus medonosne pčele, utvrđen 1913. godine u SAD-u (WHITE, 1913.). Gotovo je ubikvitaran i raširen diljem svijeta gdje god postoji pčelarska proizvodnja (ALLEN i BALL, 1996.). Primarno inficira leglo gdje se razmnaža u visokim koncentracijama i uzrokuje morfološke promjene na ličinkama i uginuća, a u odraslim pčelama perzistira kao asimptomatska infekcija koja im značajno skraćuje životni vijek (ŠIMENC i sur., 2020.). Inficirane ličinke nisu sposobne izbaciti sa sebe endokutikulu pa se između tijela ličinki i njihovih neočišćenih kutikula nakuplja tekućina koja sadrži milijune čestica infektivnih virusa. Na taj način ličinka stvara vrećasti oblik karakterističan za ovu bolest. Ličinke prelaze iz bijele u blijedo žutu boju i odmah nakon uginuća se isuše i postaju crne (CHEN i SIEDE, 2007.).

Virus mješastog legla je bolest blage naravi sa sporim širenjem te se ličinke sa vidljivim kliničkim znakovima rijetko uočavaju budući da su odrasle pčele jako učinkovite u prepoznavanju i uklanjanju inficiranih ličinki. Međutim, ovaj oblik čišćenja košnice može biti i primarni oblik prenošenja virusa zbog nakupljanja virusa u glavi i hipofaringealnoj žlijezdi

pčela hraniteljica koje šire zarazu prehranjivanjem zdravih ličinkama (TANTILLO, 2015.; SHEN i sur., 2005).



Slika 7. Ličinka pčele inficirana virusom mješastog legla.
(Izvor: <https://beeaware.org.au/archive-pest/sacbrood/>).

2.2.3. Bakterijske bolesti

Dvije važne bakterijske bolesti pčelinjih zajednica su američka gnjiloća pčelinje zajednice uzrokovana sporogenom bakterijom *P. larvae* i europsku gnjiloću pčelinjeg legla uzrokovanu primarno bakterijom *Melissococcus plutonius*.

2.2.3.1. Američka gnjiloća pčelinjeg legla

Američka gnjiloća je zbog svojeg destruktivnog učinka, rezistencije i globalne distribucije najvažnija i najpatogenija zarazna bolest poklopljenog i nepoklopljenog legla medonosnih pčela, te se shodno tome suzbija sukladno zakonskim propisima (BAKONYI, 2002.). Upotreba antibiotika nije dozvoljena pa se zbog opasnosti širenja bolesti na druge pčelinjake ili divlje kukce oprašivače zaražena zajednica i pripadajuća košnica moraju uništiti.

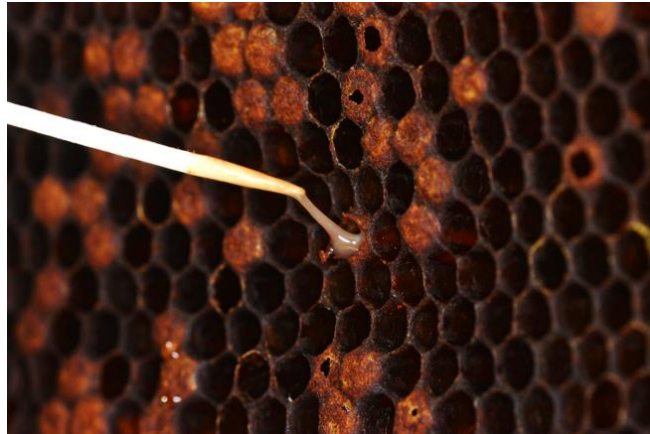
Infekcija je moguća putem spora bakterije *P. larvae* koje godinama preživljavaju u okolišu i koje su izrazito otporne na temperaturne i kemijske tvari. Ličinka se inficira prilikom hranjenja sporama onečišćenom hranom ili od pčele hraniteljice koja na sebi nosi spore koje je prikupila kao čistačica prilikom čišćenja stanica saća s uginulim ličinkama. Dovoljno je manje od deset spora za pokretanje smrtonosne infekcije, a što je ličinka mlađa potrebno je manje spora uzročnika bolesti. Međutim, zbog dobne rezistencije u odraslim pčelama se ne

razvija bolest, iako odrasle pčele djeluju kao prijenosnici infektivnih spora *P. larvae* (KANE i FAUX, 2021.).

Ishod infekcije, odnosno brzina napredovanja bolesti i propadanja pčelinje zajednice ovisi o patogenetskim razlikama različitih genotipova bakterije *P. larvae*. Dosad je utvrđeno pet genotipova *P. larvae*: ERIC I, ERIC II, ERIC III i ERIC IV (GENERSCH i sur., 2005.) te ERIC V (BEIMS i sur., 2020.). Nakon infekcije najmanje virulentnim genotipom, ERIC I, potrebno je oko 12 dana da inficirana ličinka uginu, dok je drugim više virulentnim sojevima, ERIC II – ERIC V, potrebno samo sedam dana. Serotipovi se razlikuju u brzini napredovanja bolesti i stupnju uklanjanja uginulih ličinki, broju proizvedenih spora, brzini širenja unutar pčelinje zajednice i propadanju same pčelinje zajednice (GENERSCH i sur. 2005.).

Vegetativni oblici bakterije umnožavaju se u srednjem crijevu pčelinje ličinke kada dođe do promjene pH u kiseli, odnosno kada se ličinka počinje hraniti mješavinom meda, peluda i vode. *P. larvae* proizvodeći visoko aktivne izvanstanične proteaze prodire u epitel (GENERSCH, 2009.) što joj omogućuje prelazak iz srednjeg crijeva u tjelesnu šupljinu, zbog čega ličinka ugiba u stadiju septikemije (YUE i sur., 2008.). Ličinka se razgrađuje i postaje smečkasta, polutekuća iz koje se oslobađa miris na trulež. Neugodan miris, rastezljiva masa uginule ličinke i udubljeni poklopci na stanicama saća s rupicama nad poklopljenim leglom primarni su klinički znakovi bolesti važni za terensku dijagnostiku bolesti. Starenjem procesa bolesti uginula ličinka se osuši i čvrsto prianja uz donju stijenu stanice saća. Takva osušena ličinka sadrži milijune novostvorenih infektivnih spora *P. larvae* (KANE i FAUX, 2021.).

U posljednjih nekoliko godina sve se više bilježi atipičan oblik bolesti, odnosno kada se promjene mogu vidjeti i na nepoklopljenom pčelinjem leglu. Smatra se da je za to zaslužna grinja *V. destructor* budući da ona prilikom hranjenja na pčelinjoj ličinki izravno ubacuje infektivne spore *P. larvae* uzročnika bolesti u hemolimfu pčelinje ličinke zbog čega dolazi do naglog umnažanja spora i uginuća nosioca. Zbog porasta incidencije bolesti u posljednjih nekoliko godina, preporučuje se provoditi ranu dijagnostiku bolesti kako bi se brzim i stručnim mjerama suzbila pojava i širenje bolesti.



Slika 8. Klinički znakovi američke gnjiloće medonosne pčele.

(Izvor: <https://teca.apps.fao.org/teca/en/technologies/10018>).

2.2.3.2. Europska gnjiloća pčelinjeg legla

Uzročnik europske gnjiloće medonosne pčele je nesporogena bakterija, *M. plutonius*. Primarna infekcija je često praćena sekundarnim koinfekcijama koje mogu, ali i ne moraju voditi pčelinju zajednicu do većeg stupnja ugibanja (LEWKOWSKI i ERLER, 2019.).

Pčelinja zajednica može biti asimptomatski inficirana, dok prisustvo karakterističnih kliničkih znakova znači sto puta veću koncentraciju patogene bakterije. U pčelinjacima gdje postoji vidljiva klinička slika, odrasle pčele u skoro svakoj zajednici nose uzročnika što izrazito utječe na mogućnost prijenosa između zajednica toga pčelinjaka i između više pčelinjaka. Utvrđeno je da u prosjeku 30% pčelinjih zajednica pozitivno na *M. plutonius* na pčelinjacima slobodnih od vidljive bolesti, ali smještenih u blizini pčelinjaka s klinički izraženim simptomima (BELLOY i sur., 2007.).

Određeni stresori kao što su meteorološke prilike, pesticidi i dugotrajniji transport mogu potaknuti razvoj bolesti. Osim toga, uzrok tomu mogu biti i promjene u hranjenju pčelinjih ličinki prilikom velikih količina peluda i nektara. Tada, uz brzi razvoj legla istodobno se smanjuje broj odraslih pčela njegovateljica budući da se one prijevremeno moraju posvetiti pohrani nektara i peluda u stanice saća. Takva promjena uzrokuje stres ličinaka i dovodi do razvoja kliničke slike.

Iako se bakterije mogu pronaći u svim djelovima košnice i u odraslim pčelama, umnažanje bakterije dokazano se javlja samo u srednjem crijevu inficiranih pčelinjih ličinkama (FORSGREN, 2009.). Patogeneza bolesti još uvijek nije u potpunosti jasna, a smatra se da brzo umnažanje bakterije *M. plutonius* u lumenu srednjeg crijeva ličinke njoj uskraćuje iskorištavanje hranjivih tvari. Ishod bolesti je nepredvidljiv. Inficirana pčelinja ličinka stara četiri do pet dana može naglo uginuti kada mijenja svoju fiziološki bijelu boju u žutu do smeđu s različitim stupnjevima razgradnje ili može preživjeti i kao odrasla pčela prenositi infekciju unutar i izvan košnice. Iz toga razloga, infekcije koje uzrokuju veći stupanj ugibanja ličinki mogu se na razini zajednice riješiti brže (KANE i FAUX, 2021.).



Slika 9. Ličinke žute boje kod europske gnjiloće pčelinjeg legla.

(Izvor:<https://txbeeinspection.tamu.edu/european-foulbrood/>).

2.3. Dijagnostički postupci za utvrđivanje prisutnosti uzročnika bolesti medonosne pčele

2.3.1. Općenito o metodama dijagnostike

2.3.1.1. Klinički pregled pčelinjih zajednica

Pčelar koji je posumnjao na bolest čija je prijava regulirana zakonskim propisima obavezan je pozvati ovlaštenog veterinaru da provede klinički pregled pčelinjih zajednica. Prije samog pregleda veterinar mora uzeti anamnezu i razgovarati sa pčelarom o načinima provođenja dobre pčelarske prakse. Klinički pregled pčelinje zajednice obavlja se na sunčani i topli dan, bez vjetera. Prije otvaranja košnice potrebno je provjeriti jačinu zajednice prema aktivnosti odraslih pčela na letu. Ako je aktivnost izražena, zajednica je jaka i vitalna, međutim, ako je aktivnost slabo izražena ukazuje na moguće zdravstvene probleme unutar pčelinje zajednice (TLAK GAJGER, 2020.).

Prilikom otvaranja košnice pregledava se popunjenost ulica odraslim pčelama, što također upućuje na jačinu pčelinje zajednice. Zatim je potrebno pregledati svaki nastavak, odnosno okvir iz košnice. Primarno se pregledava da li su u sredini dna stanice prisutna jaja stara tri dana što nam govori da je matica aktivna i zdrava, a potom se pregledava da li je raspored poklopljenog i nepoklopljenog legla pravilan. Poklopci saća nad zdravim leglom moraju biti suhi, blago izbočeni i boje okolnog saća, a zdrava ličinka mora biti segmentirana, bijele boje, sedefastog sjaja i napeta. Zdrava savijena ličinka leži ravno unutar svoje stanice saća. Svaka promjena na nepoklopljenom ili poklopljenom leglu ukazuje na poremećaje unutar zajednice (KANE i FAUX, 2021.; TLAK GAJGER, 2020.). Osim toga, prati se izgled i ponašanje odraslih pčela na saću i vidljivi znakovi bolesti.

U slučaju utvrđenih promjena na leglu, izgledu ili ponašanju odraslih pčela, prisutnosti nametnika i štetnika veterinar potvrđuje sumnju na određenu bolest te uzima službeni uzorak koji šalje u ovlaštenu dijagnostičku laboratoriju za bolesti pčela. Uzorkovanje je važan dio pretraživanja jer o njemu ovisi vjerodostojnost dobivenih rezultata. Dijagnoza bolesti postavlja se tek nakon završene laboratorijske pretrage, a na temelju anamneze i kliničke slike pčelinje zajednice (TLAK GAJGER, 2020.).

2.3.1.2. Mikroskopska metoda dijagnostike

Spore *Nosema* spp. i bakterije *P. larvae* rutinski se utvrđuju dijagnostičkom svjetlosnom mikroskopijom. Uzorci odraslih pčela skupljenih na podnici košnice nakon zimovanja ili tijekom aktivne pčelarske sezone pretražuju se na prisutnost i kvantifikaciju spora *Nosema* spp. koprološkom pretragom sadržaja crijeva, odnosno njihovog zdrobljenog zatka. Zbog malih razlika u morfologiji spora *N. apis* i *N. ceranae* nije moguće vrsno diferencirati uzročnika mikroskopskom pretragom.

Mikroskopska pretraga na prisutnost spora *P. larvae* pretražuje se iz uzoraka propalih pčelinjih ličinki. Na predmetnom stakalcu se napravi razmaz koji se oboji prema Ziehl-Neelsonu. Zatim se preparat pregledava pod svjetlosnim mikroskopom uz primjenu imerzijskog ulja (1000 x povećanje).

2.3.1.3. Metoda uzgoja na selektivnim hranjivim podlogama

Konačna dijagnoza bakterijskih ili gljivičnih pčelinjih bolesti može se provesti nasađivanjem uzorka na selektivne hranjive podloge. Metoda se najčešće koristi u svrhe rane dijagnostike američke gnjiloće, pri čemu se prikupljaju uzorci kao što su med, odrasle pčele, vosak te ostaci s podnica košnice. Za svaki uzorak nasađuju se tri ploče, koje se inkubiraju na 37° C tijekom sedam dana. Broj izraslih bakterijskih kolonija izračunava se kao srednja vrijednost tri ploče istog uzorka. Zatim slijedi identifikacija uzročnika prema morfološkim osobinama, koje uključuju izgled, boju i površinu kolonija, te njihov broj. Identifikacija se također može izvršiti biokemijskim (katalaza, Plagmann test) ili molekularnim metoda za konačnu dijagnozu. Uzgoj bakterije *M. plutonius* može biti otežan zbog prisutnosti niza sekundarnih uzročnika infekcije.

2.3.1.4. Molekularne metode dijagnostike

Molekularne metode dijagnostike danas su u pčelarstvu dio rutinskih pretraživanja uzoraka različitih materijala iz košnice koje se koriste za nacionalne programe nadziranja pojavnosti i raširenosti uzročnika te za znanstveno istraživačke rad (TLAK GAJGER, 2019.). Za potrebe pretraživanja primjenom molekularnih metoda izrazito je važno pravilno uzorkovanje budući da vrsta uzorka, vrijeme transporta, temperatura i kemijska stabilizacija,

kao i metode ekstrakcije i skladištenja mogu utjecati na integritet nukleinskih kiselina, što je posebno važno kod ribonukleinske kiseline (CHEN i SIEDE, 2007.). Prije same lančane reakcije polimerazom, odnosno PCR metode, potrebno je iz uzoraka ekstrahirati DNA ili u slučaju dijagnostike virusnih infekcija RNA molekulu, budući da su skoro svi pčelinji virusi u skupini RNA virusa. Izolacija DNA/RNA može se postići iz različitih materijala pomoću komercijalnih setova (EVANS i sur., 2013.). Izdvojena DNA/RNA mora biti dovoljne kvalitete, čistoće i količine za identifikaciju putem PCR metode. Svojestvo RNA zasniva se na komplementarnoj DNA (cDNA) koja se sintetizira s komercijalno dostupnom reverznom transkriptazom.

Dijagnostika primjenom PCR-a može biti kvalitativna, pri čemu se bilježi samo prisutnost ili odsutnost ciljne DNA ili cDNA. Tijekom osnovne PCR metode amplificira se dio nukleinske kiseline na temelju dvije specifične oligonukleotidne početnice (eng. *primer*) koja su dodana u reakciju. Nakon određenog broja ciklusa amplifikacije elektroforezom u agaroznom gelu analizira se krajnji proizvod (EVANS i sur., 2013.).

Ipak, najraširenija metoda koja je i korištena u ovome radu je kvantitativna real-time lančana reakcija polimeraze, odnosno qPCR ili lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (eng. *real-time reverse transcription PCR*, RT-PCR). Ove metode pomoću različitih fluorescentnih kemikalija (SybrGreen, Taqman) istovremeno postižu amplifikaciju i detekciju PCR proizvoda, odnosno trenutno otkrivaju koncentraciju uzročnika u uzorku. Mjerenjem fluorescencije mjerimo nastalu DNA jer je količina fluorescencije razmjerna količini PCR proizvoda. Metoda se zasniva na korištenju neobilježenih specifičnih početnih oligonukleotida te specifične obilježene probe (KAPITANOVIĆ i SLADE, 2004.).

2.3.2. Dijagnostički postupci za pojedine nametnike i patogene mikroorganizme

2.3.2.1. Utvrđivanje prisutnosti *V. destructor*

Varooza se dijagnosticira na temelju karakterističnih vidljivih znakova bolesti tijekom kliničkog pregleda pčelinje zajednice. Dokaz jake invazije je vidljiva prisutnost nametničkih grinja na odraslim pčelama i razbacani raspored pčelinjeg legla s perforiranim poklopcima u kojima se nalaze uginule pčele pri kraju metamorfoze. Nadalje, na jaku invaziju ukazuje prisutnost pčela s izobličenim krilima kao posljedica infekcije s virusom izobličenih krila ili prisustvo uginulih pčela koje su nesposobne napustiti stanicu saća kao posljedica infekcije s virusom akutne pčelinje paralize. Također, na ostacima na podnici košnice možemo utvrditi prisutnost i veliki broj grinja *V. destructor* (FAO, 2020.). Stupanj invadiranosti pčelinje zajednice ovim nametnikom može se pratiti prirodnim padom grinja na podnicu košnice, dijagnostičkim tretiranjem, otklapanjem pčelinjeg legla, primjenom šećera u prahu, višestrukim ispiranjem uzorka odraslih pčela u vodenoj otopini detergenta ili laboratorijskim pretragama.

2.3.2.2. Utvrđivanje prisutnosti *Nosema spp.*

Budući da su klinički znakovi i simptomi bolesti slabo izraženi, pogotovo kod *N. ceranae* dijagnostika bolesti moguća je samo laboratorijskim pretraživanjem. Nozemoza se tradicionalno dijagnosticira mikroskopskom pretragom na prisutnost i brojnost spora u nativnom preparatu vodene otopine sadržaja iz probavnog sustava odraslih pčela. Međutim, mikroskopski je spore *N. ceranae* i *N. apis* teško razlikovati stoga je višestruki PCR sa specifičnim početnicama zadovoljavajuća metoda za dijagnosticiranje ove bolesti. Druge metode koje se rijetko koriste uključuju elektronsku mikroskopiju, histološke metode primjenom specijalnih bojanja, pri čemu nalazimo degeneracije peritrofne membrane i lizu epitelnih stanica srednjeg crijeva pčela, te ELISA-u (KANE i FAUX, 2021.). Ponekad, u uznapredovalim infekcijama može se terenski pregledati boja terminalnog dijela probavnog sustava koje je crvenkaste boje u zdravih, a mliječno bijele boje u bolesnih pčela (FAO, 2020.).

2.3.2.3. Utvrđivanje prisutnosti malog kornjaša košnice

Utvrđivanje prisutnosti malih kornjaša košnice moguće je kod izravne vizualizacije odraslih primjeraka, jaja, ličinaka ili kukuljica. Odrasli kornjaši mogu se teško uočiti budući

da izbjegavaju svjetlost. Prilikom pregleda pčelinje zajednice i košnice može se osjetiti truli miris kao posljedica kvarenja meda, kao i ugibanja pčelinjeg legla. Često ostaju tragovi sluzi unutar i izvan košnice koje ostavljaju lutajuće ličinke. Sumnjive primjerke treba usmrtniti u 70% etanolu ili skladištenjem na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći, a zatim poslati u referentni dijagnostički laboratorij na morfološku identifikaciju ili PCR. To je osobito važno u zemljama koje su zasad slobodne od etinioze (KANE i FAUX, 2021.).

2.3.2.4. Utvrđivanje prisutnosti tripanosomijaza

Za dijagnostiku *C. mellifica* i *L. passim* potrebne su učinkovite molekularne metode budući da se mikroskopskom pretragom ne mogu sa 100% sigurnošću razlikovati. Druge metode izolacije koje se koriste za tripanosomijaze uključuju kulture staničnih linija iz tankog crijeva odraslih pčela, *in vivo* inokulaciju i filogenetske analize, te elektronsku mikroskopiju (SCHWARZ i sur., 2015.).

2.3.2.5. Utvrđivanje prisutnosti virusnih uzročnika bolesti

Klinički vidljive i karakteristične znakove virusnih bolesti moguće je utvrditi kod infekcija virusom izobličenih krila, virusom crnih matičnjaka i virusom mješastog legla.

Dijagnostičke metode za otkrivanje virusa u medonosne pčele osnivaju se na elektronskoj mikroskopiji. Međutim, primarna svrha dijagnostike je sprječavanje daljnjih infekcija. Dijagnostika primjenom klasičnih metoda oduzima puno vremena i omogućava da se virus proširi po zajednici ili više njih na istom i obližnjim pčelinjacima. Molekularne metode kao što je RT-qPCR nude visoko specifične i osjetljive načine za brzo otkrivanje virusa. U posljednjih nekoliko godina primjenom ove dijagnostičke metode utvrđeno je sve češće višestruko opterećenje više vrsta virusa unutar jedne pčelinje zajednice (PETROVIĆ i sur., 2013). Standard za dijagnostiku virusa u bliskoj budućnosti može postati *next-generation* sekvenciranje (NGS) koji zbog svoje visoke osjetljivosti ima potencijal otkriti cijeli spektar virusa (KANE i FAUX, 2021.).

2.3.2.6. Utvrđivanje prisutnosti bakterijskih uzročnika bolesti

Terenska dijagnostika američke i europske gnjiloće medonosne pčele temelji se na vizualnom pregledu pčelinje zajednice te prepoznavanju osobitosti promijenjenih ličinaka pri čemu je potrebno pregledati više okvira sa saćem koje sadrže i poklopljeno i nepoklopljeno leglo. Bilo kakvi znakovi promjena u leglu kao što su promijenjena boja poklopaca nad leglom, rupice na poklopcima ili udubljeni poklopci ukazuju da je zajednica sumnjiva na bolest. Budući da ti znakovi nisu jedinstveni samo za američku i europsku gnjiloću sigurna dijagnoza se postavlja tek nakon laboratorijskog pretraživanja.

Rana infekcija uzročnicima europske gnjiloće može biti naznačena žutom bojom hrane za leglo, ali to se rijetko primjećuje. U uznapredovaloj infekciji znakovi bolesti se uočavaju u ličinki dobi tri do pet dana. Inficirana ličinka gubi kolutićavost i može poprimiti različite oblike. Karakterističan je položaj starijih promijenjenih ličinaka koje se ispruže dopirujući tako izvan stanice saća. Mlađe inficirane pčelinje ličinke gube svoju neprozirnost zbog čega im dušnice mogu postati vidljive. Često inficirane ličinke mijenjaju boju iz zdrave biserno bijele u žuto smeđu i sivkasto crnu dok se potpuno ne raspadnu. Jedan okvir može sadržavati ličinke zdravog izgleda, probušene poklopce, propale ličinke i one s vidljivim dušnicima (KANE i FAUX, 2021.).

Znakovi bolesti karakteristični za američku gnjiloću medonosne pčele obuhvaćaju promjene u izgledu inficirane ličinke koja potamni i spljošti se uz donju stijenku stanice saća. Uginule ličinke izgledaju sluzavo i boje karamele, a nakon nekog vremena se osuše i pretvore u tamnu ljusku na donjoj površini stanice saća. Zaražena ličinka živi kratko nakon poklapanja, a ugiba prije faze kukuljice. Kako ličinka ugine, poklopci nad stanicama saća iznad nje potamne, udube se i često su perforirani. Rupice na poklopcima stanica saća su najčešće smještene periferno. Poklopci uglavnom poprime vlažan izgled. Miris po truleži može i ne mora biti prisutan (KANE i FAUX, 2021.). Bakterijska infekcija se potvrđuje mikroskopski, uzgojem na selektivnoj hranjivoj podlozi i imunološkim ili molekularnim dijagnostičkim metodama.

2.4. Monitoring bolesti pčela primjenom rane dijagnostike

Budući da su patogeni mikroorganizmi glavni čimbenici velikih gubitaka pčelinjih zajednica, nužno je stalno pratiti pojavnost pčelinjih bolesti na pojedinim područjima kako bi se na temelju višegodišnjeg monitoringa sigurnije pristupilo kontroliranju i suzbijanju bolesti (TLAK GAJGER, 2015.). Nažalost, obavezni godišnji veterinarski pregled u Hrvatskoj ne postoji, stoga prva obrana od širenja bolesti ovisi o edukaciji pčelara i veterinara.

Pčelari prate zdravlje svojih zajednica tako da pregledavaju zajednice i primjećuju znakove smanjenja kvalitete matice, procjenjuju jačinu zajednice, količinu pohranjenih zaliha hrane te prisutnost nametnika ili kliničkih znakova bolesti (KANE i FAUX, 2021.). Pčelari su odgovorni u prepoznavanju promjena na pčelinjem leglu i/ili odraslim pčelama koje ukazuju na prisutnost bolesti te su obvezni sumnju o bolestima koje se suzbijaju po Naredbi o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju iz 2021. godine (američka gnjiloća pčelinjeg legla, varooza, tropileloza, etinioza) prijaviti ovlaštenoj veterinarskoj zajednici.

Međutim, infekcija u košnici se može nalaziti u subkliničkom obliku i nemoguće ju je na vrijeme prepoznati. Infekcija može prijeći iz subkliničke u kliničku fazu u prisutnosti određenih uvjeta koji oslabljuju imunološki sustav pčela, uključujući povećanje broja spora *P. larvae* ili *Nosema* spp., prisutnost drugih bolesti, pesticida, nutritivnog i toplinskog stresa (FAO, 2020.). Budući da subkliničke infekcije mogu dovesti do recidiva kliničkih oblika i pridonijeti horizontalnom prijenosu infekcije s jedne pčelinje zajednice na drugu (LINDSTROM i FRIES, 2005.), rana dijagnostika subkliničkih koncentracija patogenih uzročnika bolesti u košnici ili pčelinjaku prioritet su za učinkovitu prevenciju bolesti u okviru dobrih pčelarskih praksi (FORSGREN i LAUGEN, 2015.).

U tom kontekstu važno je koristiti se tehnikama koje pružaju mogućnost ranog utvrđivanja i kvantifikacije patogenih uzročnika bolesti u subkliničkim fazama bolesti, kao što su molekularne metode (WARD i sur., 2007.). Posljednjih godina objavljeno je niz PCR protokola kao alternativa tradicionalnim dijagnostičkim metodama koje se temelje na uzgoju i morfološkoj i biokemijskoj identifikaciji uzročnika (FORSGREN i LAUGEN, 2015.). Molekularne metode su brze, visoko specifične i osjetljive za otkrivanje i za nadziranje prisutnosti uzročnika bolesti u pčelinjoj zajednici (PETROVIĆ i sur., 2013.).

Rana dijagnostika bolesti nužna je za opasne i ekonomski značajne bolesti pčela, budući da dijagnostika koja je bazirana na kliničkim simptomima ne može učinkovito spriječiti brzo širenje uzročnika (ROSSI i sur., 2018.). Zbog sve češće na američku gnjiloću utvrđenih pozitivnih uzoraka saća, u Hrvatskoj 96,46% pčelara podržava uvođenje rane dijagnostike za američku gnjiloću medonosne pčele (TOMLJANOVIĆ i sur. 2020.). Za ranu dijagnostiku prisutnosti bakterije *P. larvae* ključno je moći otkriti ne samo vegetativne oblike bakterija već i spore iz različitih materijala kao što je med, vosak, odrasle pčele ili ostaci s podnica košnice (FORSGREN i LAUGEN, 2015.).

Prednost uzorka ostataka s podnica košnica je mogućnost njegovog prikupljanja tijekom zimskih mjeseci, a s obzirom da veći broj spora tijekom zime povećava vjerojatnost pojave bolesti u proljeće, možemo na vrijeme dobiti uvid o mogućem razvoju bolesti (SOKÓŁ i sur., 2009.). Spore *P. larvae* se mogu utvrditi dvije do tri godine prije uočavanja klinički vidljivih znakova bolesti (TLAK GAJGER i PETRINEC, 2009.). Najmanje pedeset milijuna spora mora biti prisutno da bi se klinički vidljiva bolest pojavila u pčelinjoj zajednici, dok ličinka koja ugiba od američke gnjiloće sadrži otprilike tri do pet milijardi spora (FAO, 2020.). Iz toga razloga, molekularne metode koje omogućuju rano utvrđivanje patogenih uzročnika iz ostataka na podnici košnice mogu pomoći u otkrivanju pčelinjaka s visokim rizikom za pojavu vidljive bolesti, čime se sprječava klinička manifestacija i daljnje širenje bolesti (ROSSI i sur., 2018.).

Neophodna je i rana dijagnostika infekcija pčelinje zajednice virusima za programe nadzora i kontrole virusnih bolesti budući da medonosne pčele mogu biti inficirane istovremeno sa više različitih virusa bez očitih kliničkih znakova bolesti. Kod prikrivenih infekcija prisutna je ravnoteža između nosioca i umnažanja virusa, međutim kod istovremene virusne infekcije i utjecaja negativnih čimbenika iz okoliša pada imunokompetentnost pojedine pčele ili zajednice te dolazi do masovne proizvodnje novih virusnih čestica s razvojem jasno vidljivih simptoma i uginuća (TLAK GAJGER, 2019.).

Također, slaba invazija nametnicima unutar pčelinje zajednice teško se otkriva, zbog čega rano utvrđivanje može biti temelj za poduzimanje potrebnih mjera za smanjenje morbiditeta i mortaliteta. To osobito vrijedi kod invazija pčelinjih zajednica i košnica s *A. tumida* budući da je nedavno utvrđena na području Europe i predstavlja opasnu prijetnju sektoru pčelarstva. U slučaju pojave invazija malog kornjaša košnice naređenim mjerama iz važećih zakonskih akata propisan je detaljan pregled svih pčelinjaka u polumjeru 20 km i

monitoring u krugu polumjera od 100 km. Međutim, moguće je otkriti samo dijelove samo sumnjivog kukca u uzorcima ostataka s podnica košnica te pomoću PCR metode potvrditi pozitivan slučaj. Takva metoda rane dijagnostike je od velikog značaja u slučaju izbivanja bolesti za brzi rutinski nadzor košnica u područjima visokog rizika budući da je u vrlo kratkom razdoblju moguće pretražiti tisuće uzoraka s podnica (WARD i sur., 2007.). Rano utvrđivanje malog kornjaša košnice može na vrijeme spriječiti prirodnu invaziju s velikim brojem jedinki u povoljnim okolišnim uvjetima (TLAK GAJGER, 2015.).

2.5. Uzorci zimskih ostataka s podnice košnice

Uzorci odraslih pčela, legla ili meda koji se često koriste za laboratorijsku dijagnostiku zahtijevaju otvaranje košnica i povećavaju rizik od gubitka matice tijekom procesa uzorkovanja (BIOVA, 2021.). Iako pravilno uzeti uzorci odraslih pčela ili legla predstavljaju stvarno stanje, odnosno status bolesti pčelinje zajednice, uzorci ostataka s podnice prikupljeni na kraju zimovanja sadrže akumulirane patogene uzročnike unutar zajednice (FORSGREN i LAUGEN, 2015.). Pretraživanjem zimskih ostataka s podnice košnice predstavlja jednostavnu, brzu i neinvazivnu metodu prikupljanja uzorka za procjenu zdravstvenog stanja pčelinje zajednice (FORSGREN i LAUGEN, 2015.). Zimski ostaci s podnice košnice predstavljaju svojevrsno mikro životno okruženje, a sastoje se od otpalog voska, peluda, uginulih pčela i njihovih izlučevina. Na podnici, također, mogu biti prisutni nametnici i štetnici te njihovi dijelovi (KIM i sur., 2018.). Zimski uzorci s podnica se za laboratorijsku dijagnostiku prikupljaju zimi (siječanj/veljača), pakiraju se u zrakopropusnu ambalažu (npr. papirnate vrećice), označavaju oznakom košnice i dostavljaju u ovlaštenu dijagnostičku laboratorij. Mogućnost prikupljanja uzoraka bez otvaranja košnice sprječava uznemiravanje pčelinje zajednice i negativne štetne posljedice. Prednost takvih uzorka je što ih svaki pčelar može vrlo lako prikupiti i poslati na laboratorijsko pretraživanje, pazeći pritom da prilikom uzorkovanja ne dođe do međusobnog onečišćenja uzoraka. Iz tog razloga može se brzo dobiti uvid u zdravstveno stanje pčelinjaka šireg područja, posebice zbog uzorkovanja tijekom zimskih mjeseci što omogućava rano otkrivanje subkliničkih koncentracija patogenih uzročnika bolesti (BIOVA, 2021.). Također, na zimskim uzorcima ostataka s podnice košnice može se odrediti i veličina populacije nametnika *V. destructor* (CALATAYUD i VERDÚ, 1993.). Količina zimskih ostataka s podnice košnica određena je zdravstvenim stanjem i jačinom pčelinje zajednice koja je pripravljena za zimovanje. Zdrave zajednice koje su dobro pripravljene proizvode male količine zimskih ostataka, dok one invadirane nametnicima i štetnicima ili inficirane patogenim mikroorganizmima su lošije pripravljene i tijekom zimovanja imaju potrebu konzumiranja veće količine hrane kako bi osigurale zadovoljavajuće temperaturne uvjete unutar zimskog klupka pčela. To posljedično dovodi do prekomjernog punjenja rektuma pčela, povećane proizvodnje komadića voska i posljedično većeg volumena zimskih ostataka s podnice košnice. Također, pčele konzumiraju više hrane kod naglih okolišnih promjena, kao što su velike temperaturne fluktuacije, temperature iznad ništice tijekom zime te visoka razina vlage u košnici što utječe na povećanu količinu ostataka na podnici (SOKÓŁ i sur., 2009.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pčelinjaci

U veljači 2020. godine prikupljeni su uzorci ostataka s podnice košnica na šest nasumično odabranih pčelinjaka smještenih u kontinentalnom dijelu RH. Dva pčelinjaka nalaze se u Podsljemenskoj zoni županije grada Zagreba. Pčelinjak 1 (P1) u naselju Gračani (GPS koordinate: N 45°86'32"; E 15°98'17" sa 40 košnica tipa Alberti-Žnidaršičeva (AŽ), te pčelinjak 2 (P2) u naselju Markuševac (GPS koordinate: N 45°87'39"; E 16°01'82") sastavljen od 20 košnica u tipu Langstroth Root (LR) te se nalazi na udaljenosti manjoj od 5 km u odnosu na P1.

Tri pčelinjaka pripadaju Koprivničko-križevačkoj županiji. Pčelinjak 3 (P3) smješten je u naselju Poljana Križevačka (GPS koordinate: N 45°58'11"; E 16°32'09"), a sastoji se od 306 košnica tipa LR, zatim pčelinjak 4 (P4) smješten u općini Sveti Ivan Žabno (GPS koordinate: N 45°95'19"; E 16°62'48") kojeg čini 50 košnica tipa LR i pčelinjak 5 (P5) u općini Sveti Petar Orehovec (GPS koordinate: N 45°87'39"; E 16°01'82") na kojem se nalazi 56 košnica tipa LR.

Pčelinjak 6 (P6) nalazi se u Varaždinskoj županiji, u naselju Jalkovec (GPS koordinate: N 46°28'33"; E 16°31'77"), s 110 košnica tipa tipa LR.

3.2. Uzorkovanje i pohrana uzoraka

U svakom pčelinjaku nasumično su odabrane pčelinje zajednice za uzorkovanje. Iz P1 prikupili smo deset uzoraka, iz P2, P3, P4 i P6 pet uzoraka i iz P5 devet uzoraka. Uzorci su pohranjeni u papirnate vrećice i označeni brojem košnice i imenom pčelinjaka, a zatim su dostavljeni u laboratorij. Svaki uzorak, iz jedne košnice, odvojen je posebno za DNA ekstrakciju, čije smo uzorke pohranili na temperaturu od -18 °C, te posebno za RNA ekstrakciju čije smo uzorke pohranili na temperaturu od -70 °C do početka laboratorijskog pretraživanja. Iz ostatka uzorka odredili smo broj *V. destructor* iz svake košnice. Zbog zimskih uvjeta u vrijeme prikupljanja uzoraka, klinički pregled košnica nije bio moguć.

3.3. Priprema uzoraka za DNA ekstrakciju

Iz svakog uzorka ostataka s podnice košnice izdvojeno je 0,5 do 3 g materijala što je prebačeno u jednokratne Ependorf tube zapremine 50 mL zajedno s destiliranom vodom u omjeru 1:9 (4,5 mL do 27 mL). Potom su uzorci vorteksirani i inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta. Nakon homogenizacije u Stomacher mašini (BagMixer; Interscience, Paris, Francuska), na max. rpm/2 min, dobivena je suspenzija od koje je uzeto po 1 mL iz svakog uzorka i pohranjeno na - 18 °C do sljedeće faze pretraživanja.

3.4. Izdvajanje DNA

Izdvajanje DNA iz ukupno trideset i devet uzoraka ostataka s podnice košnica bilo je potrebno za utvrđivanje sljedećih uzročnika bolesti: *C. mellificae*, *L. passim*, *A. tumida*, *M. plutonius* i *P. larvae*. Ukupna DNA ekstrahirana je iz 1 mL prethodno pripremljene suspenzije svakog uzorka prema protokolu komercijalnog kompleta za izolaciju DNA „DNA Isolation From Complex Samples“ (IMMT, Slovenija). U uzorke je najprije dodano 392 µL lizirajućeg pufera (D-buffer) zajedno sa 8 µL proteinaze K (20 mg/mL). Nakon protresanja uzoraka na 6400rpm/45s, inkubacije tijekom 15 min na 56 °C (2x) i 10 min na 100 °C (1x) svaki uzorak je centrifugiran na 10 000 x g tijekom 5 minuta. Dobiven je supernatant od kojega je otprilike 350 µL prebačeno u nove sterilne 2 mL mikrocentrifugijske tube. Dodan je trostruki volumen vezujućeg pufera (B-buffer) kako bi se omogućilo optimalno vezanje DNA na silica membranu spin-column sustava. Za pročišćavanje nukleinskih kiselina uzorci su najprije isprani s 600 µL, a zatim s 500 µL puferom za ispiranje koji sadrži etanol (W-buffer). Dodatkom 100 µL pufera za eluiranje (E-buffer) izolirana je pročišćena DNA koja je pohranjena na -18 °C do sljedeće faze pretraživanja.

3.5. Ispitivanje uzoraka primjenom molekularne metode PCR/qPCR

3.5.1. Identifikacija *Nosema* spp. vrste pomoću PCR testa

Izolirana DNA za identifikaciju vrsta *Nosema* spp. umnožena je pomoću PCR metode i specifičnih oligonukleotidnih početnica (Tablica 1.). Amplifikacija je izvedena u ukupnom volumenu od 25 µL, a reakcijska mješavina sastojala se od: 2,5 µL izolirane DNA, 12,5 µL Multiplex Master Mix (Qiagen, Germany), 0,4 µM uzvodne početnice za *N. ceranae* i 0,4 µM za *N. apis* (eng. *forward primer*), 0,5 µM nizvodne početnice (eng. *reverse primer*) i vode (do

ukupnog volumena 25 μ L). U reakciju su uključene pozitivne kontrole koje su pripremljene iz poznatih uzoraka, i negativne kontrole koju je činila voda. Reakcija vezanja polimeraze izvršena je u Veriti temperaturnom kružioniku (Applied Biosystems, Germany), (eng. *thermocycler*), a program je uključivao sljedeće korake: početnu denaturaciju pri 95 °C tijekom 15 min, zatim je uslijedilo 35 ponavljajućih ciklusa koji su se sastojali od denaturacije pri 94 °C tijekom 30 sek, vezanja početnica pri 55 °C tijekom 90 sek, te faze elongacije pri 72 °C tijekom 90 sek. PCR program završio je elongacijom pri 72 °C tijekom 10 min. Vizualizacija amplificiranih PCR proizvoda izvedena je pomoću QIAxcel sustava za elektorforezu s QIAxcel DNA high resolution kit-om (QIAGEN, Njemačka). Analiza je obrađena pomoću QIAxcel Screen Gel software sustava 1.5.0. Veličine odsječaka pojedinog proizvoda određena je usporedbom s markerom veličine (eng. *size marker* 50 bp - 800 bp, Qiagen) i markerom za poravnanje (eng. *alignment marker*, 15bp – 1 kbp, Qiagen).

Vrsta	Nukleotidni slijed uzvodne početnice 5'-3'	Nukleotidni slijed nizvodne početnice 5'-3'	Veličina
<i>N. ceranae</i>	CGT TAA AGT GTA GAT AAG ATG TT	GAC TTA GTA GCC GTC TCT C	143 bp
<i>N. apis</i>	GCA TGT CTT TGA CGT ACT ATG	GAC TTA GTA GCC GTC TCT C	224 bp

Tablica 1. Prikaz specifičnih oligonukleotidnih početnica za utvrđivanje *Nosema* spp.

3.5.2. Trostruki TaqMan real time PCR za utvrđivanje *C. melliferae* i *L. passim*

Izolirana DNA za identifikaciju *C. melliferae* i *L. passim* umnožena je pomoću real-time PCR metode i specifičnih oligonukleotidnih početnica (Tablica 2). U reakciju je ugrađen 18S rRNA Hymenoptera gen kao unutarnja kontrola koja omogućuje točno otkrivanje PCR inhibicije i neuspjeha ekstrakcije DNA za ispravnu interpretaciju negativnih rezultata. Gen za citokrom b primijenjen je za razlikovanje *C. melliferae* i *L. passim*. TaqMan real time PCR test izveden je u trostrukom formatu s reakcijskim volumenima od 25 μ L. Reakcijska mješavina sastojala se od: 2,5 μ L izolirane DNA, 12,5 μ L Master Mixa (Maxima Probe qPCR Master Mix (2X), with separate ROX vial, Thermo Scientific™), 0,1 μ M svake početnice za Hymenoptera 18S i *L. passim*, 0,2 μ M svake početnice za *C. melliferae*, 0,3 μ M svake sonde

za *L. passim* i *C. mellifica*e, 0,2 μ M sonde za Hymenoptera 18S, 0,03 μ M ROX i vode (ultra čista za PCR uporabu). U reakciju su uključene pozitivne kontrole koje su pripremljene iz poznatih uzoraka, a negativne kontrole čini voda. Početnice i TaqMan sonde koje su korištene u pretraživanju prikazani su u Tablici 3. PCR je izveden na AB7500Fast temperaturnom kružioniku (Applied Biosystems, Germany), a program je uključivao: početnu aktivaciju Taq DNA polimeraze na 95 °C tijekom 10 minuta, nakon čega slijedi 40 ciklusa amplifikacije u dva koraka, svaki se sastoji od 15 sek denaturacije na 95 °C i jednogminutnog vezanja pri 60 °C.

Vrsta	Nukleotidni slijed uzvodne početnice 5'-3'	Nukleotidni slijed nizvodne početnice 5'-3'
<i>C. mellifica</i> e	TAA ATT CAC TAC CTC AAA TTC AAT AAC ATA ATC AT	ATT TAT TGT TGT AAT CGG TTT TAT TGG ATA TGT
<i>L. passim</i>	CGA GCT CAT AAA ATA ATG TAA GCA AAA TAA G	TTT TAG CAA TAT TTT AGC AAC AGT ACC AG
Hymenoptera	TAA CTG GCA TTA TGT GGT ACG TC	CCT CGA CAC TCA GTG AAG AGC

Tablica 2. Prikaz specifičnih oligonukleotidnih početnica za utvrđivanje *C. mellifica*e i *L. passim* s Hymenoptera genom kao internom kontrolom.

Vrsta	TaqMan sonda
<i>C. mellifica</i> e	FAM - ACC TAT TAC AGG CAC A - MGB
<i>L. passim</i>	HEX - TTG GTG TTT GGC TAT GT - MGB
Hymenoptera	Cy5 - AGC TCC TYG CGG GCG GTC CAA - BHQ1

Tablica 3. Prikaz TaqMan sonde za utvrđivanje *C. mellifica*e i *L. passim* uz Hymenoptera gen kao internom kontrolom.

3.5.3. Dvostruki real-time PCR test za utvrđivanje *M. plutonius* i *P. larvae*

Izolirana DNA za identifikaciju *M. plutonius* i *P. larvae* umnožena je pomoću real-time PCR metode i specifičnih oligonukleotidnih početnica. PCR test izveden je u ukupnom volumenu od 20 μ L, a reakcijska smjesa sastojala se od: 5 μ L izolirane DNA, 10 μ L Master

Mixa (Maxima Probe qPCR Master Mix (2X), with separate ROX vial, Thermo Scientific™), od 300 nM svake početnice, od 200 nM svake sonde, 0,03 μM ROX i vode (ultračista za PCR uporabu). Poznati pozitivan uzorak korišten je kao pozitivna kontrola, a voda kao negativna kontrola. Početnice i sonde koje su korištene u pretraživanju prikazani su u Tablici 4. i Tablici 5. Amplifikacija je izvršena na AB7500Fast temperaturnom kružioniku (Applied Biosystems, Germany), a program je uključivao početnu aktivaciju Taq DNA polimeraze na 95 °C tijekom 10 minuta, nakon čega je slijedilo 40 ciklusa amplifikacije u dva koraka, svaki od 15 sek denaturacije na 95 °C i jednogminutnog vezanja pri 60 °C.

Vrsta	Nukleotidni slijed uzvodne početnice 5'-3'	Nukleotidni slijed nizvodne početnice 5'-3'
<i>M. plutonius</i>	GAC CTG TTT AGC TAT TAT CAC TA	CAC CTA CAA TGA ATG ATT CAT TC
<i>P. larvae</i>	TAC GCT TTT CGA TTC TCT G	GTC TGT ACT GAA CCA AGT C

Tablica 4. Prikaz specifičnih oligonukleotidnih početnica za utvrđivanje *M. plutonius* i *P. larvae*.

Vrsta	TaqMan sonda
<i>M. plutonius</i>	Yakima Yellow – TCC GCC TAA GCT ACC ACC TAA GAA C - BHQ1
<i>P. larvae</i>	FAM – ATC TGC TTC CAC TTG TTC ACT CAC CA - BHQ1

Tablica 5. Prikaz korištenih TaqMan sondi za utvrđivanje *M. plutonius* i *P. larvae*.

3.5.4. TaqMan real-time PCR za utvrđivanje *Aethina tumida*

Izolirana DNA za identifikaciju *A. tumida* umnožena je pomoću real-time PCR metode i specifičnih oligonukleotidnih početnica. TaqMan PCR test izveden je u ukupnom volumenu od 25 μL. Reakcijska smjesa sastojala se od 2,5 μL izolirane DNA u kojoj je dodano 12,5 μL MasterMixa koji je sadržavao 900 nM svake početnice i 200 nM TaqMan sonde, 0,03 μM ROX i vode (ultra čista voda za PCR uporabu). Poznati pozitivan uzorak korišten je kao pozitivna kontrola, a voda kao negativna kontrola. Početnice i TaqMan sonde koje su korištene u testu prikazani su u Tablici 6. i Tablici 7.

PCR je izveden na AB7500Fast temperaturnom kružioniku (Applied Biosystems, Germany), a amplifikacija je izvršena u sljedećim fazama: 95 °C tijekom 10 min, nakon čega je slijedio 40 ciklusa amplifikacije u dva koraka, svaki se sastoji od 1 min denaturacije na 60 °C i vezanja pri 60 °C tijekom 15 sek.

Vrsta	Nukleotidni slijed uzvodne početnice 5'-3'	Nukleotidni slijed nizvodne početnice 5'-3'
<i>A. tumida</i>	TCT AAA TAC TAC TTT CTT CGA CCC ATC(A/G)	TCC TGG TAG AAT TAA AAT ATA AAC TTC TGG

Tablica 6. Prikaz specifičnih oligonukleotidnih početnica za utvrđivanje *A. tumida*.

Vrsta	TaqMan sonda
<i>A. tumida</i>	ATC CAA TCC TAT ACC AAC ACT TAT TTT GAT TCT TCG GAC

Tablica 7. Prikaz korištenih TaqMan sondi za utvrđivanje *A. tumida*.

3.6. Priprema uzorka za RNA ekstrakciju

Za pretraživanja na prisutnost virusnih uzročnika bolesti korišteno je iz svakog pčelinjaka po tri uzoraka, sveukupno 18 uzoraka, a svaki uzorak testiran je na prisustvo nukleinskih kiselina četiri vrste virusa: virusa akutne pčelinje paralize, virusa mješinstog legla, virusa crnih matičnjaka i virusa izobličjenih krila. Izdvojeno je po jedan gram materijala iz pojedinih uzoraka i prebačeno u Ultra-Turrax DT-20 epruvete (IKA, Königswinter, Germany) s 5 mL RPMI 1640 medija (Gibco, Paisley, UK). Potom su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Nakon homogenizacije i centrifugiranja na 2500 x g tijekom 15 minuta dobivena je suspenzija od koje je uzeto 2 mL supernatanta iz svakog uzorka i pohranjeno na - 70 °C do sljedeće faze pretraživanja.

3.7. Izdvajanje RNA

Ukupna RNA ekstrahirana je iz 140 µL dobivene suspenzije svakog uzorka pomoću QIAamp Viral RNA Mini kit-a (Qiagen, Njemačka). Prema uputama proizvođača u epruvete od 2 mL najprije je otpipetirano 560 µL lizirajućeg pufera (AVL Buffer) u kojemu je dodan nosač RNA. Za precipitaciju nukleinskih kiselina dodano je 560 µL etanola te je 630 µL ukupne

suspenzije prebačeno u QIAamp Mini kolone s filterom i centrifugirano na 8000 okretaja tijekom jedne minute. Mini kolone su stavljene u nove epruvete u koje je preneseno 630 μ L smjese i ponovno centrifugirano na 8000 okretaja tijekom jedne minute. Uzorci su zatim isprani dva puta pomoću 500 μ L pufera za ispiranje (AW1 i AW2 Buffer). Na kraju, dodano je 60 μ L pufera za eluiranje (AVE Buffer) čime je dovršena izolacija pročišćene virusne RNA svakog uzorka koja je pohranjena na -70 °C do daljnje upotrebe.

3.8. Ispitivanje uzoraka primjenom molekularne metode real-time RT-PCR (RT-qPCR)

Virusni genomi za spomenute viruse umnoženi su pomoću real-time RT-PCR metode (*real time one-step reverse transcription*). Reverzna transkripcija za RT-PCR testove napravljena je u jednom koraku pomoću QuantiNova Pathogen +IC Kit-a (Qiagen, Hilden, Njemačka). RT-PCR mješavina sastojala se od 5 μ L QuantiNova Master Mix-a, 2 μ L 10 \times interne kontrole (IC - Internal Control Probe Assay), 1 μ L IC (1: 100), 4,5 μ L deionizirane vode, 1 μ L uzvodne početnice (200 nM), 1 μ L nizvodne početnice (200 nM) i 0,5 μ L TaqMan sonde (100 nM), te 5 μ L ekstrahirane RNA od 20 μ L konačnog volumena.

RT-qPCR je izvršen na Mx3005P temperaturnom kružioniku) (Stratagene, La Jolla, CA, USA), a program je uključivao: početnu fazu reverzne transkriptaze pri temperaturi od 50 °C tijekom 20 min i zatim fazu denaturacije i aktivacije enzima polimeraze pri temperaturi od 95 °C tijekom 2 min. Nakon toga je uslijedilo 45 ponavljajućih ciklusa, a svaki ciklus se sastojao od faze denaturacije pri 95 °C tijekom 15 sek, zatim faze vezanja početnica pri 60 °C tijekom 30 sek, te faze elongacije pri temperaturi od 60 °C tijekom 30 sek.

Za svaki pojedini virus korišten je specifični par početnica. Početnice koje su korištene u ispitivanju prikazane su u Tablici 8. Kod svake RT-qPCR obrade za svaki pojedini virus uključene su pozitivne kontrole koje su pripremljene kao suspenzije provjerenih poznatih uzoraka četiri različita virusa. Negativne kontrole sastojale su se samo od RPMI 1640 medija.

Standardi s poznatim brojem kopija virusne RNK pripremljeni su u deseterostrukom razrjeđenju od 1000 do 10000000 kopija i dodani u svaku RT-qPCR obradu. Točan broj virusnih molekula RNA u pojedinačnim uzorcima određeni su iz standardne krivulje za svaki od četiri virusa pojedinačno. Rezultati za svaki uzorak analizirani su pomoću softvera MxPro-Mx3005P v4.10 (Stratagene, La Jolla, CA, SAD) i točan broj kopija određen je iz standardne krivulje. Rezultati su izraženi kao broj otkrivenih virusnih kopija u 5 μ L ekstrahirane RNA.

Virus	Nukleotidni slijed uzvodne početnice 5'-3'	Nukleotidni slijed uzvodne početnice 5'-3'
Akutna pčelinja paraliza	CAT ATT GGC GAG CCA CTA TG	CTA CCA GGT TCA AAG AA ATT TC
Virus crnih matičnjaka	GGT GCG GGA GAT GAT ATA TGG A	GCC GTC TGA GAT GCA TGA ATA C
Virus izobličenih krila	GCG GCT AAG ATT GTA AAT GTC	GTG ACT AGC ATA ACC ATG ATT A
Virus mješinstog legla	AGC CAG TGA TAG ATG CTC	AAA TAC TCC CGC CAA ATC AC

Tablica 8. Sekvence početnica korištene za RT-qPCR test.

Virus	TaqMan sonda (5-3)
Virus akutne pčelinje paralize	(6-Fam) ATA GTT AAA ACA GCT TTT CAC ACT GG (Tamra)
Virus crnih matičnjaka	(6-Fam) TTT CCA TCT TTA TCG GTA CGC CGC C (Tamra)
Virus izobličenih krila	(6-Fam) CCT TGA CCA GTA GAC AGC ATC (Tamra)
Virus mješinstog legla	(6-Fam) TGG CTC ATC TGG GAT CAC AAT TTC C (Tamra)

Tablica 9. TaqMan sonde korištene za RT-qPCR test.

Virus	Ime standarda	Pozicija nukleotida	Dužina sekvence
Virus akutne pčelinje paralize	pB2	8115 - 8512	397
Virus crnih matičnjaka	pNC1-4	7850 - 8550	700
Virus izobličenih krila	pC1	4240 - 4659	419
Virus mješinstog legla	SBV	5030 - 5368	338

Tablica 10. Standardi korišteni za kvantifikaciju četiri virusa putem RT-qPCR testa.

3.9. Utvrđivanje prisutnosti i kvantifikacija grinja *V. destructor*

Svih trideset i devet prikupljenih uzoraka zimskih ostataka s podnica košnica pretraženo je na prisutnost i kvantifikaciju grinje *V. destructor*. Prema anamnezi svaka zajednica je bila podvrgnuta zimskom tretiranju akaricidima protiv varooze u studenome 2019. godine. Vaganjem svakog uzorka određena je njegova težina u gramima. Broj grinja iz svake zajednice zabilježen je u različitim količinama uzoraka zbog čega je svaki pojedinačni rezultat preračunat na srednju vrijednost broja *V. destructor* u jednom gramu uzorka.

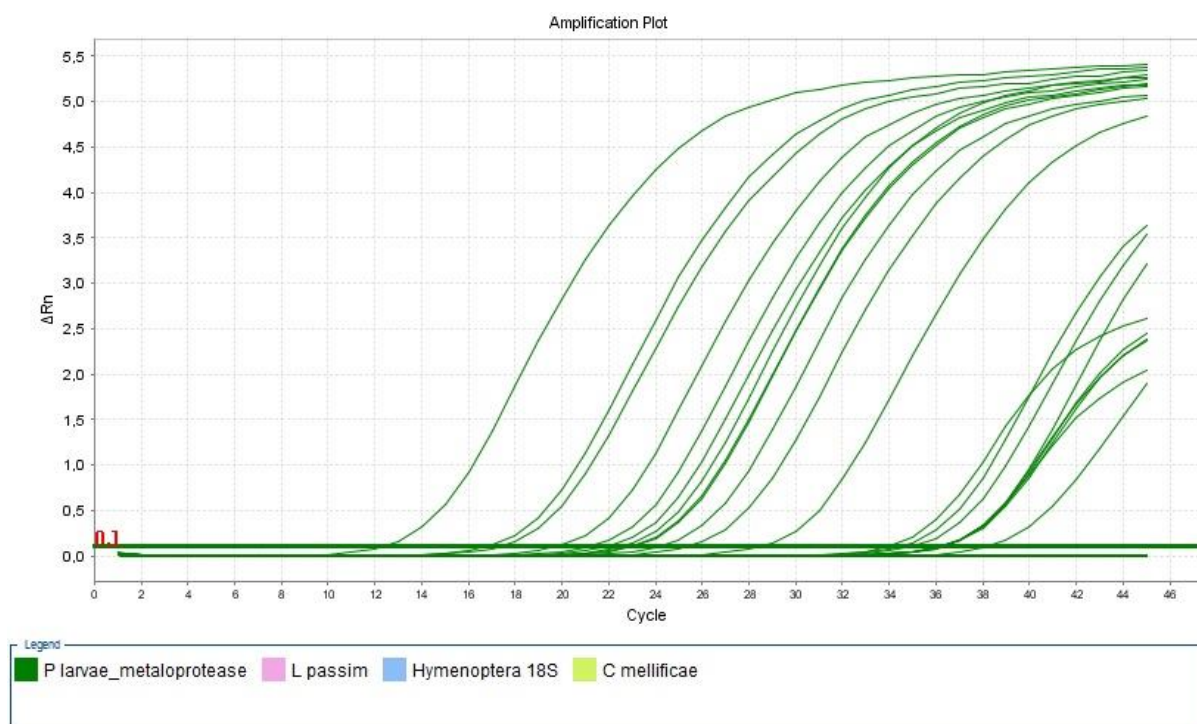
3.10. Klinički pregled pčelinjih zajednica u proljeće i utvrđivanje prirodnog pada *V. destructor*

U proljeće 2020. godine na svakom pčelinjaku pregledane su sve pčelinje zajednice. Cilj je bio utvrditi jačinu zajednice i eventualno prisutnost kliničkih znakova karakterističnih za određenu bolest. Opadanje *V. destructor* praćeno je i u aktivnoj pčelarskoj sezoni prije tretiranja akaricidima. Prije brojenja otpalih grinja *V. destructor* očišćena je svaka podnica. Prirodni pad grinja je praćen tijekom sedam dana. Broj otpalih grinja bilježen je prvi, peti i sedmi dan.

4. REZULTATI

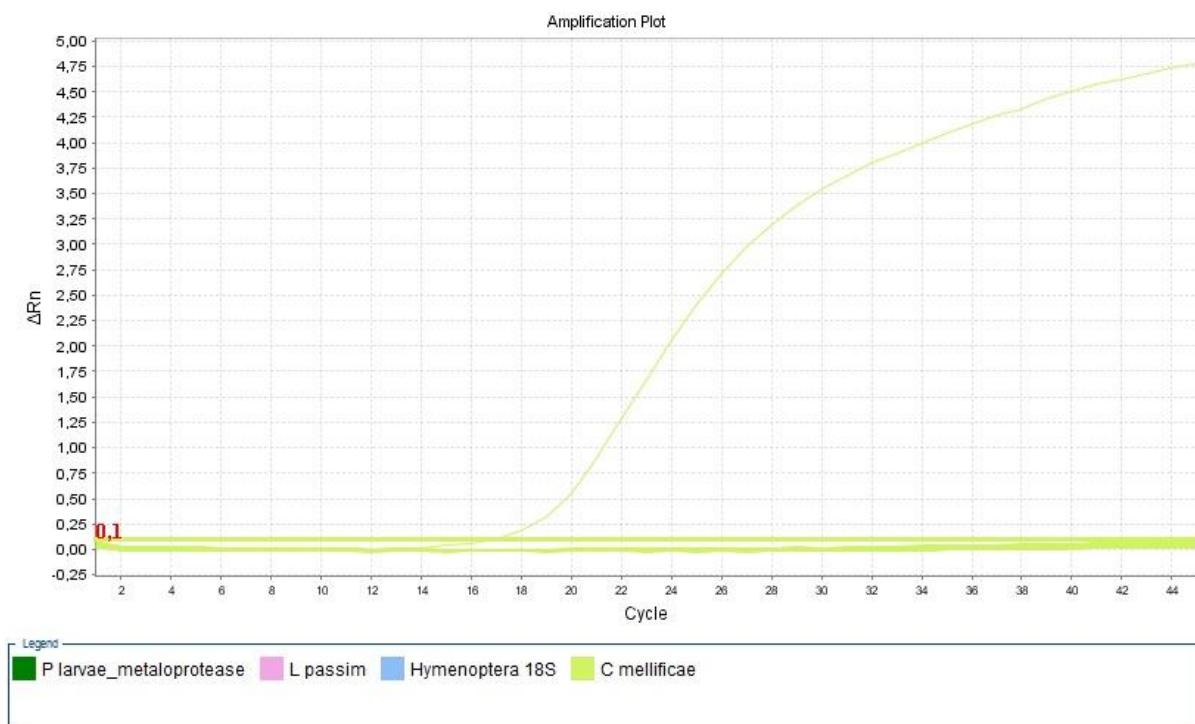
Pomoću konvencionalne PCR metode *N. ceranae* je utvrđena u 87,2% (34/39) pretraženih uzoraka. U niti jednom uzorku nije utvrđena prisutnost *N. apis*. Četiri uzoraka bila su neprikladna za interpretaciju.

P. larvae utvrđena je u 17 od 39 pretraženih uzoraka (43,6%). Jedino u P6 nije utvrđena infekcija s *P. larvae* u niti jednom uzorku, dok je u svim drugim pčelinjacima utvrđena prisutnost *P. larvae*. Klinički znakovi u proljeće pojavili su se samo u P2.



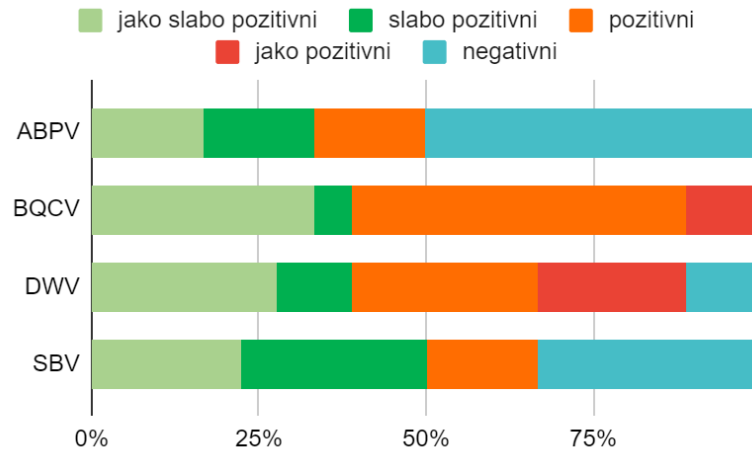
Slika 10. Rezultati pretraživanja na prisutnost *P. larvae*.

Provođenjem Real time PCR metode za utvrđivanje *C. mellifica*, *L. passim* (Slika 11), *M. plutonius* i *A. tumida* nije utvrđen niti jedan pozitivan uzorak.

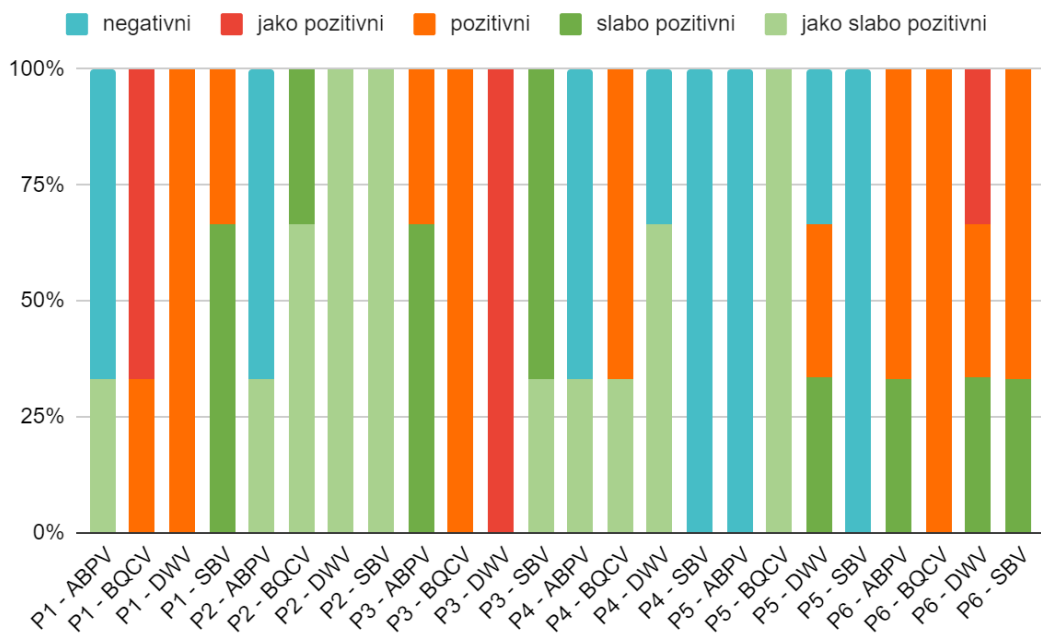


Slika 11. Rezultati pretraživanja na prisutnost *C. mellifica* i *L. passim*.

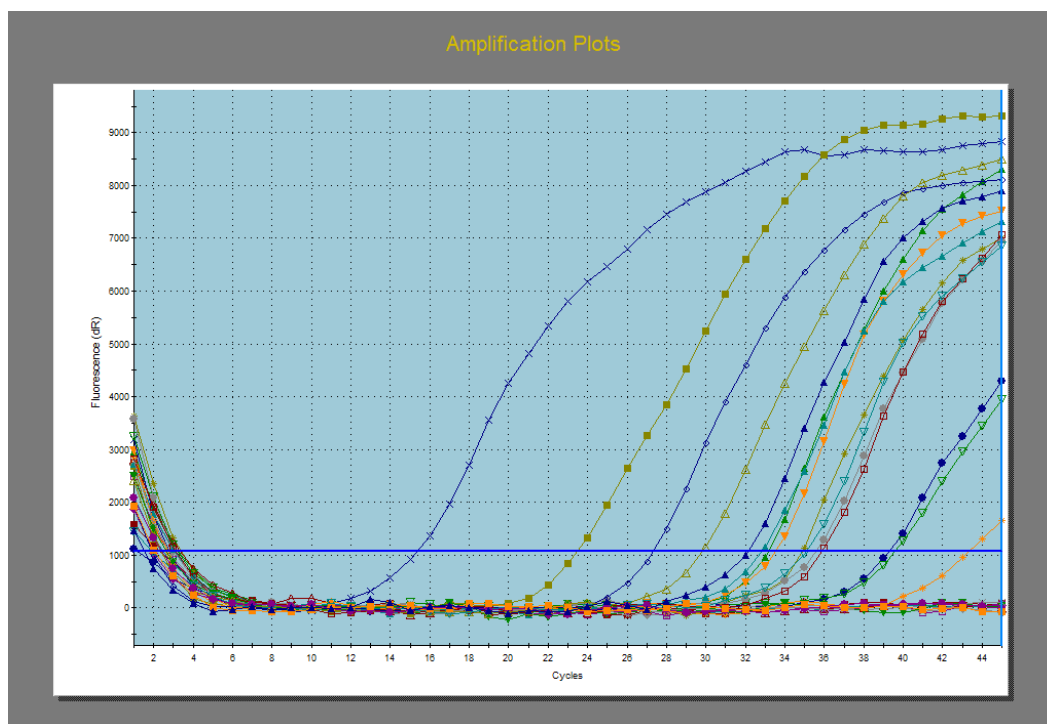
Uzorci sa svakog od pčelinjaka pretraženi su na prisustvo četiri vrste virusa: virus akutne pčelinje paralize, virus crnih matičnjaka, virus izobličjenih krila i virus mješinstog legla. Od ukupno 18 pretraženih uzoraka, devet uzoraka (50%) je bilo pozitivno na prisutnost virusa akutne pčelinje paralize. Nadalje, prisustvo virusa crnih matičnjaka utvrđeno je u svih 18 pretraženih uzoraka (100%). Uzroci pretraživani na prisutnost virusa izobličjenih krila bili su pozitivni u 83,3% slučajeva (15/18), a za virus mješinstog legla u 66,6% (12/18). Rezultate na virusne uzročnike bolesti podijelili smo prema utvrđenoj koncentraciji virusa u pet skupina: negativne, jako slabo pozitivne, slabo pozitivne, pozitivne i jako pozitivne (Grafikon 1). U 45% zajednica ustanovljena je niska razina infekcije, a kod preostalih 35% pozitivnih uzoraka utvrđena je visoka razina infekcije. Ustanovili smo da je u većini pčelinjih zajednica istovremeno bilo prisutno više virusnih uzročnika. Odnosno, većina zajednica bila je pozitivna na sva četiri pretraživana virusna uzročnika bolesti, osim P4 koji je slobodan od virusa mješinstog legla i P5 koji je slobodan od virusa mješinstog legla i virusa akutne pčelinje paralize. Ono što je zajedničko većini zajednica koje nisu preživjele zimu 2020. godine je istovremena visoka razina infekcije na virus crnih matičnjaka i virusa izobličjenih krila.



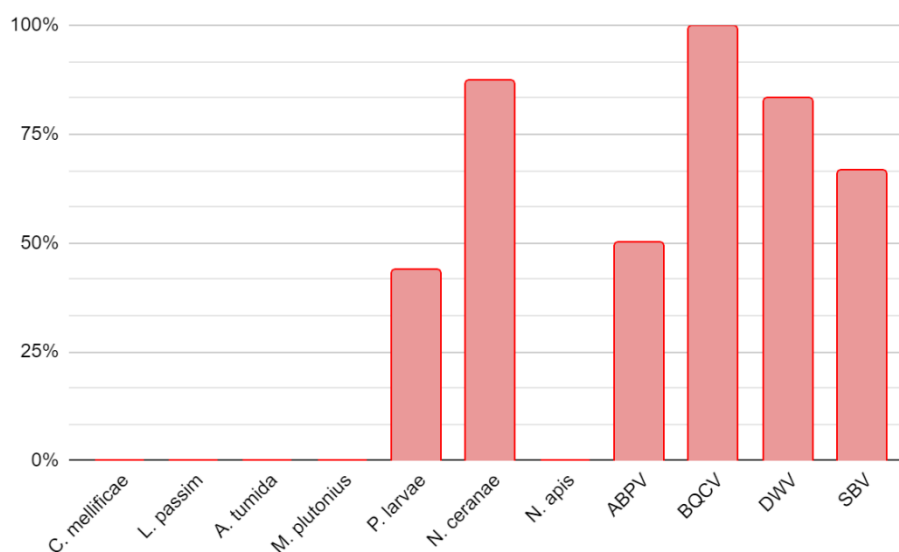
Grafikon 1. Rezultati pretraživanja na prisutnost virusnih uzročnika bolesti.



Grafikon 2. Rezultati pretraživanja na virusne uzročnike bolesti po pojedinom pčelinjaku.



Slika 12. Rezultati pretraživanja na prisutnost virusa akutne pčelinje paralize.

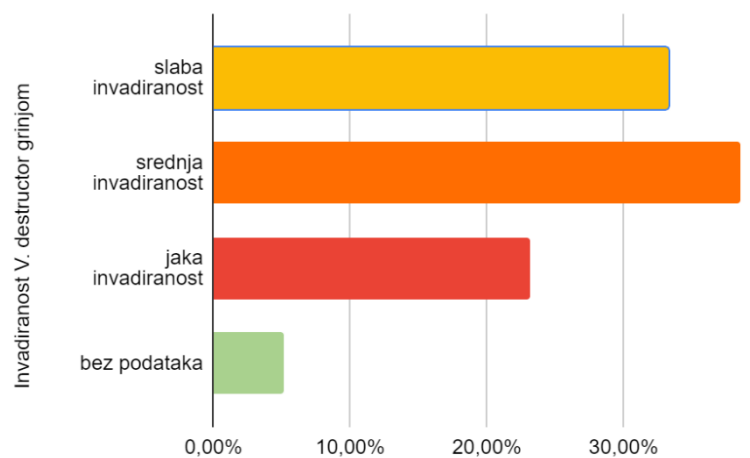


Grafikon 3. Prikaz utvrđenih uzročnika bolesti u svim pretraženim uzorcima ostataka s podnice košnice.

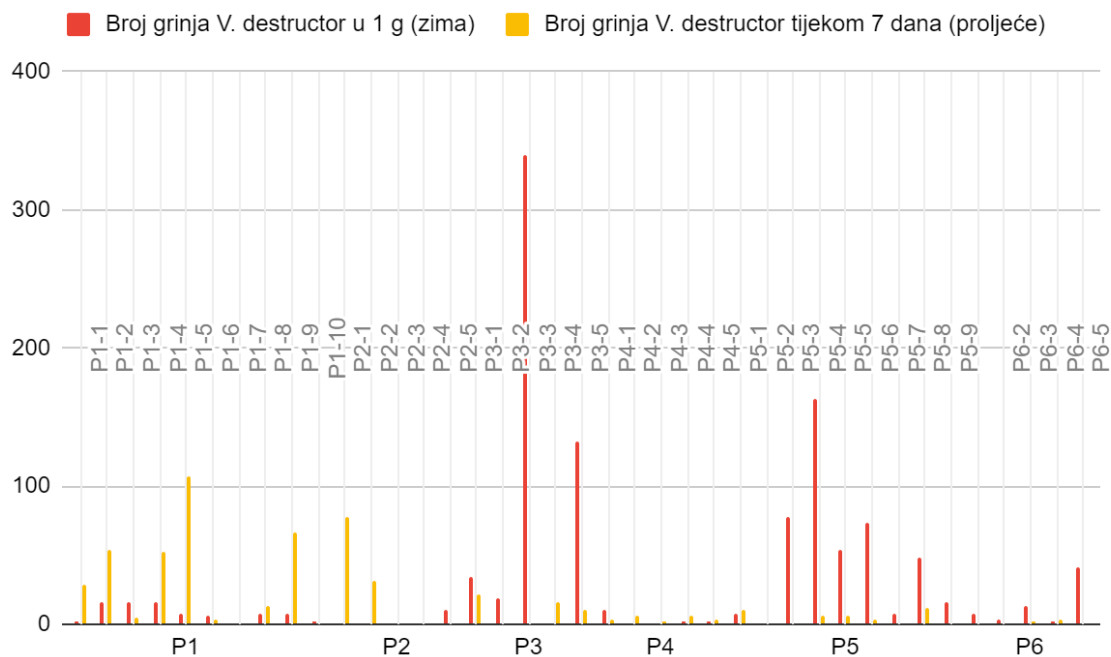
Utvrđivanjem broja otpalih grinja *V. destructor* tijekom zimovanja podijelili smo košnice u tri skupine: slabo, srednje i jako invadirane. Skupini nisko invadiranih zajednica pripada 33,3% (13/39) pretraženih uzoraka iz košnica kojih je najviše prisutno na P2 i P4,

skupini srednje invadiranih pripada 38,5% (15/39) uzoraka iz košnica kojih je najviše smješteno u P1 i P6, a u 23,1 % (9/39) košnica utvrđena je jaka invazija. U zimskim uzorcima najveća invazija zabilježena je u P3 s 339 i P5 s 162,2 izbrojenih grinja u jednom gramu uzorka ostataka s podnice košnice. Dobiveni rezultati iz dva uzorka bili su neprikladni za interpretaciju (Grafikon 4).

U proljeće, brojanjem prirodnog pada grinje *V. destructor* tijekom sedam dana utvrđena je najveća invazija u P1 i P2 (Grafikon 5).



Grafikon 4. Udio grinja *V. destructor* u jednom gramu uzorka ostataka s podnice košnica, uzetih zimi na svim pčelinjacima.



Grafikon 5. Broj *grinja V. destructor* u svakoj košnici izbrojanih iz uzoraka ostataka s podnice košnica prikupljenih u zimu i u proljeće.

U P1 zabilježeno je prosječno šest do sedam patogenih uzročnika bolesti unutar jedne pčelinje zajednice na onim uzorcima koji su pretraživani i na prisutnost virusnih uzročnika bolesti. Sve pretražene zajednice bile su pozitivne na *P. larvae*, međutim, u proljeće nisu bili vidljivi klinički znakovi američke gnjiloće. Zanimljivo je da su zajednice koje nisu preživjele zimu imale veći broj spora *P. larvae* od drugih zajednica koje su preživjele. Uginule zajednice iz košnice P1-7 i P1-10 (označene crvenom bojom u Tablici 11) bile su pozitivne na *P. larvae* i *N. ceranae* s visokom titrom virusa crnih matičnjaka i potvrđenom infekcijom virusom izobličjenih krila. Košnica P1-10 imala je također i visoku razinu virusa mješinstog legla. Zanimljivo je da obje uginule zajednice pripadaju skupini slabo invadiranih s grinjom *V. destructor*. Iako su utvrđivanjem broja *V. destructor* grinje iz zimskih ostataka na podnici utvrđene slabe i srednje razine inadiranosti, u proljeće je na P1 bila najveća invadiranost pčelinjih zajednica. Svaka zajednica bila je pozitivna i na *N. ceranae*, dok *N. apis* nije utvrđena u niti jednom uzorku. U proljeće nije bilo vidljivih kliničkih znakova nozemoze. U proljeće, od preživjelih pčelinjih zajednica prosječno je utvrđeno šest do sedam okvira legla, a odrasle pčele zaposjedale su u prosjeku 22 ulice. Košnica P1-2 imala je slabu zajednicu sa samo osam ispunjenih ulica pčelama, kliničke znakove bolesti poput rupica nad poklopljenim leglom i

nepravilnim rasporedom legla. Košnica P1-3 imala je izrazito slabu zajednicu samo s dva okvira trutovskog legla.

Košnica	<i>P. larvae</i> (Ct)	<i>Nosema</i> spp.	Broj grinja <i>V. destructor</i> u 1 g uzorka (zima)	Br. grinja <i>V. destructor</i> tijekom 7 dana (proljeće)	Virus akutne pčelinje paralize	Virus crnih matičnjaka	Virus izobličjenih krila	Virus mještinastog legla
koš. P1-1	25,45	<i>N. ceranae</i>	2,15	29	jako slabo poz.	poz.	poz.	slabo poz.
koš. P1-2	17,36	<i>N. ceranae</i>	16,25	54	-	-	-	-
koš. P1-3	24,24	<i>N. ceranae</i>	15,6	5	-	-	-	-
koš. P1-4	21,26	<i>N. ceranae</i>	16,6	52	-	-	-	-
koš. P1-5	22,61	<i>N. ceranae</i>	8	107	-	-	-	-
koš. P1-6	23,03	<i>N. ceranae</i>	6,8	3	-	-	-	-
koš. P1-7	16,82	<i>N. ceranae</i>	0,2	-	neg.	jako poz.	poz.	slabo poz.
koš. P1-8	22,97	<i>N. ceranae</i>	8,2	13	-	-	-	-
koš. P1-9	22,03	<i>N. ceranae</i>	7,5	66	-	-	-	-
koš. P1-10	12,37	<i>N. ceranae</i>	2,3	-	neg.	jako poz.	poz.	poz.

Tablica 11. Rezultati laboratorijskih pretraživanja uzoraka porijeklom iz P1.

U P2 zabilježeno je prosječno pet do šest uzročnika bolesti unutar jedne pčelinje zajednice na onim uzorcima koji su pretraživani i na prisutnost virusnih uzročnika bolesti. U uzorcima s P2 utvrđena je niža koncentracija *P. larvae* te su u proljeće košnice P2-3, P2-4 i P2-5 (označene crvenom bojom u Tablici 12) uginule sa znakovima američke gnjiloće i sanirane su sukladno važećim propisanim mjerama. Samo jedna zajednica bila je negativna na prisutnost *P. larvae*. Svaka zajednica bila je pozitivna i na *N. ceranae*, dok *N. apis* nije utvrđena u niti jednom uzorku. U proljeće nije bilo vidljivih kliničkih znakova nozemoze. Utvrđivanjem broja *V. destructor* iz zimskih ostataka na podnici košnice utvrđeno je da većina košnica pripada skupini s niskom invazijom, osim košnice P2-5 sa srednjom razinom invazije, međutim

u proljeće preživjele zajednice su bile jako invadirane. U dvije preživjele pčelinje zajednice prosječno je utvrđeno osam okvira legla, a odrasle pčele zaposjedale su u prosjeku 22 ulice.

Košnica	<i>P. larvae</i> (Ct)	<i>Nosema</i> spp.	Broj grinja <i>V. destructor</i> u 1 g uzorka (zima)	Br. grinja <i>V. destructor</i> tijekom 7 dana (proljeće)	Virus akutne pčelinje paralize	Virus crnih matičnjaka	Virus izobličenih krila	Virus mještinastog legla
koš. P2-1	33,98	<i>N. ceranae</i>	1,3	78	neg.	jako slabo poz.	jako slabo poz.	jako slabo poz.
koš. P2-2	neg.	<i>N. ceranae</i>	0,5	32	neg.	jako slabo poz.	jako slabo poz.	jako slabo poz.
koš. P2-3	38,25	<i>N. ceranae</i>	0,4	-	jako slabo poz.	slabo poz.	jako slabo poz.	jako slabo poz.
koš. P2-4	36,3	<i>N. ceranae</i>	0,1	-	-	-	-	-
koš. P2-5	36,29	<i>N. ceranae</i>	10,5	-	-	-	-	-

Tablica 12. Rezultati laboratorijskih pretraživanja uzoraka porijeklom iz P2.

U P3 zabilježeno je prosječno pet do šest uzročnika bolesti unutar jedne pčelinje zajednice u onim uzorcima koji su pretraživani i na viruse. Dvije zajednice su negativne na *P. larvae*, dok je u pozitivnih zajednica zabilježena niska razina *P. larvae*. Zimu nisu preživjele dvije zajednice (označene crvenom bojom u Tablici 13), jedna koja je bila negativna na *P. larvae*, ali pozitivna na *N. ceranae* s izrazito jakim stupnjem infekcije virusima izobličenih krila i crnih matičnjaka, uz srednju invaziju s grinjom *V. destructor* i druga kod koje je utvrđena niža koncentracija *P. larvae* s izrazito jakim invazijom *V. destructor*, te visokim titarom virusa izobličenih krila i virusa crnih matičnjaka. U zimskim uzorcima najveća invazija *V. destructor* grinje zabilježena je u P3-3 košnici koja nije preživjela zimu s 339 izbrojenih nametnika, dok je u proljeće u preživjelim zajednicama prevladavala srednja razina invadiranosti. Od preživjelih zajednica utvrđeno je prosječno osam okvira legla, a odrasle pčele zaposjedale su u prosjeku 18 ulica. U proljeće utvrđeni su i vidljivi klinički znakovi akutne pčelinje paralize i izobličenih krila, klinički znakovi američke gnjiloće nisu bili vidljivi.

Košnica	<i>P. larvae</i> (Ct)	<i>Nosema</i> spp.	Broj grinja <i>V. destructor</i> u 1 g uzorka (zima)	Br. grinja <i>V. destructor</i> tijekom 7 dana (proljeće)	Virus akutne pčelinje paralize	Virus crnih matičnjaka	Virus izobličjenih krila	Virus mješinstog legla
koš. P3-1	28,53	<i>N. ceranae</i>	34	21	poz.	poz.	jako poz.	slabo poz.
koš. P3-2	neg.	<i>N. ceranae</i>	18,6	-	slabo poz.	poz.	jako poz.	slabo poz.
koš. P3-3	35,06	<i>N. ceranae</i>	339	-	slabo poz.	poz.	jako poz.	jako slabo poz.
koš. P3-4	34,46	<i>N. ceranae</i>	-	16	-	-	-	-
koš. P3-5	neg.	<i>N. ceranae</i>	132,5	11	-	-	-	-

Tablica 13. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P3.

U P4 zabilježeno je prosječno četiri do pet uzročnika bolesti unutar jedne pčelinje zajednice u onim uzorcima koji su pretraživani i na viruse, a kliničkim pregledom u proljeće utvrđeno je da su sve zajednice preživjele zimu. Tri zajednice su bile negativne na *P. larvae*, dok je u preostale dvije zajednice zabilježena niska razina *P. larvae*, kod kojih u proljeće nije došlo do razvoja kliničke slike. Četiri zajednice su pozitivne i na *N. ceranae*, dok je jedan uzorak bio neprikladan za interpretaciju. U proljeće nije bilo vidljivih kliničkih znakova nozemoze. Utvrđivanjem broja *V. destructor* iz zimskih ostataka na podnici košnice utvrđena je jaka invazija u tri košnice, dok je u proljeće bila slaba. Od virusnih uzročnika bolesti najviše je bio prisutan virus crnih matičnjaka zbog čega su u proljeće u košnici P4-1 bili prisutni vidljivi klinički znakovi virusa crnih matičnjaka. Odrasle pčele zaposjedale su u prosjeku 20 ulica i po 9 okvira legla.

Košnica	<i>P. larvae</i> (Ct)	<i>Nosema</i> spp.	Br. grinja <i>V. destructor</i> u 1 g (zima)	Br. grinja <i>V. destructor</i> tijekom 7 dana (proljeće)	Virus akutne pčelinje paralize	Virus crnih matičnjak	Virus izobličenih krila	Virus mještinastog legla
koš. P4-1	neg.	<i>N. ceranae</i>	7	4	jako slabo poz.	poz.	neg.	neg.
koš. P4-2	36,25	<i>N. ceranae</i>	1	6	neg.	poz.	jako slabo poz.	neg.
koš. P4-3	36,28	<i>N. ceranae</i>	77,2	2	neg.	jako slabo poz.	jako slabo poz.	neg.
koš. P4-4	neg.	<i>N. ceranae</i>	162,6	6	-	-	-	-
koš. P4-5	neg.	neprikladno za interpretaciju	54	4	-	-	-	-

Tablica 14. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P4.

U P5 zabilježeno je prosječno tri do četiri uzročnika bolesti unutar jedne pčelinje zajednice u onim uzorcima koji su pretraživani i na prisutnost virusa, a kliničkim pregledom zajednica u proljeće utvrđeno je da su sve zajednice uspješno preživjele zimu. Samo je jedna zajednica bila pozitivna na *P. larvae* kod koje nije došlo do razvoja kliničke slike u proljeće, dok su preostale zajednice negativne. Većina zajednica je pozitivna na infekciju s *N. ceranae*, dok je jedna negativna, a preostale dvije neprikladne za interpretaciju. Utvrđivanjem broja *V. destructor* iz zimskih ostataka na podnici utvrđena je visoka invazija u četiri košnice, dok su iste košnice u proljeće bile slabo do srednje invadirane. Od virusnih uzročnika bolesti najviši titar je utvrđen za virus izobličenih krila zbog čega su u proljeće sporadično bili prisutni klinički znakovi karakteristični za taj virus. Sve zajednice su bile negativne na viruse akutne pčelinje paralize i mještinastog legla. U proljeće, odrasle pčele zaposjedale su u prosjeku 20 ulica, a leglo 9 okvira, samo je u košnici P5-7 bila slabija zajednica s 9 ulica pčela i 5 okvira legla.

Košnica	<i>P. larvae</i> (Ct)	<i>Nosema</i> spp.	Br. grinja <i>V. destructor</i> u 1 g (zima)	Br. grinja <i>V. destructor</i> tijekom 7 dana (proljeće)	Virus akutne pčelinje paralize	Virus crnih matičnjaka	Virus izobličjenih krila	Virus mješinstog legla
koš. P5-1	36,23	neprikladno za interpretaciju	74	11	neg.	jako slabo poz.	poz.	neg.
koš. P5-2	neg.	neg.	7,25	1	neg.	jako slabo poz.	slabo poz.	neg.
koš. P5-3	neg.	<i>N. ceranae</i>	48,5	1	-	-	-	-
koš. P5-4	neg.	<i>N. ceranae</i>	16,3	6	-	-	-	-
koš. P5-5	neg.	<i>N. ceranae</i>	7	6	-	-	-	-
koš. P5-6	neg.	<i>N. ceranae</i>	3,6	3	-	-	-	-
koš. P5-7	neg.	<i>N. ceranae</i>	13	1	neg.	jako slabo poz.	neg.	neg.
koš. P5-8	neg.	<i>N. ceranae</i>	2,5	12	-	-	-	-
koš. P5-9	neg.	neprikladno za interpretaciju	41	0	-	-	-	-

Tablica 15. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P5.

U P6 zabilježeno je prosječno pet do šest patogenih uzročnika bolesti unutar jedne pčelinje zajednice u onim uzorcima koji su pretraživani i na prisutnost virusa. Sve zajednice bile su negativne na prisutnost *P. larvae*, a pozitivne na *N. ceranae*, osim jedne čiji je rezultat pretraživanja bio neprikladan za interpretaciju. U proljeće nisu bili vidljivi znakovi nozemoze. Utvrđivanjem broja *V. destructor* iz uzoraka zimskih ostataka na podnici košnice utvrđena je niska invazija u četiri košnice i srednja razina invazije u košnici oznake P6-1, a u proljeće je detektiran najmanji broj grinja od svih pretraženih pčelinjaka. U uzorcima iz tri košnice utvrđena je visoka razina titra svih četiri pretraženih virusa. Kliničkim pregledom P6 u proljeće utvrđeno je da je jedna zajednica uginula (označena crvenom bojom u Tablici 16). Jačina pčelinjih zajednica je bila slaba s prosječnih sedam okvira legla i deset ulica zaposjednutih odraslim pčelama. Od kliničkih znakova bili su vidljivi znakovi virusa izobličjenih krila.

Košnica	<i>P. larvae</i> (Ct)	<i>Nosema</i> spp.	Br. grinja <i>V. destructor</i> u 1 g (zima)	Br. grinja <i>V. destructor</i> tijekom 7 dana (proljeće)	Virus akutne pčelinje paralize	Virus crnih matičnjaka	Virus izobličjenih krila	Virus mješinstog legla
koš. P6-1	neg.	<i>N. ceranae</i>	10,8	0	poz.	poz.	poz.	poz.
koš. P6-2	neg.	neprikladno za interpretaciju	nema podataka	0	poz.	poz.	slabo poz.	poz.
koš. P6-3	neg.	<i>N. ceranae</i>	0,73	2	slabo poz.	poz.	jako poz.	slabo poz.
koš. P6-4	neg.	<i>N. ceranae</i>	2,3	3	-	-	-	-
koš. P6-5	neg.	<i>N. ceranae</i>	2,6	0	-	-	-	-

Tablica 16. Rezultati laboratorijskih pretraživanja porijeklom iz P6.

5. RASPRAVA

Postoji jako mali broj objavljenih članaka koje se bave istraživanjem vjerodostojnosti uzoraka zimskih ostataka s podnica košnica i njegovog značenja za zdravstveno stanje pčelinjih zajednica. Ovim radom smo po prvi puta napravili laboratorijsko pretraživanje zimskih ostataka s podnica košnica skupljenih na pčelinjacima u RH. Pri tome je utvrđena prisutnost i/ili odsutnost pojedinih patogenih uzročnika bolesti ili nametnika pomoću PCR/qPCR metoda, a dobiveni rezultati su uspoređeni sa zdravstvenim stanjem i jačinom pčelinjih zajednica u proljeće.

Iako se uzorkovanje meda, sumnjivog/promijenjenog legla i odraslih pčela često koristi u svakodnevnoj praksi, takvo uzorkovanje sa sobom nosi i neke nedostatke. Naime, uzorkovanje materijala iz košnice namijenjeno za laboratorijsko pretraživanje iziskuje puno vremena budući da je potrebno otvoriti svaku košnicu, a službeno uzorkovanje provodi ovlaštenu veterinar. Nadalje, svako otvaranje košnice uzrokuje povećanje stresa za pčelinju zajednicu, a također može dovesti i do gubitka matice. Osim toga, mogućnost otvaranja košnice ovisi i o vremenskim uvjetima. S druge strane, ostaci s podnica košnica mogu se vrlo lako prikupiti u bilo kakvim vremenskim uvjetima, što omogućuje analizu zdravstvenog stanja pčelinje zajednice u zimskim mjesecima. Također, uzorkovati može i pčelar. Pretraživanjem uzoraka može se utvrditi prisutnost uzročnika bolesti na jednom ili više pčelinjaka tijekom zimskih mjeseci i može pomoći u pravodobnom poduzimanju kontrolnih i/ili preventivnih mjera za izbjegavanje pojave vidljivih znakova pojedine bolesti, a time i izbijanja bolesti te njenog širenja tijekom aktivne pčelarske sezone.

Za dijagnosticiranje nozemoze u praksi se često koristi koprolška metoda koja uključuje usmrćivanje odraslih pčela. Ovim radom smo pomoću neinvazivnog uzorkovanja zimskih ostataka s podnica košnica uspješno utvrdili prisutnost uzročnika nozemoze, kao što su to napravili i COPLEY i suradnici (2012.) kada su potvrdili da su rezultati pretraživanja uzorka s podnica košnica jednako pouzdani kao i pretraživanje uzroka odraslih pčela. Također, ponovno je utvrđena prisutnost samo *N. ceranae* kao dominantne vrste što je sukladno rezultatima TLAK GAJGER i sur. (2010.) koji su zaključili da je *N. ceranae* jedina vrsta iz roda *Nosema* spp. prisutna na području RH. Budući da u svim laboratorijski potvrđenim pozitivnim pčelinjim zajednicama nismo utvrdili vidljive znakove proljeva u rano proljeće možemo potvrditi da je infekcija s *N. ceranae* asimptomatska bolest.

BASSI i sur. (2018.) usporedili su razinu onečišćenja sa sporama *P. larvae* u uzorcima odraslih pčela, meda i ostataka s podnica košnica koji su prikupili tijekom zime, dok su u proljeće pratili moguću pojavu klinički vidljive bolesti. Pretražili su uzorke skupljene na deset pčelinjaka i iz 125 pčelinjih zajednica, metodom uzgoja na selektivnim hranjivim podlogama. Dobiveni rezultati pokazali su da pretraživanje uzorka odraslih pčela i ostatka s podnica košnica ima veću osjetljivost od pretraživanja uzoraka meda, ali i da ostaci s podnica košnica pokazuju veću specifičnost od uzoraka odraslih pčela (57,80% prema 7,34%).

FORSGREN i LAUGEN (2015.) su u zimskim ostacima s podnice košnice utvrdili značajno više spora uzročnika američke gnjiloće medonosne pčele nego u uzorcima odraslih pčela. Razlog tomu je što se otpaci s podnice košnice koje sadrže spore *P. larvae* nakupljaju mjesecima za razliku od uzorka odraslih živih pčela čiji životni vijek traje nekoliko tjedana. Korištenjem PCR metode pretraživanjem uzoraka zimskih ostataka s podnica utvrdili su najviše koncentracije bakterije *P. larvae* i naknadnim pregledom najveći udio klinički vidljivih zaraženih pčelinjih zajednica (40 od 58 pregledanih pčelinjih zajednica). Iste autorice su zaključile da je za otkrivanje subkliničkih koncentracija bakterije *P. larvae*, bez obzira na nedostatak vidljivih simptoma bolesti, najbolja metoda PCR analiza akumuliranih ostataka s podnica košnica.

Prema rezultatima ovoga rada ustanovili smo da prisutnost bakterije *P. larvae* u zimskim ostacima s podnica košnica ne znači i sigurnu pojavu klinički vidljive bolesti američke gnjiloće u proljeće, budući da se niske koncentracije spora uzročnika bolesti može učestalo utvrditi u različitim materijalima iz košnice i u naizgled zdravim pčelinjim zajednicama. Od 17 pozitivnih uzoraka, samo su tri zajednice s najvećim brojem spora u proljeće razvile karakteristične kliničke znakove bolesti. Također, važno je napomenuti da pomoću pretraživanja uzoraka s podnica košnica možemo uočiti i povezanost zaraze između dva pčelinjaka. P1 i P2 su međusobno udaljeni manje od 5 km, a prema dobivenim rezultatima vidimo sličnu razinu infekcije s *P. larvae*. Iz tog razloga potrebna su daljnja istraživanja i validacija broja spora u zimskim ostacima s podnica košnice za precizniju ranu dijagnostiku američke gnjiloće.

BIOVA i sur. (2021.) dokazali su da se iz ostatka s podnica košnica može utvrditi prisutnost *M. plutonius*. Iako su uzorci meda i pčela dali pouzdanije rezultate zaključile su da su uzorci s podnica košnica učinkovitiji za neinvazivno praćenje europske gnjiloće u pčelinjim

zajednicama. Međutim, prema dobivenim rezultatima ovoga rada, nije utvrđen niti jedan pozitivan uzorak na *M. plutonius* na pretraženim pčelinjacima.

Iako su tripanosomatidi vrlo česti unutar pčelinjih zajednica, prilikom ovog istraživanja nije potvrđena niti jedna pčelinja zajednica pozitivna na *C. mellificae* i *L. passim*. Iz tog razloga je potrebno uzorkovati na više pčelinjaka s različitih lokacija za dobivanje objektivnijih rezultata.

Analizom zimskih ostataka s podnica košnice, prema očekivanju, nije potvrđen niti jedan pozitivan uzorak na *A. tumida* budući da je RH zasad slobodna od invazija malog kornjaša košnice. Međutim, dokazali smo da je pretraživanje takvih uzoraka pomoću qPCR metode izuzetno korisno za brzo dijagnosticiranje prisutnosti malog kornjaša košnice na novim geografskim područjima gdje je češće prisutan u niskim razinama, a što je od velikog značaja za brzi rutinski nadzor košnica u područjima visokog rizika.

Godine 2018. napravljena je analiza ostataka s podnica košnica na prisutnost osam virusnih uzročnika bolesti pčelinjih zajednica, uključujući i akutnu pčelinju paralizu, virus crnih matičnjaka, virus izobličjenih krila i virus mješastog legla. Prema rezultatima tih istraživanja, u većini slučajeva su virusni uzročnici bolesti potvrđeni preciznije nego u uzorcima odraslih pčela ili ličinaka zbog čega su zaključili da bi uzorci ostataka s podnica košnica mogli biti bolji pokazatelj higijene unutar pčelinje zajednice (KIM i sur., 2018.).

Ovim radom utvrdili smo da su zimski ostaci na podnici košnica prikladan, neinvazivan i jednostavan materijal za utvrđivanje prisutnosti virusnih uzročnika bolesti. Pomoću real-time RT-PCR testa ustanovili smo da je u većini zajednica prisutno istovremeno više virusnih uzročnika. Utvrdili smo visoku infekciju pčelinjih zajednica virusom crnih matičnjaka (100% uzoraka) i virusom izobličjenih krila (83,3%), dok je infekcija pčelinjih zajednica s virusom mješastog legla nešto manja (66,6 %), a s virusom akutne pčelinje paralize najmanja (50 %).

Također, utvrđeni broj *V. destructor* u zimskim ostacima s podnica košnica pokazao je izrazito vrijednu metodu monitoringa stupnja invadiranosti pčelinjih zajednica spomenutim nametnikom i tijekom zimskih mjeseci.

6. ZAKLJUČCI

- Uzorkovanje zimskih ostataka s podnice košnice je jednostavna, neinvazivna i jeftina metoda.
- Pretraživanjem uzoraka ostataka s podnice košnice primjenom PCR i qPCR metoda može se brzo i pouzdano utvrditi prisutnost različitih uzročnika bolesti pčelinjih zajednica.
- Rana dijagnostika subkliničkih koncentracija bakterije *P. larvae* u zimskim ostacima s podnica košnica izuzetno je vrijedna metoda za sprječavanje širenja bolesti u proljeće.
- *N. ceranae* je jedina utvrđena vrsta iz roda *Nosema* i najčešće je prisutan patogeni uzročnik bolesti u pretraživanih pčelinjih zajednica (87,2 %).
- U zimskim uzorcima s podnica košnica utvrđena je istodobna infekcija i invazija pčelinjih zajednica s više uzročnika bolesti i nametnika. Pretražene pčelinje zajednice bile su istodobno inficirane s prosječno četiri do šest patogenih uzročnika bolesti.
- Virus crnih matičnjaka i virus izobličjenih krila su bili najčešće utvrđeni virusi, a pčelinje zajednice koje su bile istodobno inficirane s oba virusa nisu preživjele zimu.
- Iz zimskih uzoraka ostataka s podnica košnica može se utvrditi stupanj invadiranosti grinjom *V. destructor*.

7. LITERATURA

ALAUX, C., J. L. BRUNET, C. DUSSAUBAT, F. MONDET, S. TCHAMITCHAN, M. COUSIN, J. BRILLARD, A. BALDY, L. P. BELZUNCES, Y. LE CONTE (2010): Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774–782. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x

ALAUX, C., M. FOLSCHWEILLER, C. MCDONNELL, D. BESLAY, M. COUSIN, C. DUSSAUBAT, J.-L. BRUNET, Y. LE CONTE (2011): Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 106, 380–385. DOI: 10.1016/j.jip.2010.12.005

ALIZON, S., S. LION (2011): Within-host parasite cooperation and the evolution of virulence. *Proc. R. Soc. B* 278, 3738–3747. DOI: 10.10098/rspb.2011.0471

ALLEN, M., B. BALL (1996): The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77, 141–162. DOI: 10.1080/0005772X.1996.11099306

AMDAM, G. V., K. HARTFELDER, K. NORBERG, A. HAGEN, S. W. OMHOLT (2004): Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering. *J. Econ. Entomol.* 97, 741-747. DOI: 10.1093/jee/97.3.741

ANONYMOUS (2021): Naredba o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2021. godini. *Narodne novine*, 2/21, 4./21, 7/21, 19/21.

BAKONYI, T., I. DERAESHIFAR, E. GRABENSTEINER, N. NOWOTNY (2002): Development and evaluation of PCR Assays for the detection of *P.larvae* in Honey Samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1504-1510. DOI: 10.1128/AEM.69.3.1504-1510.2003

BASSI, S., E. CARPANA, P. BERGOMI, G. GALLETTI (2018): Detection and quantification of *Paenibacillus larvae* spores in samples of bees, honey and hive debris as a tool for American foulbrood risk assessment. *Bull. Insectol.* 71, 235-241.

BEAUREPAIRE, A., N. PIOT, V. DOUBLET, K. ANTUNEZ, E. CAMPELL, P. CHANTAWANNAKUL, N. CHEJANOVSKY, A. GAJDA, M. HEERMAN, D. PANZIERA, G. SMAGGHE, O.Y.J. R. DE MIRANDA, A. DALMON (2020): Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee. *Apis mellifera*. *Insects* 11, 239. DOI: 10.3390/insects11040239

BEIMS, H., B. BUNK, S. ERLER, K. I. MOHR, C. SPROER, S. PRADELLA, G. GUNTHER, M. ROHDE, W. VON DER OHE, M. STEINERT (2020): Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *International Journal of Medical Microbiology* 310, 151394. DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151394.

BELLOY, L., A. IMDORF, I. FRIES, E. FORSGREN, H. BERTHOOD, R. KUHN, J. D. CHARRIERE (2007): Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie* 38, 136–140. DOI: 10.1051/apido:2006069.

BIOVA, J., J. D. CHARRIERE, S. DOSTALKOVA, M. ŠKRABIŠOVA, M. PETRIVALSKY, J. BZDIL, J. DANIHLIK (2021): *Melissococcus plutonius* Can Be Effectively and Economically Detected Using Hive Debris and Conventional PCR. *Insects* 12, 150. DOI: 10.3390/insects12020150

BOECKING, O., E. GENERSCH (2008): Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping. *J. Verbr. Lebensm.* 3, 221-228. DOI: 10.1007/s00003-008-0331-y

BONCRISTIANI, H., J. D. ELLIS, T. BUSTAMANTE, J. GRAHAM, C. JACK, C. B. KIMMEL, A. MORTENSEN, D. R. SCHMEHL (2020): World Honey Bee Health: The Global Distribution of Western Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Pest and Patogens. *Bee World* 98, 1-5. DOI: 10.1080/0005772X.2020.1800330

CALATAYUD, F., M. J. VERDU (1993): Hive debris counts in honeybee colonies: a method to estimate the size of small populations and rate of growth of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae). *Exp. App. Acarol.* 17, 889–894.

CHEN, Y., R. SIEDE (2007): Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.* 70, 33-80. DOI:10.1016/S0065-3527(07)70002-7

CHEN, Y., Y. ZHAO, J. HAMMOND, H. T. HSU, J. D. EVANS, M. FELDLAUFER (2004b): Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 87, 84-93. DOI: 10.1016/j.jip.2004.0

COMPLEY, R. T., P. GIOVENAZZO, S. H. JABAJI (2012): Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives. *Apidologie* 43, 753–760. DOI: 10.1007/s13592-012-0147-8

COPLEY, T., P. GIOVENAZZO, S. JABAJI (2012): Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives. *Apidologie* 43, 753- 760. DOI: 10.1007/s13592-012-0147-8ff

COSTA, C., G. TANNER, M. LODESANI, L. MAISTRELLO, P. NEUMANN (2011): Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. *J. Invertebr. Pathol.* 108, 224–225. DOI: 10.1016/j.jip.2011.08.012

DE JONG, D., D. DE ANDREA ROMA, L.S. GONCALVES (1982a): A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees. *Apidologie* 13, 297–306. DOI: 10.1051/apido:19820308.

ELLIS, J. D., R. HEPBURN, K. S. DELAPLANE, P. NEUMANN (2003): The effects of adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), on nests and flight activity of Cape and European honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 34, 399–408. DOI: 10.1051/apido:2003038

EVANS, J. D., R. S. SCHWARZ, Y. P. CHEN, G. BUDGE, R.S. CORNMAN, P. DE LA RUA, J. R. DE MIRANDA, S. FORET, L. FOSTER, L. GAUTHIER, E. GENERSCH, S. GISDER, A. JAROSCH, R. KUCHARSKI, D. LOPEZ, C. M. LUN, R. F. A. MORITZ, R. MALESZKA, I. MUÑOZ, M. A. PINTO (2013): Standard methodologies for molecular research in *Apis mellifera*. U: The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research (Dietemann V., J. D. Ellis, P. Neumann (ur.). *J. Apicul. Res.* 52, 4. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.11

EYER, M., Y. P. CHEN, M. O. SCHAFER, J. PETTIS, P. NEUMANN (2009): Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honeybee viruses. *Apidologie* 40, 419–428. DOI: 10.1051/apido:2008051

FAO (2020): Good beekeeping practices: Practical manual on how to identify and control the main diseases of the honeybee (*Apis mellifera*). TECA – Technologies and practices for small agricultural producers. DOI: 10.4060/ca9182en.

FORSGREN, E. (2009): European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S5-S9. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.016

FORSGREN, E., A. T. LAUGEN (2015): Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie* 45, 10–20. DOI: 10.1007/s13592-013-0225-6

GENERSCH, E. (2009): American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, Suppl 1:S10-9. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.015

GENERSCH, E., A. ASHIRALIEVA, I. FRIES (2005): Strain-and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7551–7555. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7551-7555.2005

HRISTOV, P., R. SHUMKOVA, N. PALOVA, B. NEOV (2020): Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Vet. Sci.* 7, 166. DOI:10.3390/vetsci7040166

KANE, T. R., C. M. FAUX (2021): *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. John Wiley and Sons, USA.

KAPITANOVIĆ, S., N. SLADE (2004): Real-time PCR (Metodološki tečajevi u biologiji i medicini). Ambriović Ristov, A. (ur.). Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

KIM, J. M., T. TRUONG, S.-M. KIM, B.-H. KIM, M.-J. KIM, B.-S. YOON (2018): Multi-Ultra-Rapid PCR against Viral Pathogens of Honeybee using Hive Debris. *Korean J Apicul.* 33, 135-147. DOI: 10.17519/apiculture.2018.09.33.3.135

KLATT, B. K., A. HOLZSCHUH, C. WESTPHAL, Y. CLOUGH, I. SMIT, E. PAWELZIK, T. TSCHARNTKE (2014): Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *The Royal Soc.* 281, 20132440. DOI: 10.1098/rspb.2013.2440

LEWKOWSKI, O., S. ERLER (2019): Virulence of *Melissococcus plutonius* and secondary invaders associated with European foulbrood disease of the honey bee. *Microbiol. Open* 8, e649. DOI: 10.1002/mbo3.649

LINDSTROM, A., I. FRIES (2005): Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Apic. Res.* 44, 82–86. DOI: 10.1080/00218839.2005.11101154

MARTIN, S. J., L. E. BRETTELL (2019): Deformed wing virus in honeybees and other insects. *Ann. Rev. Virol.* 6, 49–69. DOI: 10.1146/annurev-virology-092818

MARTIN, S. J., A. C. HIGHFIELD, L. BRETTEL, E. M. VILLALOBOS, G. E. BUDGE, M. POWELL, S. NIKAIDO, D. C. SCHROEDER (2012): Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science* 336, 1304-6. DOI: 10.1126/science.1220941

MICHALCZYK, M., R. SOKÓŁ, A. SZCZERBA-TUREK, A. BANCERZ-KISIEL (2011): A comparison of the effectiveness of the microscopic method and the multiplex PCR method in identifying and discriminating the species of *Nosema* spp. spores in worker bees (*Apis mellifera*) from winter hive debris. *Pol J Vet Sci* 14, 385-391. DOI:10.2478/v10181-011-0058-z

NEUMANN, P., J. D. EVANS, J. S. PETTIS, C. W. W. PIRK, M.O. SCHAFER, G. TANNER, J. D. ELLIS (2013): Standard methods for small hive beetle research. *J. Apic. Res.* 52, 1-32. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.19

NOEL, A., Y. LE CONTE, F. MONDET (2020): *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it?. *Emerg Top Life Sci.* 4, 45–57. DOI: 10.1042/ETLS20190125

OIE (2019): *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018.*, Section 3.2.

- OLDROYD, B. P. (1999): Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends Ecol. Evol.* 14, 312–315. DOI: 10.1016/s0169-5347(99)01613-4
- PETROVIĆ, T., D. VIDANOVIĆ, I. STOJANOV, D. LUPULOVIĆ, G. LAZIĆ, N. PLAVŠA, S. LAZIĆ (2013): First molecular detection of six honeybee viruses in Serbian apiaries. 10th International Symposium Modern Trends in Livestock Production, Belgrade, 2-4.
- PRISCO, G. D., D. ANNOSCIA, M. MARGIOTTA, R. FERRARA, P. VARRICCHIO, V. ZANNI, E. CAPRIO, F. NAZZI, F. PENNACCHIO (2016): A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 113, 3203-3208. DOI: 10.1073/pnas.1523515113
- RAMSEY, S. D., R. OCHOA, G. BAUCHAN, C. GULBRONSON, J. D. MOWERY, A. COHEN, D. LIM, J. JOKLIK, J. M. CICERO, J. D. ELLIS, D. HAWTHORNE, D. VAN ENGELSDORP (2019): *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 1792–1801. DOI: 10.1073/pnas.1818371116
- RITTER, W. (1981): Varroa disease of the honeybee *Apis mellifera*. *Bee World* 62, 141–153.
- ROBINSON, W. E., R. NOWOGRODZKI, R. A. MORSE (1989): The value of honeybees as pollinators of US crops. *Am. Bee J.* 129, 477-487.
- ROSSI, F., C. AMADORO, A. RUBERTO, L. RICCHIUTI (2018): Evaluation of Quantitative PCR (qPCR) *Paenibacillus larvae* Targeted Assays and Definition of Optimal Conditions for Its Detection/Quantification in Honey and Hive Debris. *Insects* 9, 165. DOI: 10.3390/insects9040165
- SCHAFFER, M. O., W. RITTER, J. PETTIS, P. NEUMANN (2010): Small hive beetles, *Aethina tumida*, are vectors of *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* 41, 14–20. DOI: 10.1051/apido/2009037
- SCHWARZ, R. S., G. R. BAUCHAN, C. A. MURPHY, J. RAVOET, D. C. DE GRAAF, J. D. EVANS (2015): Characterization of Two Species of *Trypanosomatidae* from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellicae* Langridge and McGhee and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp.. *J. Eukaryot. Microbiol.* 62, 567-583. DOI: 10.1111/jeu.12209

SCHWARZ, R. S., J. D. EVANS (2013): Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Dev. Comp. Immunol.* 40, 300–310. DOI: 10.1016/j.dci.2013.03.010

SHEN, M. Q., L. W. CUI, N. OSTIGUY, D. COX-FOSTER (2005): Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* 86, 2281–2289. DOI: 10.1099/vir.0.80824-0

SMITH, K. M., E. H. LOH, M. K. ROSTAL, C. M. ZAMBRANA-TORRELIO, L. MENDIOLA, P. DASZAK (2013): Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses. *EcoHealth* volume 10, 434–445. DOI: 10.1007/s10393-013-0870-2

SOKÓŁ, R., M. MICHALCZYK, M. RAŚ-NORYŃSKA (2009): Evaluation of winter hive debris in a commercial apiary. *Anim. Sci.* 46, 115-119.

SPURNY, R., A. PRIDAL, L. PALKOVA, H. F. TRAN KIEM, J. DE MIRANDA, P. PLEVKA (2017): Virion structure of Black Queen Cell Virus, a Common Honey Bee Pathogen. *J Virol.* 91(6): e02100-16. DOI: 10.1128/JVI.02100-16

STEVANOVIĆ, J., R. S. SCHWARZ, B. VEJNOVIĆ, J. D. EVANS, R. E. IRWIN, U. GLAVINIĆ, Z. STANIMIROVIĆ (2016): Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees, *J. Invertebr. Pathol.* 139, 6–11. DOI: 10.1016/j.jip.2016.07.001

SVEČNJAK, L., G. HEGIĆ, J. KEZIĆ, M. TURŠIĆ, M. M. DRAŽIĆ, D. BUBALO, N. KEZIĆ (2008): Stanje pčelarstva u Republici Hrvatskoj. *J. Cent. Eur. Agric.* 9, 475-482.

ŠIMENC, L., T. KNIFIC, I. TOPLAK (2021): The Comparison of Honeybee Viral Loads for Six Honeybee Viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV) in Healthy and Clinically Affected Honeybees with TaqMan Quantitative Real-Time RT-PCR Assays. *Viruses* 13, 1340. DOI: 10.3390/v13071340

ŠIMENC, L., U. KUCHAR, U. JAMNIKAR-CIGLENEČKI, I. TOPLAK (2020): First Complete Genome of Lake Sinai Virus Lineage 3 and Genetic Diversity of Lake Sinai Virus

Strains From Honey Bees and BumbleBees. J. Econ. Entomol. 113, 1055–1061. DOI: 10.1093/jee/toaa049

TANTILLO, G., M. BOTTARO, A. DI PINTO, V. MARTELLA, P. DI PINTO, V. TERIO (2015): Virus Infections of Honeybees *Apis Mellifera*. Ital. J. Food Saf. 4, 5364. DOI: 10.4081/ijfs.2015.5364

TLAK GAJGER, I. (2015): Mali kornjaš košnice (*Aethina tumida*) - biologija i kontrolne mjere. Vet. Stn. 46, 1-8.

TLAK GAJGER, I. (2019): Bolesti pčela u suvremenoj proizvodnji. Sveučilišni udžbenik. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

TLAK GAJGER, I. (2020): Veterinarska medicina u području pčelarstva. Hrvatski veterinarski vjesnik 28, 44-51.

TLAK GAJGER, I., O. VUGREK, D. GRILEC, Z. PETRINEC (2010): Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. Veterinarni Medicina 55, 457–462.

TLAK GAJGER, I., Z. PETRINEC (2009): Rana dijagnostika američke gnjiloće pčelinjeg legla. Zbornik radova 5. međunarodnog pčelarskog sajma. Čauš T., Kin I. (ur.). Bjelovar: Bjelovarski sajam, str. 32-39.

TLAK GAJGER, I. (2015): Značenje i prisutnost bolesti pčela koje se u Republici Hrvatskoj suzbijaju prema zakonskim propisima. 11. Međunarodni pčelarski sajam i znanstveno-stručni skup. U: Tomljanović, Z., Tlak Gajger, I. (ur.). Bjelovar: Bjelovarski sajam, 2015. str. 35-36.

TOMLJANOVIĆ, Z., D. CVITKOVIĆ, S. PAŠIĆ, B. VOLAREVIĆ, I. TLAK GAJGER (2020): Production, practices and attitudes of beekeepers in Croatia. Vet. Arh. 90, 413-427. DOI: 10.24099/vet.arhiv.0909

VAN ENGELSDORP, D., J. HAYES, R. M. UNDERWOOD, J. PETTIS (2008): A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008. PLoS One 3, e4071. DOI: 10.1371/journal.pone.0004071

VAN ENGELSDORP, D., M. D. MEIXNER (2010): A Historical Review of Managed Honey Bee Populations in Europe and the United States and the Factors that May Affect Them. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S80-S95. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.011

VAN ENGELSDORP, D., R. M. UNDERWOOD, D. CARON, J. HAYES (2007): An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *Am. Bee J.* 147, 599-603.

WARD, L., M. BROWN, P. NEUMANN, S. WILKINS, J. PETTIS, N. BONHAM (2007): A DNA method for screening hive debris for the presence of small hive beetle (*Aethina tumida*). *Apidologie* 38, 272–280. DOI: 10.1051/apido:2007004

WHITE, G. F. (1913): Sacbrood, a Disease of Bees. US Department of Agriculture. Bureau of Entomology, Circular 169, 1-5.

WILFERT, L., G. LONG, H. C. LEGGETT, P. SCHMID-HEMPEL, R. BUTLIN, S. J. M. MARTIN, M. BOOTS (2016): Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by Varroa mites. *Science* 351, 594–597. DOI: 10.1126/science.aac9976

WILLIAMS, M.-K. F., A. D. TRIPODI, A. L. SZALANSKI (2019): Molecular survey for the honey bee (*Apis mellifera* L.) trypanosome parasites *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. *J Apic. Res* 58, 553-558. DOI: 10.1080/00218839.2019.1568956

XU, G. E. PALMER-YOUNG, K. SKYRM, T. DALY, M. SYLVIA, A. AVERILL, S. RICH (2018): Triplex real-time PCR for detection of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in honey bees. *Parasit Res* 117, 623–628.

YUE, D., M. NORDFOFF, L. H. WIELER, E. GENERSCH (2008): Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 10, 1612–1620. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01579.x

8. SAŽETAK

Bolesti pčela su jedan od najznačajnijih i najčešćih uzroka slabljenja i ugibanja pčelinjih zajednica. Rana dijagnostika kod subkliničkih infekcija uzročnicima bolesti pčelinje zajednice prioritet je za pravodobnu primjenu preventivnih i kontrolnih mjera u pčelarskoj praksi. Uzorkovanje ostataka s podnica košnica je jednostavna, neinvazivna i jeftina metoda, a pretraživanjem tih uzoraka pomoću molekularnih metoda PCR i qPCR testova može se brzo i pouzdano utvrditi prisutnost različitih uzročnika bolesti pčelinjih zajednica. Ovim radom su po prvi puta pretraženi uzorci zimskih ostataka s podnica košnica skupljeni na pčelinjacima u kontinentalnom djelu Republike Hrvatske primjenom PCR i qPCR metoda. Dobiveni rezultati laboratorijskog pretraživanja su analizirani i uspoređeni sa zdravstvenim stanjem i jačinom pčelinjih zajednica u proljeće. Potvrđeno je da se iz uzoraka ostataka s podnice košnice može pouzdano utvrditi i kvantificirati *P. larvae*, *Nosema* spp., virus akutne pčelinje paralize, virus crnih matičnjaka, virus izobličjenih krila i virus mješinstog legla. Utvrđeno je da su pretražene pčelinje zajednice bile istodobno inficirane ili invadirane s prosječno četiri do šest uzročnika bolesti, te da su pojedine pčelinje zajednice u proljeće razvile kliničke znakove bolesti, a pojedine nisu preživjele zimu.

Ključne riječi: pčelinja zajednica, uzorci zimskih ostataka s podnice košnica, PCR/qPCR, *Nosema* spp., *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Crithidia mellificae*, *Lotmaria passim*, virus akutne pčelinje paralize, virus mješinstog legla, virus izobličjenih krila, virus crnih matičnjaka, *Aethina tumida*, *Varroa destructor*

9. SUMMARY

SIGNIFICANCE OF DIAGNOSTIC ANALYSES OF WINTER HIVE DEBRIS FOR THE HONEYBEE HEALTH CONDITION (*Apis mellifera*)

Honey bee diseases are one of the most significant and most common causes of bees weakness and death of the colonies. An early diagnosis of subclinical pathogens that cause diseases for performing precautionary and control measures. Sampling debris from beehive bottom boards is a simple, non-invasive and cheap method. By analysing these samples with molecular methods, PCR and qPCR tests, you can quickly and reliably determine the presence of various disease causing agents in the honey bee colony. In this thesis for the first time, samples from winter debris from the beehive bottom boards gathered from apiaries in the continental part of Croatia have been analysed by using the PCR and qPCR tests. Obtained laboratory results have been analysed and compared to the health condition and strength of honey bee colonies in spring. It has been confirmed that from the samples gathered from the beehive floors, we can reliably determine the presence and quantity of *P. larvae*, *Nosema* spp., Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Deformed Wing Virus (DWV) and Sacbrood Virus (SBV). Observed honey bee colonies have been found to be infected or invaded at the same time, with an average of 4 to 6 disease carrying agents, and some of them have developed symptoms, while some didn't survive the winter at all.

Key words: honey bee colony, samples from winter hive debris, PCR/qPCR, *Nosema* spp., *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Crithidia mellificae*, *Lotmaria passim*, Acute Bee Paralysis Virus, Black Queen Cell Virus, Deformed Wing Virus and Sacbrood Virus, *Aethina tumida*, *Varroa destructor*

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 04. srpnja 1995. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole upisala sam Nadbiskupsku klasičnu gimnaziju u Zagrebu gdje sam maturirala 2014. godine. Iste godine počela sam studirati na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Praksu sam odradila tijekom Erasmus+ studentske prakse na Veterinarskom fakultetu u Ljubljani gdje smo molekularnim metodama analizirali sve uzorke za potrebe ovoga rada. Tijekom svoje absolventske godine odradila sam drugu Erasmus+ studentsku praksu na Politehničkom institutu u Braganci (Portugal) gdje sam sudjelovala u molekularnim istraživanjima virusnih uzročnika pčelinjih zajednica.