

# UČINAK DEZINFICIJENSA NA BAKTERIJU PAENIBACILLUS LARVAE U LABORATORIJSKIM UVJETIMA

---

Tomljanović, Zlatko

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:178:079053>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

Zlatko Tomljanović

**UČINAK DEZINFICIJENSA NA BAKTERIJU  
*PAENIBACILLUS LARVAE* U  
LABORATORIJSKIM UVJETIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Zlatko Tomljanović

**EFFECT OF DISINFECTANTS ON  
BACTERIA *PAENIBACILLUS LARVAE*  
UNDER LABORATORY CONDITIONS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

ZLATKO TOMLJANOVIĆ

**UČINAK DEZINFICIJENSA NA BAKTERIJU  
*PAENIBACILLUS LARVAE* U  
LABORATORIJSKIM UVJETIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:  
Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger  
Dr. sc. Josipa Vlainić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Zlatko Tomljanović

**EFFECT OF DISINFECTANTS ON  
BACTERIA *PAENIBACILLUS LARVAE*  
UNDER LABORATORY CONDITIONS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:  
Prof. Ivana Tlak Gajger, PhD, DVM  
Josipa Vlainić, PhD, DVM

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Zlatko Tomljanović, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima od onih navedenih u radu.

---

(potpis studenta)

Zagreb, 2022.

***Doktorski rad je izrađen u:***

*Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela  
Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

*Laboratoriju za naprednu genomiku  
Zavoda za molekularnu medicinu  
Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu*

***Voditeljice: Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger  
Dr. sc. Josipa Vlanić***

**Sveučilište u Zagrebu**

**Veterinarski fakultet**

**Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela**

**Predstojnik Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela:**

Prof. dr. sc. Emil Gjurčević

**Mentorice:**

Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Dr. sc. Josipa Vlainić

**Povjerenstvo za ocjenu doktorskog rada:**

Prof. dr. sc. Kristina Matković

Izv. prof. dr. sc. Jelena Šuran

Prof. dr. sc. Nada Oršolić

**Povjerenstvo za obranu doktorskog rada:**

Prof. dr. sc. Kristina Matković

Izv. prof. dr. sc. Jelena Šuran

Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Doc. dr. sc. Krešimir Matković (zamjena)



*Doktorski rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, polja Veterinarska medicina, grane Animalna proizvodnja i biotehnologija.*

*Doktorski rad je obranjen dana 01.veljače 2022. godine u Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

## **ZAHVALE**

*Zahvaljujem mentoricama prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger i dr. sc. Josipi Vlainić što nisu dozvolile da se nada o izradi i završetku doktorskog rada pretvori u iluziju. Njihove ideje tijekom istraživanja, savjeti i pomoć tijekom izbora teme i izrade doktorskog rada su trajno utkani u osjećaj moje duboke zahvalnosti prema njihovom trudu, energiji i radnoj disciplini. Stoga još jednom hvala što ste imale beskrajno strpljenje voditi me kroz znanstvene meandre.*

*Zahvaljujem Upravi za stručnu podršku razvoju poljoprivrede pri Ministarstvu poljoprivrede Republike Hrvatske na pomoći u sufinanciranju mojeg doktorskog studija.*

*Zahvaljujem kolegama iz Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italija, dr. sc. Franco Mutinelli i dr. sc. Anna Granato za tehničku pomoć i savjetovanje pri analiziranju rezultata genotipizacije bakterije *Paenibacillus larvae*.*

*Također, zahvaljujem kolegici asist. dr. sc. Metki Pislak Ocepek s Inštituta za patologiju, divjad, ribe i čebele Veterinarskog fakulteta Univerze u Ljubljani na pomoći pri nabavi sojeva pojedinih genotipova *Paenibacillus larvae*.*

*Moja zahvala ide i Gordani Husinec, veterinarskoj tehničarki i laborantici u Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta u Zagrebu na pomoći pri laboratorijskom radu.*

*Naposljetku, zahvaljujem neregistriranoj udruzi građana „LIKES – V“ koju čine moja mama Vesna, supruga Sofija, lavica Ema i tigrovi Lucas, Ivan i Krsto na pomoći, strpljenju, podršci, ali i njihovoj snazi, energiji i dobrim vibrama koje su beskonačno usmjeravali na mene, olakšavajući mi put u znanstvene visine. Bez Vas to ne bi bilo moguće.*

## SAŽETAK

### UČINAK DEZINFICIJENSA NA BAKTERIJU *PAENIBACILLUS LARVAE* U LABORATORIJSKIM UVJETIMA

Američka gnjiloća medonosne pčele (AGMP) je zarazna bolest nepoklopljenog i poklopljenog pčelinjeg legla koja pčelarstvu nanosi višestruke štete. Uzročnik bolesti je bakterija *Paenibacillus larvae* koja u nepovoljnim životnim uvjetima tvori dugo živuće i otporne spore. Patogeneza, klinička slika i stupanj virulentnosti kod AGMP ovise o genotipu bakterije *P. larvae*. Dosad je utvrđeno pet genotipova *P. larvae* (ERIC I, ERIC II, ERIC III, ERIC IV, ERIC V) koji se međusobno razlikuju u morfologiji, biokemijskim čimbenicima, virulenciji te čimbenicima koji utječu na virulenciju. Poznavanje raširenosti i dinamike pojavnosti pojedinih genotipova *P. larvae* na određenom području pruža uvid u patofiziološke procese na razini ličinke / pčelinje zajednice te utječe na procjenu rizika od AGMP jer postoji značajna korelacija između genotipa i pojavnosti vidljivih kliničkih znakova. Tvrdokoran tijek bolesti, otpornost uzročnika, poteškoće u kliničkoj dijagnostici i suzbijanju učinili su AGMP jednom od najtežih u svijetu. Bolesne pčelinje zajednice bez provedbe posebnih mjera ne mogu ozdraviti, a primjena antibiotika u liječenju bolesti nije dozvoljena zbog moguće pojave rezidua u pčelinjim proizvodima, rezistencije uzročnika te spoznaje da antibiotici djeluju samo na vegetativne oblike bakterije *P. larvae*, a ne uništavaju spore što doprinosi horizontalnom širenju bolesti u pčelinjacima. Ponekad je bolesnu pčelinju zajednicu najbolje sanirati spaljivanjem zajedno s košnicom i onečišćenim priborom. Nakon provedenih sanacijskih mjera nužno je primjeniti učinkovitu završnu dezinfekciju opreme, pribora i pčelinjaka čiji uspjeh ovisi o izboru dezinficijensa, preporučenoj koncentraciji radnih otopina, načinu i dužini trajanja aplikacije, vrsti mikroorganizama koji se moraju ukloniti te površini/materijalu koji se dezinficira. Cilj ovog istraživanja bila je provedba genotipizacije bakterije *P. larvae* na pedeset terenskih izolata izdvojenih iz karakteristično promijenjenih uginulih pčelinjih ličinki skupljenih u razdoblju od jedanaest godina (2010. – 2020.), te tako utvrditi raširenost i učestalost određenih genotipova u Republici Hrvatskoj (RH). Također, cilj je bio i utvrđivanje učinka deset komercijalno dostupnih i uobičajeno korištenih dezinficijensa u pčelarstvu, na terenske i certificirane sojeve bakterije *P. larvae*, u laboratorijskim uvjetima te uspoređivanje dobivenih rezultata među pojedinim genotipovima bakterije *P. larvae*. Genotip ERIC I bakterije *P. larvae* utvrđen je u pčelinjim zajednicama na području RH u visokoj prevalenciji od 90,3 %, a genotip ERIC II u niskoj prevalenciji od 7,3 % od ukupno uspješno analiziranih terenskih

izolata. Za jedan izolat postavljena je sumnja na genotip ERIC IV s prevalencijom od 2,4 % te je potrebna daljnja verifikacija takvog nalaza. Istraživani su učinci Genoxa, Genolla s pjenom, Ecocid S, Sekusept aktiv, Incidin OxyFoam S, Bee Protect H forte, Bee Protect F, Despadac, Despadac Secure i EM® PROBIOTIK ZA PČELE u testu stvaranja zone inhibicije, suspenzijskom testu učinka na vijabilne bakterije *P. larvae*, testu dezinficijskog djelovanja na površinama i suspenzijskom testu učinka na spore bakterije *P. larvae*. Učinak dezinficijensa Genoxa na bakteriju *P.larvae* nije pokazao poželjan sporocidni profil zbog predugog vremena koje je potrebno da bi se ostvario sporocidni učinak te je isti limitiran dok proizvod Genoll s pjenom nije uopće pokazao sporocidno djelovanje. Proizvodi iz linije Despadac u suspenzijskom testu i u testu na površinama pokazali su baktericidno djelovanje, ali sporocidni učinak nije zadovoljavajući zbog slabijeg učinka u kontaktnom vremenu od 30 minuta. Suspenzijskim testom nije utvrđen zadovoljavajući sporocidni učinak Bee protect proizvoda, a proizvod EM® PROBIOTIK ZA PČELE nije pokazao u testu agar gel difuzije značajan baktericidni učinak. Sekusept aktiv u 2% koncentraciji i Incidin OxyFoam S u suspenzijskom testu sporocidnog djelovanja pokazali su zadovoljavajući sporocidni učinak na sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I do ERIC IV).

**Ključne riječi:** američka gnjiloća medonosne pčele, *Paenibacillus larvae*, genotipizacija, dezinficijensi

## EXTENDED ABSTRACT

### EFFECT OF DISINFECTANTS ON BACTERIA *PAENIBACILLUS LARVAE* UNDER LABORATORY CONDITIONS

#### INTRODUCTION

American foulbrood (AFB) is a contagious disease of sealed and unsealed honeybee brood that causes multiple damage to beekeeping. The causative agent of the disease is the bacterium *Paenibacillus larvae*, which in unfavorable life conditions forms long-lived and resistant spores. The infectious forms of *P. larvae* are spores, and susceptible to infection are honeybee larvae at the age when they are taking food. It takes only ten spores to infect one honeybee larvae younger than one day, but with the time passing by, susceptibility decreases and more than ten million spores are needed to infect a larva between four and five days old. Moreover, the number of spores required to cause infection in the later stages of honeybee larvae development is so high that a naturally infection is not possible. One dead larva can contain up to 2.5 billion newly created infectious spores. The pathogenesis, clinical signs, and degree of virulence in AFB depend on the *P. larvae* genotype. Recently, five genotypes of *P. larvae* (ERIC I, ERIC II, ERIC III, ERIC IV, ERIC V) have been identified, which differ in morphology, biochemical parameters, virulence, and factors influencing virulence. The virulence of *P. larvae* is conditioned by the possibility of infecting the honeybee larva and the time required until the death of the infected larva. The formation of a large amount of long-lived and resistant spores, together with the possibility of multiplication and development of vegetative forms of the bacterium allows a high probability of *P. larvae* infection. The analysis of pathogenicity or virulence showed significant differences between genotypes ERIC I to ERIC V. The ERIC I genotype of *P. larvae* takes 12 days to cause death of all infected larvae ( $LT_{100} = 12$  days), while the genotypes ERIC II to ERIC IV take only seven days. Therefore, according to the rate of larval death, these *P. larvae* genotypes are classified into three groups: ERIC I - slow leads to death of infected honeybee larvae, ERIC II - moderately fast leads to death of infected larvae, and ERIC III to ERIC V - are genotypes of pathogens that quickly lead to the death of the infected larva. The  $LT_{100}$  results for genotype ERIC II indicated that all infected larvae would die before the brood cells could be sealed. In this way, the adult honeybee workers have enough time to perform their hygienic skills, removing the dead larvae from brood

cells. At the same time, the process of creating spores at the level of the honey bee colony would be disrupted, contributing to slow down the spread and development of the disease. However, the ERIC I genotype is less virulent at the level of a single larva because infected larvae die after sealing the cells. Consequently, the removal of dead larvae is reduced in such cases, and the possibility of producing and spreading the causative spores is significantly increased. Ultimately, genotype ERIC I is highly virulent for the honeybee colony leading to its rapid decline when compared to ERIC II which shows lower virulence at the honeybee colony level and slower decline of honeybee colony thereby showing a negative correlation of *P. larvae* virulence at the larval level, and consequently at the honeybee colony level. The knowledge of the distribution and dynamics of occurrence of individual *P. larvae* genotypes in a given area provides insight into pathophysiological processes at the level of the larva or honeybee colony and influences the risk assessment of AFB once there is a significant correlation between genotype and clinical signs. Vegetative rods of *P. larvae* have long, peritrichous arranged cilia that allow active movement in the form of a swarm motility. It was found that the *P. larvae* ERIC II genotype can move superficially in the form of a swarm and form a free-floating biofilm, while the *P. larvae* ERIC I genotype can form a biofilm but cannot move in the form of a swarm. These facts, that *P. larvae* is able to produce biofilm and actively move in the form of a swarm, requires new approaches in diagnostic and disinfection measures. The persistent course of the disease, resistance of pathogens, difficulties in clinical diagnosis and control, have made AFB one of the most difficult honeybee disease in the world. Infected honeybee colonies can hardly recover without implementation of special measures. The use of antibiotics in the treatment of diseases is prohibited due to the appearance of residues in honeybee products, resistance of the pathogen and the knowledge that antibiotics act only on vegetative forms of *P. larvae*, thereby providing horizontal spread of disease in apiaries. Most of the times, the best way to sanitize an infected honeybee colony it's by burning it together with the hive and hive tools.

During and after the implementation of eradication measures, it is necessary to carry out final disinfection, which success depends on the choice of effective disinfectant, recommended concentration of solutions, method and duration of application, type of microorganisms to be removed, surfaces and material to be disinfected. From the epizootiological point of view, disinfection can be preventive or focal. Preventive disinfection includes procedures and measures when infectious disease is not present in the apiary or its immediate surroundings. It is regularly carried out within the guidelines of good beekeeping practice and is an integral part of normal hygiene in the apiary. Keeping beehives, equipment, hive tools, food and water for

bees clean is the basis of preventive disinfection. Focal disinfection is carried out when an infectious disease is present in the apiary and aims to remove microorganisms from the foci of infection, thus preventing its further spread. Depending on the method of execution, it can be continuous and final. Continuous disinfection involves systematic and repetitive procedures from the moment of the outbreak of infection in the apiary. It can be combined with veterinary administrative measures to cure diseases, such as burning bee colonies. The final disinfection has been considered as a one-step procedure after the implemented measures of disease remediation. Disinfection is often carried out by mechanical, physical and chemical procedures. Mechanical processes, such as cleaning, scraping, and washing, remove impurities and organic matter in which microorganisms are incorporated, thus facilitating the disinfection process. It has been observed that many disinfectants are ineffective in the presence of impurities and organic matter. Cleaning agents - detergents, soaps and abrasive powders - reduce the number of microorganisms, removing them from surfaces and objects. Physical disinfection procedures involve the use of moist or dry heat and radiation, where moist heat acts faster in a shorter period of time and is more efficient compared to dry heat. Burning hives, honeybee colonies and other accessories equipment and tools is an effective way of sanitation of AFB. Although the scorching process completely destroys the *P. larvae* spores on the surface of wooden hives, a significant number of infectious spores still remain active in internal wood structures. The wood fibers behave like organic matter which, already in a concentration of 2 %, significantly reduces the effect of surface disinfection. Boiling in water under normal pressure for thirty minutes with the addition of 1 to 2 % sodium carbonate or boiling in water under pressure for twenty minutes successfully destroys *P. larvae* spores in the internal wood structures. Chemical disinfection processes include the use of various disinfectants whose choice depends on the spectrum of the microorganism to be destroyed, the presence of organic matter on the surface, environmental conditions, and the toxicity of the disinfectant to humans, animals, and the environment. The aldehydes, halogen compounds and oxidants show an effect on bacterial endospores while inorganic acids, alkaline salts and phenols have a limited effect. High and rapid sporocidal activity of glutaraldehyde, sodium hypochlorite and caustic soda on *P. larvae* spores was found. The aim of this study was to implement genotyping of *P. larvae* on fifty field samples isolated from characteristically altered dead honeybee larvae over a period of eleven years (2010-2020), and thus determine the prevalence and frequency of certain genotypes in the Republic of Croatia. The effect of ten commercially available and commonly used disinfectants in beekeeping, together with certified strains of *P. larvae*, under laboratory

conditions was also determined. The ultimate goal was to perform the comparison of the results obtained on the effect of tested disinfectants with individual genotypes of *P. larvae*.

## MATERIAL AND METHODS

The *P. larvae* bacteria used in the study came from two sources. One was a validated strain (German Collection of Microorganism and Cell Culture - DSMZ; Braunschweig, Germany) of which four genotypes were used (DSM 7030 (ERIC I), DSM 25430a (ERIC II), LMG 16252 (ERIC III) and LMG 16247 (ERIC IV)). For an additional verification of the obtained results, genotyped strains collected in the Republic of Croatia for several years were used. The *P. larvae* strains were cultured on Columbia sheep blood agar (BD), and for liquid culture, *P. larvae* strains were grown in brain heart infusion medium (BHIM).

For the genotyping study, the primers ERIC1R and ERIC2 were used, and the method of repetitive extragenic palindromic sequence-PCR (REP-PCR) was performed to determine which genotype our samples belonged to. The isolation of genomic DNA was performed with a commercial QIAamp Mini DNA blood and tissue kit according to the manufacturer's instructions, with special preparation of bacteria for isolation.

The commercially disinfectants were selected based on the recommendations of producers and beekeepers, as well as their availability on the market. The following disinfectants were used: Bee Protect products (Bee Protect H forte and Bee Protect F), Genox, Genoll with foam, Despadac, Despadac Secure, Ecocid S, Sekusep aktiv, Incidin Oxyfoam S and EM® probiotic for bees. Selected products were tested by 1) determining the zone of inhibition in agar diffusion test, 2) suspension test for viable bacteria, 3) surface disinfectant test, and 4) sporocidal effect in suspension test for all four genotypes of *P. larvae* (ERIC I to ERIC IV).

## RESULTS

The research and sampling on apiaries in the Republic of Croatia during the period from 2010 to 2020, of the total successfully analyzed *P. larvae* samples (n = 41), most belonged to the ERIC I genotype (90.3 %), while only three samples belonged to genotype ERIC II (7.3 %). Nine samples were not suitable for interpretation. The finding of one sample suspected to be of ERIC IV genotype (2.4%) would need further verification, especially from the point of view that ERIC III and ERIC IV genotypes have not been isolated from field samples for decades and are present only in archived collections of bacterial cultures. Since there is no anamnestic data, it can be assumed that the beekeeper used old equipment, wax, honey and / or food additives of unknown origin. The extremely high proportion of isolates belonging to the ERIC



I genotype can be explained by the lack of systematic monitoring on AFB such as regular clinical examinations before moving bees on honey pasture, or early diagnosis thereby examining honey, adult bees or hive debris from the bottom board for *P. larvae* spores. Moreover, the subject samples were taken from honeybee colonies where beekeepers and veterinarians had already raised the suspicion of AFB based on typical clinical signs. This correlates with the comprehension that the ERIC I genotype is less virulent at the level of a single larva, so infected honeybee larvae die after sealing cells and clinical signs of disease can be clearly seen because workers have not removed the dead larvae. Therefore, it is a logical recommendation to develop a new model for monitoring honeybee colonies on AFB in the Republic of Croatia, which would include active and passive monitoring and early diagnosis of AFB as an act of determining honeybee colonies germ carriers or reservoirs of disease, as well as prevention of disease in apiaries.

The suspension test showed a significant effect of undiluted Genox after 15 minutes of application depending on the duration of exposure, while in the test of disinfectant the effect on surfaces was seen after 30 minutes and was not dependent on further prolongation of contact time. Genoll with foam didn't show sporocidal effect while Genox disinfectant at a concentration of 10% reduced the number of spores by 1 logarithm, reaching a reducing of three logarithms in 30 and 60 minutes when 100% concentration was used. The observed effect of Genox disinfectant on *P. larvae* didn't show a desirable sporocidal profile due to the too long time required to achieve a sporocidal effect. In the suspension test and in the surface test, Incidin OxyFoam S showed antimicrobial activity on vegetative forms of *P. larvae* after only one minute, and sporocidal action at the level of reduction of 6 logarithms after 30 minutes of contact time. The tested effect of the disinfectant Incidin OxyFoam S on *P. larvae* showed a satisfactory sporocidal effect on all four genotypes of *P. larvae* (ERIC I to ERIC IV). The products from the Despadac line showed bactericidal activity in the suspension test and in the surface test, but the sporocidal effect was not satisfactory due to the poorer effect in the contact time of 30 minutes. The bactericidal effect of Ecocid S and Sekusept aktiv on *P. larvae* was determined by agar gel diffusion test and suspension test. The ATP bioluminescence test in the surface test of Ecocid S and Sekusept aktiv showed a bactericidal effect whereas Sekusept aktiv showed a desirable sporocidal effect in the suspension test at a concentration of 2% on all four genotypes of *P. larvae* (ERIC I to ERIC IV). The Bee protect products showed in the agar diffusion test a bactericidal effect on *P. larvae*. In the suspension test for viable bacteria, the bactericidal effect for Bee protect H forte was determined, while in the test of action on surfaces, Bee protect products didn't show any bactericidal effect on *P. larvae*. The suspension test didn't

show any sporocidal effect of Bee protect products. The EM probiotic product for bees didn't show significant bactericidal effect in the agar gel diffusion test.

## DISCUSSION

In our research on apiaries in the Republic of Croatia in the period from 2010 to 2020, most field isolates belonged to the ERIC I genotype (90.3%), while only three isolates belonged to the ERIC II genotype (7.3%). In one isolate of *P. larvae*, the ERIC IV genotype (2.4%) was suspected and further verification of such a finding is required. The extremely high proportion of *P. larvae* isolates belonging to the ERIC I genotype can be explained by the lack of systematic monitoring for the presence of AFB in apiaries.

Sodium hypochlorite (NaOCl) is a frequently used disinfectant and its effectiveness depends on the concentration of available chlorine and the pH of the solution. Genox and Genoll show an inhibitory effect on vegetative forms of *P. larvae*, but the effect of Genox after 60 minutes is slightly attenuated, which may be related to the fact that all biocides that have chlorine as an active component have time-limited effects due to its consumption during exposure to environmental factors. Hydrogen peroxide leads to the oxidation of lipids and proteins of the outer layer of the bacterial cell. The sporocidal action of Incidin OxyFoam S was determined at the level of reduction by six logarithms after 30 minutes of contact. Previous studies performed with hydrogen peroxide did not include a combination with other substances, or even auxiliary substances, which results in differences from our study. Quaternary ammonium salts have been in use for many years in disinfection. Products from the Despadac line (Despadac and Despadac Secure) showed bactericidal activity during exposure for 30 minutes, after which there was a reduction in the number of germinating spores of *P. larvae*, but only by one or two logarithms. Such a result in disinfection conditions is not satisfactory, but the use of Despadac products in sanitation can be considered. Peracetic acid is considered a potent biocide, even at low concentrations in the presence of organic residues, and is degraded to non-toxic substances. The action of peracetic acid as a disinfectant is not dependent on ambient temperature. Studies have shown that the effectiveness of peracetic acid varies depending on whether the microorganisms are in suspension or on the surface, which was not the case in our study during the study Sekusept Aktiv and Ecocida S. The Bee protect products caused a certain effect that increased with the time of exposure of bacteria to disinfectant. However, this effect did not meet the set standards and Bee protect products can't be recommended for use in the final disinfection of equipment, utensils and apiaries after remediation of clinically visible AFB. The effective microorganisms are used in agriculture,

forestry, livestock, aquaculture, beekeeping, environmental protection and medicine. The inhibitory effect of the bee food supplement EM® PROBIOTIC FOR BEES on reducing the number of *P. larvae* bacteria was minimal and therefore this product can't be considered a classic disinfectant or biocide in the true sense of the word. However, the action of effective microorganisms in a living organism has been proven many times.

## CONCLUSION

The effective application of control measures and proper application of final disinfection can reduce the appearance of a visible clinical signs of AFB whereas methods of early diagnosis can significantly reduce the incidence of the disease.

**Keywords:** American foulbrood, *Paenibacillus larvae*, genotyping, disinfectants

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA .....	5
2.1. POVIJESNI PODACI .....	5
2.2. RAŠIRENOST AMERIČKE GNJILOĆE MEDONOSNE PČELE.....	5
2.3. AMERIČKA GNJILOĆA MEDONOSNE PČELE .....	6
2.3.1. ETIOLOGIJA.....	6
2.3.1.1. Genotipovi bakterije <i>P. larvae</i> .....	7
2.3.1.2. Građa i struktura spora roda <i>Paenibacillus</i> .....	7
2.3.1.3. Klijanje spora iz roda <i>Paenibacillus</i> .....	9
2.3.1.4. Morfologija kolonija <i>P. larvae</i> .....	11
2.3.1.5. Biokemijske osobitosti <i>P. larvae</i> .....	11
2.3.1.6. Površinska pokretljivost <i>P. larvae</i> u obliku roja („swarming motility“) i tvorba biofilma .....	12
2.3.1.7. Virulencija bakterije <i>P. larvae</i> .....	13
2.3.2. EPIZOOTIOLOGIJA.....	14
2.3.3. PATOGENEZA .....	16
2.3.4. KLINIČKA SLIKA.....	19
2.3.5. DIJAGNOSTIKA.....	21
2.3.6. SANACIJA I ISKORJENJIVANJE.....	23
2.4. DEZINFEKCIJA - STERILIZACIJA U PČELARSTVU .....	26
2.4.1. MEHANIZMI DJELOVANJA DEZINFICIJENSA .....	27
2.4.2. METODE DEZINFEKCIJE .....	28
2.4.3. DEZINFICIJENSI.....	33
2.4.3.1. Ecocid S.....	33
2.4.3.2. Sekusept aktiv .....	34
2.4.3.3. Incidin Oxyfoam S .....	35
2.4.3.4. Despadac proizvodi .....	35
2.4.3.5. Genox i Genoll s pjenom.....	36
2.4.3.6. Bee protect proizvodi .....	36
2.4.3.7. EM® PROBIOTIK ZA PČELE .....	37
3. OBRAZLOŽENJE TEME .....	38
4. MATERIJAL I METODE.....	39
4.1. IZBOR I UZGOJ MIKROORGANIZAMA .....	39
4.2. GENOTIPIZACIJA .....	42

4.2.1.	IZOLACIJA GENOMSKE DNK .....	43
4.2.2.	LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM .....	44
4.3.	ISPITIVANJE UČINKA DEZINFICIJENSA .....	44
4.3.1.	ODABRANI DEZINFICIJENSI.....	44
4.3.2.	AGAR DIFUZIJA.....	45
4.4.	SPOROCIDNI UČINAK DEZINFICIJENSA.....	46
4.4.1.	PRIPREMA SPORA <i>P. LARVAE</i> ZA ISPITIVANJE SPOROCIDNOG DJELOVANJA DEZINFICIJENSA.....	46
4.4.2.	ODREĐIVANJE DJELOVANJA DEZINFICIJENSA NA SPORE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	46
4.5.	ENSURE LUMINOMETAR .....	48
4.5.1.	ODREĐIVANJE KOLIČINE ATP-A .....	49
4.5.2.	TEST DJELOVANJA DEZINFICIJENSA NA POVRŠINI.....	50
4.6.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	50
5.	REZULTATI.....	52
5.1.	GENOTIPIZACIJA TERENSKIH IZOLATA BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	52
5.2.	DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI NA BAZI GLUTARALDEHIDA U KOMBINACIJI S FORMALDEHIDOM.....	56
5.2.1.	REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE .....	56
5.2.2.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	56
5.2.3.	TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA.....	58
5.2.4.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	59
5.3.	DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI NA BAZI AKTIVNOG KISIKA.....	61
5.3.1.	REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE .....	61
5.3.2.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	62
5.3.3.	TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA.....	63
5.3.4.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	64
5.4.	DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI NA BAZI VODIKOVOG PEROKSIDA.....	65
5.4.1.	REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE .....	65
5.4.2.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> ....	66
5.4.3.	TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA.....	67
5.4.4.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	68
5.5.	DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI NA BAZI HIPOKLORITNE KISELINE .....	69
5.5.1.	REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE .....	69
5.5.2.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	70
5.5.3.	TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA.....	71
5.5.4.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	72

5.6.	DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI LINIJE BEE PROTECT .....	73
5.6.1.	REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE .....	73
5.6.2.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	74
5.6.3.	TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA.....	75
5.6.4.	SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	76
5.7.	DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI LINIJE EFEKTIVNI MIKROORGANIZMI.....	76
5.7.1.	REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE .....	76
5.8.	DJELOVANJE DEZINFICIJENSA NA TERENSKJE IZOLATE BAKTERIJE <i>P. LARVAE</i> .....	77
6.	RASPRAVA .....	79
7.	ZAKLJUČCI.....	89
8.	LITERATURA.....	90
9.	PRILOZI .....	118
10.	ŽIVOTOPIS .....	123

## POPIS OZNAKA I KRATICA

AGMP - američka gnjiloća medonosne pčela

ATP – adenzin trifosfat

BD – Columbia sheep blood agar

BHI - Brain Heart Infusion

Ca<sup>2+</sup> - dvovalentni kalcijevi kationi

Ca<sup>2+</sup>DPK – kelat dvovalentnih kalcijevih kationa s dipikolinskom kiselinom

CFU – „colony forming units“

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

DPK – dipikolinska kiselina

EGMP – europska gnjiloća medonosne pčela

EU – Europska unija

MYPGP – obogaćena Mueller – Hintonova hranjiva podloga

NRP – ne-ribosomski peptidi

pb – parovi baza

PBS - fiziološka otopina puferirana fosfatom

PCR – „polymerase chain reaction“; lančana reakcija polimeraze

PK – poliketidi

REP-PCR – „repetitive extragenic palindromic sequence - polymerase chain reaction“

RH – Republika Hrvatska

OIE – Office International des Epizooties, Svjetska organizacija za zdravlje životinja

SAD – Sjedinjene američke države

SASP – „small, acid-soluble spore proteins“

UV – ultravioletno zračenje

## 1. UVOD

Medonosna pčela (*Apis mellifera* L.) je nezaobilazan kukac oprašivač više poljoprivrednih kultura, nasada voćaka i divljih biljaka (CHAUZAT i sur., 2013.). Nesporno je utvrđeno da je veoma teško naći pčelinje zajednice koje samostalno, bez pomoći pčelara, žive u prirodnim staništima. Djelomice je uzrok tomu suvremena poljoprivredna proizvodnja, klimatske promjene, a ponajviše zarazne i nametničke bolesti pčela (TLAK GAJGER i sur., 2010.).

Američka gnjiloća medonosne pčele (AGMP) je opasna zarazna bolest poklopljenog i nepoklopljenog pčelinjeg legla koja predstavlja prijetnju suvremenoj pčelarskoj proizvodnji (FORSGREN i LAUGEN, 2014.). Bolesna pčelinja zajednica slabi, smanjuje se broj odraslih pčela i površina zdravog legla te na kraju ugiba. Uzročnik bolesti je Gram-pozitivna bakterija *Paenibacillus larvae* (GENERSCH i sur., 2006.) koja u nepovoljnim uvjetima tvori ovalne spore. HASEMAN (1961.) navodi da su spore vrlo otporne pa u uginuloj i osušenoj ličinci, saću, pčelinjim proizvodima, pčelarskoj opremi i priboru, kao i okolišu ostaju infektivne desetljećima. Vegetativni oblici *P. larvae* osjetljivi su na djelovanje topline, isušivanje i dezinficijense. Prema BAKONYI i suradnicima (2003.) infektivni oblik bakterije su spore, a prijemljive za infekciju, su savijene pčelinje ličinke u dobi kad uzimaju hranu. Dosad je utvrđeno pet genotipova *P. larvae*: ERIC I, ERIC II, ERIC III i ERIC IV (GENERSCH i sur., 2006.) te ERIC V (BEIMS i sur., 2020.). Fenotipske razlike između pojedinih genotipova uključuju razlike u morfologiji (GENERSCH i sur., 2006.), metaboličkom kapacitetu (NEUENDORF i sur., 2004.), virulenciji (GENERSCH i sur., 2005.; RAUCH i sur., 2009.) te čimbenicima koji utječu na virulenciju (POPPINGA i sur., 2012.; FÜNFHAUS i sur., 2013.). Na području Europe utvrđeni su ERIC I i ERIC II sojevi (GENERSCH i sur., 2010.). ERIC I genotipu *P. larvae* potrebno je 12 dana da prouzroči ugibanje svih zaraženih ličinki ( $LT_{100} = 12$  dana), a genotipu ERIC II sedam dana ( $LT_{100} = 7$  dana). To nesporno dokazuje da će sve pčelinje ličinke zaražene genotipom ERIC II uginuti prije poklapanja stanica saća voštanim poklopcima, a što pčelama s nagonom za čišćenje ostavlja dovoljno vremena za uklanjanje uginulih zaraženih ličinki i posljedično manju količinu novo-proizvedenih spora na razini pčelinje zajednice. Suprotno tome, genotip ERIC I je slabije virulentan na razini pojedinačne pčelinje ličinke jer sve zaražene sigurno ugibaju nakon poklapanja stanica saća. Pčele čistačice otežano



uklanjanju uginule pčelinje ličinke u takvim slučajevima, a posljedično je mogućnost proizvodnje i širenja spora uzročnika unutar zajednice znatno povećana. Sukladno navedenom, infekcija genotipom ERIC I uzrokuje visoku virulenciju za pčelinju zajednicu i njezino brzo propadanje u usporedbi s ERIC II koji uzrokuje nižu virulenciju za pčelinje zajednice i njeno nešto sporije konačno propadanje.

Kliničko prepoznavanje bolesti moguće je na temelju izgleda poklopaca pčelinjeg legla, odnosno izgleda i rasporeda legla na saću, te izgledu propale pčelinje ličinke. Kod sumnje na AGMP poklopci su naborani, uvučeni s tamnim mrljama te nepravilno izgriženim rubovima (SPIVAK i REUTER, 2001.; DE GRAFF i sur., 2006.b). Uočljivo je rešetkasto leglo, a bolesna ličinka se pretvara u bezobličnu, smeđu i viskoznu masu (HANSEN i BRØDSGAARD, 1999.). U poodmaklom stadiju ostatak uginule ličinke priliježe uz donju stjenku stanice saća. Pčelinja zajednica se službeno proglašava bolesnom ako su kliničkim pregledom utvrđene promjene svojstvene toj bolesti i laboratorijskom mikroskopskom pretragom razmaska propalih ličinaka utvrđene spore uzročnika.

U Republici Hrvatskoj (RH) način sanacije i suzbijanja američke gnjiloće provodi se sukladno važećim zakonskim propisima (ANON, 2021.). Mjere suzbijanja predviđaju spaljivanje ili pretresanje bolesne pčelinje zajednice, ali i završnu dezinfekciju opreme, pribora, alata i pčelinjaka (ANON, 2004.). Spaljivanje predstavlja najbrži, najbolji i najskuplji način suzbijanja američke gnjiloće, a pretresanje uključuje narušavanje proizvodnosti pčelinje zajednice i učestale recidive klinički vidljivih znakova karakterističnih za bolest, a ponajviše zbog izostanka ili loše provedbe završne dezinfekcije.

Poznavanje tehnika i provedba mjera dezinfekcije u pčelarskoj proizvodnji utječe na biološko-uzgojno stanje pčelinjih zajednica i kvalitetu meda i drugih pčelinjih proizvoda. BEDNÁŘ i suradnici (2009.) opisali su različite oblike fizikalne i kemijske dezinfekcije pčelarskog pribora i opreme. Također, navode da uspjeh provedbe dezinfekcijskih mjera u pčelinjaku ovisi o pravilnom izboru dezinficijensa, spektru mikroorganizama koji se žele uništiti, preporučenoj koncentraciji radnih otopina i načinu primjene dezinficijensa, dužini trajanja izlaganja dezinficijensu, te materijalu koji se dezinficira sa stanovišta njegovog mogućeg oštećenja i mogućem učinku na okoliš. DOBBELAERE i suradnici (2001.b) pobijaju uvriježeno mišljenje pčelara da je metoda opaljivanja drvenih dijelova pčelarske opreme i pribora plamenom dovoljna dezinfekcijska mjera. Opaljivanje potpuno uništava spore *P. larvae* samo na površinskim dijelovima, dok značajan broj infektivnih spora *P. larvae* ostaje aktivan u unutarnjim strukturama drveta.

Rezultati provedenih ispitivanja primjenom suspenzijskih testova djelomice objašnjavaju zašto je otežana dezinfekcija unutarnjih struktura drveta (DEL HOYO i sur., 1998.). Naime, drvena vlakna ponašaju se poput organske tvari koja, već u koncentraciji od 2 %, znatno smanjuje učinak površinske dezinfekcije. Stoga, rezultati njihova istraživanja upućuju da je sveobuhvatna dezinfekcija drvenih dijelova košnice moguća kombinacijom različitih načina primjene topline poput uranjanja drvenih dijelova u mikrokristalni vosak (150 °C, 10 minuta) (ALIPPI, 1999.; DOBBELAERE i sur., 2001.b), odnosno primjenom visokih koncentracija dezinficijensa. Međutim, visoke koncentracije dezinficijensa nisu ekonomski i ekološki prihvatljive pa je provođenje preventivnih zoohigijenskih mjera i redovita zamjena, barem, 25 do 30 % starog saća iz plodišta vrlo važan način mehaničkog uklanjanje spora *P. larvae* i drugih patogenih mikroorganizama (BUDGE i sur., 2010.; TOMLJANOVIĆ i sur., 2012.; VIDAL-NAQUET, 2015.). OKAYAMA i sur. (1997.) utvrdili su visoku i brzu sporocidnu aktivnost glutaraldehida i natrijevog hipoklorita na spore *P. larvae*. Primjena 0,5 % vodene otopine natrijevog hipoklorita odnosno 1,1 % otopina kaustične sode uništavaju spore *P. larvae* (APHA, 2014.). Postoji mogućnost uspješne primjene gama zračenja u dezinfekciji saća onečišćenog sporama bakterije *P. larvae* (TREMBLAY, 2010.). No, visoka cijena tretiranja kao i potreba transportiranja zaraženog materijala u mjesto gdje se provodi gama zračenje čine ovu metodu neprikladnom za praktično pčelarstvo (BEDNÁŘ i sur., 2009.).

Antibakterijski učinak vodene iscrpine i eteričnih ulja različitih aromatskih biljaka na vegetativni oblik *P. larvae* istraživali su GONZÁLEZ i MARIOLI (2010.). Navode da vodene iscrpine određenih aromatskih biljaka imaju znatno veći antibakterijski učinak nego eterična ulja istih biljaka, ali također smatraju da mogu biti otrovne za pčele. Iscrpine različitih biljaka (flavonoidi, alkaloidi i terpeni) pokazali su se uspješnim u *in vitro* inaktivaciji *P. larvae* (FLESAR i sur., 2010.). Uspješnu *in vitro* primjenu nanočestica ulja biljke čajevca (*Melaleuca alternifolia*) na inaktivaciju *P. larvae* objavili su SANTOS i suradnici (2014.). Slične rezultate prikazali su VAUCHER i sur. (2015.) nakon primjene esencijalnih ulja andiroba i copaiba.

Polazeći od činjenice da u literaturi ne postoje istraživanja o učestalosti i raširenosti određenih genotipova bakterije *P. larva* u RH te da postoje malobrojni, nedovoljno potvrđeni i kontroverzni rezultati glede učinkovitosti komercijalno dostupnih dezinficijensa koji se redovito preporučuju i koriste u svrhu završne dezinfekcije nakon sanacije američke gnjiloće medonosne pčele, ciljeve istraživanja možemo podijeliti na:

- Provedbu genotipizacije *P. larvae* na pedeset terenskih izolata izdvojenih iz karakteristično promijenjenih uginulih pčelinjih ličinki, u razdoblju od jedanaest godina (2010. – 2020.), te tako utvrditi raširenost i učestalost određenih genotipova u RH.
- Utvrđivanje učinka deset komercijalno dostupnih i uobičajeno korištenih dezinficijensa u pčelarstvu, na terenskim i certificiranim sojevima bakterije *P. larvae*, u laboratorijskim uvjetima.
- Uspoređivanje dobivenih rezultata učinka ispitivanih dezinficijensa na pojedine genotipove certificiranih sojeva bakterije *P. larvae*.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

### 2.1. POVIJESNI PODACI

Saznanja o bolestima pčela datiraju još iz antičke Grčke. Aristotel (384. do 322. pr. Kr.) u svojoj knjizi *IX Povijest životinja* iznosi opis bolesne pčelinje zajednice s iscrpljenim pčelama i smrdljivim mirisom. Iako Aristotel ne imenuje o kojoj se bolesti radi; njegov opis daje značajan doprinos pretpostavki da su pčele i leglo u antici vjerojatno bolovale od istih bolesti koje postoje i danas (GENERSCH, 2008.). Nažalost, moralo je proći više od 2000 godina do slijedećeg zapisa o bolestima pčela.

U 18. stoljeću Schirach opisuje bolesno pčelinje leglo neugodnog i smrdljivog mirisa. Krajem 19. stoljeća DZIERZON (1882.) opisuje dvije različite bolesti pčelinjeg legla: blagu i izlječivu kod nepoklopljenog legla te zloćudnu i neizlječivu u poklopljenom pčelinjem leglu. Dzierzonov opis nedvojbeno podsjeća na današnju europsku gnjiloću medonosne pčele (EGMP) i AGMP. Tri godine kasnije CHESHIRE i CHEYNE (1885.) su tvrdili da je bakterija *Bacillus alvei* uzročnik smrdljivog pčelinjeg legla. Međutim, početkom 20. stoljeća Amerikanac White (1906) ne uspijeva izolirati *Bacillus alvei* iz bolesne zajednice sa smrdljivim pčelinjim leglom, već drugog bakterijskog uzročnika kojeg naziva bakterija *Bacillus larvae*.

Rezultati koje su dobili CHESHIRE i CHEYNE (1885.) te WHITE (1906.) upućivali su na činjenicu da postoje dvije etiološki različite bolesti sa sličnom kliničkom slikom u kojoj dominira smrdljivo pčelinje leglo. Kasnije je utvrđeno da se radi o američkoj gnjiloći pčelinjeg legla s teškom kliničkom slikom uzrokovanom bakterijom *B. larvae* te europskoj gnjiloći pčelinjeg legla uzrokovanoj bakterijom *Mellisococcus plutonius* i bakterijom *B. alvei* kao sekundarnim uzročnikom (BAILEY, 1983.). Naziv bolesti američka gnjiloća nije vezana uz podrijetlo bolesti s američkog kontinenta već uz činjenicu što je američki znanstvenik White prvi izolirao uzročnika te bolesti.

### 2.2. RAŠIRENOST AMERIČKE GNJILOĆE MEDONOSNE PČELE

AGMP je bolest raširena u cijelom svijetu (MATHESON, 1993.; D’ALESSANDRO i sur., 2007.; EBELING i sur., 2021.) te je možemo opisivati i kao panzootiju (LOLIN, 1985.). Prema ANTÚNEZ i suradnicima (2004.) AGMP utvrđena je gotovo u svim regijama svijeta,

na pet kontinenata, gdje postoje pčele i pčelarstvo. Međutim, bolest nije uobičajena u području južno od Sahare u Africi (FRIES i RAINA 2003.; DIETEMANN i sur., 2009.; HUMAN i sur., 2011.). FRIES i RAINA (2003.) razloge pronalaze u činjenici da afričke rase pčela pokazuju promjene u ponašanju u usporedbi s europskim rasama pčela u smislu napuštanja legla i nastambe u slučaju uznemiravanja ili nestašice nektara i peluda (RUTTNER, 1988.), pa tako znatan dio uzročnika AGMP ostaje u staroj napuštenoj košnici. Također, navode primitivan način pčelarenja u Africi primjenom tradicionalnih košnica u kojima ne postoji mogućnost premještanja okvira s leglom i/ili saćem između različitih pčelinjih zajednica, kao i učinak štetnika voskovog moljca koji istovremeno uništava medišno saće i uzročnika AGMP. Nadalje, navode higijensko ponašanje afričkih pasmina pčela u brzom otkrivanju i uklanjanju uginulih pčelinjih ličinki te smanjenu fiziološku primljivost ličinki afričkih pčela u odnosu na ličinke europskih pasmina pčela kao moguće čimbenike da AGMP nije raširena u sub-saharskoj Africi. Pri tome navode da su potrebna daljnja istraživanja. Tako su HANSEN i suradnici (2003.) ipak utvrdili prisutnost spora uzročnika AGMP u medu, prikupljenom od otkupljivača, u Južnoafričkoj Republici i Gvineji Bisau.

## **2.3. AMERIČKA GNJILOĆA MEDONOSNE PČELE**

### **2.3.1. ETIOLOGIJA**

Uzročnik AGMP je sporogena bakterija *P. larvae* (GENERSCH i sur., 2006.). Pčelinja ličinka predstavlja jedinog nosioca u kojoj se *P. larvae* može razvijati (EBELING i sur., 2016.). Vegetativni oblici ovog pokretljivog, grampozitivnog mikroorganizma su štapićastog oblika, dužine 1,5 do 6  $\mu\text{m}$  i širine 0,5 do 0,6  $\mu\text{m}$  (GORDON i sur., 1973.). Štapići su okruženi dugim peritriho raspoređenim cilijama koje im omogućuju aktivno kretanje (GENERSCH, 2008.). Vegetativni oblici *P. larvae* osjetljivi su na djelovanje topline, isušivanje i dezinficijense. Nastupom nepovoljnih uvjeta uzročnik stvara ovalne endospore, prosječne dužine i širine 1,3  $\mu\text{m}$  x 0,6  $\mu\text{m}$  (HORNITZKY i WILSON, 1989.; ALIPPI, 1992.). Spore su vrlo otporne pa u uginulijama i osušenoj ličinki, saću, pčelinjim proizvodima, opremi i okolišu ostaju žive i preko 30 godina (HASEMAN, 1961.). Međutim, WILSON (1971.) je dokazao da izlaganje pčelinjeg fecesa, u kojem su utvrđene spore, utjecaju sunčevog svjetla smanjuje preživljavanje spora s početnih 1,8 milijuna do 95 tisuća spora na kraju izlaganja tijekom 600 sati. Također,

SHIMANUKI i KNOX (1994.) utvrdili su da se preživljavanje spora *P. larvae* s odmakom vremena ipak smanjuje.

Infektivni oblik *P. larvae* su spore, a prijemljive za infekciju su pčelinje ličinke u dobi kad uzimaju hranu (BAKONYI i sur., 2003.). Za infekciju jedne pčelinje ličinke mlađe od jednog dana potrebno je samo deset spora, ali starenjem primljivost se smanjuje te je potrebno više od deset milijuna spora za infekciju ličinke stare između četiri i pet dana (SULIMANOVIĆ i sur., 1995.). Štoviše, broj spora potreban za uzrokovanje infekcije u kasnijim fazama razvoja pčelinjih ličinki je toliko visok da infekcija prirodnim putem nije moguća (BRØDSGAARD i sur., 1998.; GENERSCH i sur., 2005.). Jedna uginula ličinka može sadržavati do 2,5 milijardi novostvorenih spora (STURTEVANT, 1932.; HANSEN i BRØDSGAARD, 1999.; CHANTAWANNAKUL i DANCER, 2001.).

### **2.3.1.1. Genotipovi bakterije *P. larvae***

Primjenom složenih molekularnih metoda utvrđeno je pet genotipa *P. larvae*: ERIC I, ERIC II, ERIC III i ERIC IV (GENERSCH i sur., 2006.) te ERIC V u uzorku meda iz Španjolske (BEIMS i sur., 2020.). Nedavno utvrđivanje novog genotipa ERIC V sugerira moguće postojanje još neotkrivenih genotipova (BEIMS i sur., 2020.). Tijekom posljednjih desetljeća ERIC I i ERIC II su najčešće izolirani genotipovi bakterije *P. larvae* iz meda ili pčelinjih zajednica oboljelih od AGMP (GENERSCH i sur., 2006.), dok genotipovi ERIC III i ERIC IV imaju slabiju prevalencu i nisu izolirani posljednjih godina u terenskim uvjetima (EBELING i sur., 2016.; BEIMS i sur., 2020.) već su zastupljeni u povijesnim izolatima (GENERSCH i sur., 2006.). Takva rasprostranjenost genotipova je u skladu s istraživanjem BEIMS i suradnika (2020.) koji su utvrdili da je 66,7 % izolata *P. larvae* pripadalo ERIC I, a 29,6 % izolata genotipu ERIC II.

### **2.3.1.2. Građa i struktura spora roda *Paenibacillus***

Otpornost spora uvjetovana je njihovom strukturom i sastavnim dijelovima (SETLOW, 2006.). Naime, spore *P. larvae* sadrže nekoliko slojeva koji se ne mogu pronaći u vegetativnim bakterijskim stanicama tijekom klijanja, uključujući vanjski sloj ili egzosporij (PAREDES – SABJA i sur., 2014.), proteinski omotač te međuprostor između egzosporija i proteinskog omotača (HENRIQUES i sur., 2007.; MCKENNEY i sur., 2013.).

Egzosporij je građen od proteina i ugljikohidrata, a smatra se da povećava adheziju spora na abiotičke površine olakšavajući njihov prijenos s onečišćenih na čiste površine (MALLOZZI i sur., 2010.).

Proteinski omotač sadrži više od 50 genetski specifičnih proteina koji zaštićuju sporu od nametničkih protozoa i lizosomskih enzima, ali nema ulogu u otpornosti spora na toplinu, radijaciju i neke kemijske spojeve poput slobodnih radikala (DRIKS, 1999.; KLOBUTCHER i sur., 2006.).

Između proteinskog omotača i sloja peptidoglikana koji čine koru ili korteks spore, nalazi se vanjska membrana koja ima bitnu ulogu u formiranju novih spora (PIGGOT i HILBERT, 2004.), ali još nije razjašnjena njena uloga u otpornosti spora. Postoje podijeljena mišljenja oko uloge vanjske membrane u svezi otpornosti. Tako su RODE i suradnici (1962.) te GERHARDT i BLACK (1961.) smatrali da vanjska membrana ima ulogu propusne barijere dok se NICHOLSON i suradnici (2000.) s time ne slažu. HENRIQUES i suradnici (2007.) smatraju da je vanjska membrana rudimentarna struktura spore bez očite funkcije.

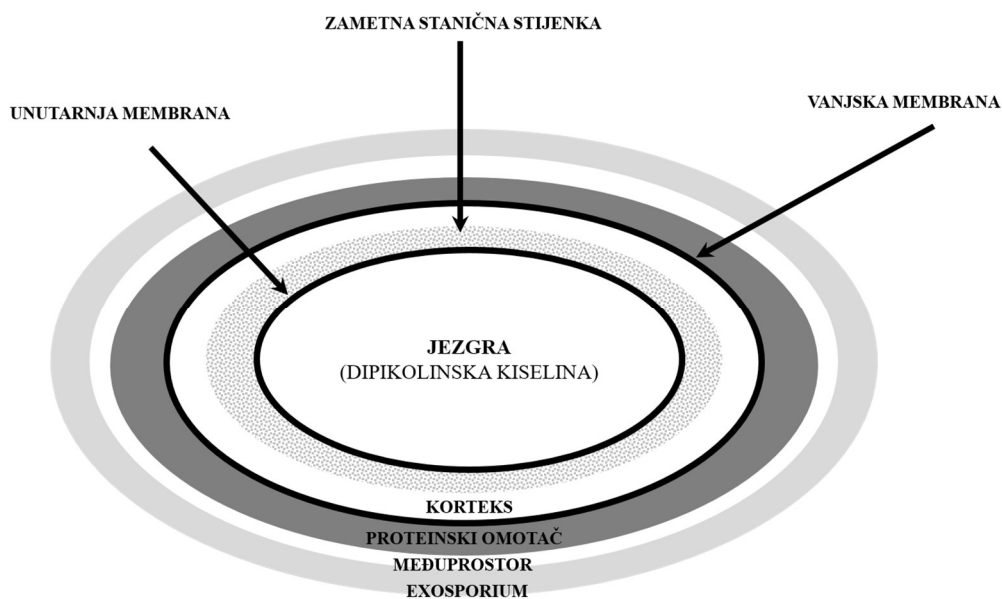
Ispod vanjske membrane nalazi se korteks, a ispod zametna stanična stijenka. Strukture peptidoglikana u korteksu te u zametnoj staničnoj stijenci spore i stanične stijenke rastuće bakterijske stanice tijekom klijanja su izgledom identične (SETLOW, 2014.). Međutim, peptidoglikani korteksa sadrže strukture koje ih razlikuju od peptidoglikana stanične stijenke. Naime, gotovo svaka druga molekula muraminske kiseline zamijenjena je s molekulom muramik- $\delta$ -laktamom i time specifično prepoznata od litičkih enzima korteksa koji hidroliziraju korteks za vrijeme klijanja, ali ne i zametnu staničnu stijenku (SETLOW, 2003.; SETLOW, 2014.).

Ispod zametne stanične stijenke nalazi se unutarnja membrana. Većina glavnih proteina (zametni receptori, zametni D-protein i SpoVa protein) (LAUE i sur., 2018.), uključenih u klijanje spora, nalazi se u unutrašnjoj membrani ili tijesno priliježu na nju. Fosfolipidna struktura unutarnje membrane odlikuje se naglašenim viskozitetom (LOISAN i sur., 2013.) i niskom propusnošću za male hidrofilne spojeve, uključujući i vodu, u usporedbi s rastućim bakterijskim stanicama tijekom klijanja (SUNDE i sur., 2009.). Navedena sposobnost čuva jezgru od molekula koji bi mogli oštetiti deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) (CORTEZZO i SETLOW, 2005.).

U središtu spore nalazi se jezgra u kojoj se nalaze DNK, ribosomi i većina enzima. Jezgra ima nizak sadržaj vode, nizak pH i visoku razinu specifične piridin-2,6-dikarboksilne kiseline (dipikolinska kiselina – DPK) koja dolazi u kelatu s dvovalentnim kalcijevim kationima ( $\text{Ca}^{+2}$ ) ( $\text{Ca}^{+2}\text{DPK}$ ) (SETLOW, 2013.). MADIGAN i suradnici (2015.) su utvrdili da kelat

Ca<sup>2+</sup>DPK pomaže proces dehidracije jer veže vodu unutar jezgre spore. Također, Ca<sup>2+</sup>DPK se ubacuje između baza DNK-a te tako povećava otpornost DNK na denaturaciju toplinom.

Nizak sadržaj vode u jezgri spora vjerojatno je glavni razlog minimalne metaboličke aktivnosti spora i nepokretljivosti proteina u jezgri (COWAN i sur., 2003.), dok KAIEDA i suradnici (2013.) smatraju da je većina vode u jezgri spore pokretna. U jezgri su prisutni i mali, u kiselini topljivi,  $\alpha/\beta$  proteini (SASP – engl., *small, acid-soluble spore proteins*) koji štite DNK od ultravioletnog (UV) zračenja i topline (MASON i SETLOW, 1986.).



Slika 1. Prikaz strukture spore iz roda *Paenibacillus* (prilagođeno prema SETLOW, 2014.).

### 2.3.1.3. Klijanje spora iz roda *Paenibacillus*

Proces sporulacije najčešće je uvjetovan nedostatkom hranjivih tvari (ERRINGTON, 2003.) dok klijanje spora najčešće počinje u prisutnosti nutrijenata poput šećera, amino-kiselina i purinskih nukleotida (CHRISTIEA i SETLOW, 2020.). Također, proces klijanja spora mogu potaknuti lizosomi, soli, vanjski Ca<sup>2+</sup>DPK oslobođen iz susjedne spore koja prolazi proces klijanja, kationski surfaktant poput dodecilamina (SETLOW, 2003.) i visoki pritisak (GOULD i SALE, 1970.).

Prema SETLOW (2003.) proces klijanja odvija se u dvije faze. U prvoj fazi nutrijenti se vežu na zametne receptore na unutarnjoj membrani dovodeći do otvaranja ionskih kanala za jednovalentne vodikove (H<sup>+</sup>) i kalijeve (K<sup>+</sup>) katione, te dvovalentne cinkove (Zn<sup>2+</sup>) ione iz



jezgre spore čime dolazi do postupne rehidracije spore. Pri tome gubitak  $H^+$  iona dovodi do porasta pH s ~ 6,6 do 7,7 u jezgri što je važno za metabolizam spore jer je dovoljna količina vode bitna za aktivnost enzima (JEDRZEJAS i SETLOW, 2001.).

Istovremeno SpoVa proteini tvore kanal u unutarnjoj membrani kroz koji se otpušta  $Ca^{+2}$ DPK (SETLOW, 2014.; WANG i sur., 2015.) što dovodi do hidracije jezgre i smanjuje otpornost spore na vlagu i toplinu. Međutim, ova početna hidracija još uvijek nije dovoljna za pokretanje proteina i enzimatsku aktivnost u jezgri (SETLOW i sur., 2001.; COWAN i sur., 2003.). Zatim slijedi druga faza klijanja spora koja započinje djelovanjem litičkih enzima korteksa pri čemu dolazi do razgradnje peptidoglikana u korteksu omogućavajući još bolju hidraciju i posljedičnu pokretljivost proteina, razgradnju Serum Amyloid P/SAP Proteina (SSAP proteina), a time i enzimatsku aktivnost, sintezu makromolekula, replikaciju DNK i ponovni rast stanice čime završava proces klijanja spora.

Unatoč dugotrajnim istraživačkim naporima, sveobuhvatno razumijevanje ključnih molekularnih i biokemijskih pokazatelja te mehanizama prijenosa signala povezanih s klijanjem spora *P. larvae* i dalje nisu objašnjeni. Posebice se to odnosi na načine ulaska nutrijenta kroz vanjsku slojeve spore i dolaska u dodir sa zametnim receptorima u unutarnjoj membrani, zatim načinima na koji SpoVa proteini sudjeluju u otvaranju kanala za oslobađanje  $Ca^{+2}$ DPK, odnosno zašto litički enzimi korteksa djeluju samo tijekom klijanja (SETLOW, 2014.; CHRISTIEA i SETLOW, 2020.).

FORSGREEN i suradnici (2008.) utvrdili su genetski specifične razlike u stupnju klijanju spora na hranjivim podlogama, njihovoj osjetljivosti na zagrijavanje i postojanost. Primjerice, genotip ERIC IV intenzivno klija i raste pri nasađivanju na hranjive podloge. Također, nasađivanje djeluje povoljnije kod ERIC I u usporedbi s ERIC III. Međutim, nije utvrđena značajna razlika u poticanju klijanja spora između ERIC I do ERIC II te između genotipova ERIC II i ERIC III.

Zagrijavanje na temperaturu između 90 i 95 °C stimulira klijanje spora *P. larvae* genotipa ERIC I. Međutim, sojevi genotipa ERIC II gube germinacijsku sposobnost pri tim temperaturama čime se smanjuje dijagnostička vrijednost metode ranog utvrđivanja AGMP iz terenskih uzoraka u kojima su prisutni sojevi genotipa ERIC II. Naime, u standardnoj proceduri rane dijagnostike AGMP, zagrijavanje se koristi kod nasađivanja dijagnostičkog materijala kako bi se izbjeglo onečišćenje i rast sekundarnih mikroorganizama.

Postojanost spora pri njihovoj pohrani ima genetski specifičan učinak na klijanje spora. Tako će se, pri jednakim uvjetima pohrane, sposobnost klijanja kod sojeva genotipa ERIC II

početi smanjivati nakon šest mjeseci, dok genotipovi ERIC I, ERIC III i ERIC IV zadržavaju sposobnost klijanja i nakon 18 mjeseci pravilne pohrane.

#### **2.3.1.4. Morfologija kolonija *P. larvae***

BEIMS i suradnici (2020.) analizirali su morfologiju bakterija, hemolitičku aktivnost, sposobnost hidrolize želatine, mogućnost proizvodnje ne-ribosomskih peptida (penilargin i sevadicin) i poliketida kod sojeva *P. larvae* genotipa ERIC V te LT<sub>100</sub> kod infekcije pčelinjih ličinki za svih pet genotipova. Tako je utvrđeno da su vegetativni oblici genotipova ERIC I do ERIC V morfološki gotovo ujednačeni. Međutim, razlika u morfologiji endospora genotipova ERIC I do ERIC V je značajna. Endospore genotipa ERIC I i ERIC II imaju glatku površinu dok endospore genotipova između ERIC III do ERIC V imaju izbrazdanu površinu s podužnim grebenima (BEIMS i sur., 2020.). To je djelomice u suprotnosti s podatkom da sojevi genotipa ERIC II imaju vijugavu površinu sličnu površini mozga (GENERSCH i sur., 2006.).

ERIC genotipovi *P. larvae* tvore kolonije koje se morfološki razlikuju. Tako ERIC I i ERIC IV tvore veće kolonije bijelo do sive boje dok su kolonije kod ERIC II i ERIC III oblika manjeg ili većeg kruga, crveno-smeđe ili bijele boje s uvijek prisutnim narančasto – smeđe pigmentiranim vanjskim rubom (GENERSCH i sur., 2006.; ASHIRALIEVA i GENERSCH, 2006.). Nedovoljno poznavanje morfoloških razlika kolonija između pojedinih genotipova *P. larvae* dovelo je u prošlosti do lažno-negativnih dijagnostičkih rezultata (DE GRAAF i sur., 2006.a) jer se smatralo da je uzročnik AGMP isključivo povezan s tvorbom nepigmentiranih bakterijskih kolonija (HEYNDRIKX i sur., 1996.).

#### **2.3.1.5. Biokemijske osobitosti *P. larvae***

Uzgojem na krvnom ovčjem agaru, nakon 24 sata utvrđena je slaba hemolitička aktivnost kod bakterijskih kolonija *P. larvae* genotipa ERIC I, a znatna kod genotipova ERIC III do ERIC V. Međutim, kod genotipa ERIC II nije utvrđena hemolitička aktivnost, a samo su genotipovi ERIC II i ERIC III te ERIC V mogli hidrolizirati želatinu (BEIMS i sur., 2020.). Također, NEUENDORF i suradnici (2004.) utvrdili su određene metaboličke razlike između ERIC genotipova. Utvrđeno je da ERIC II može metabolizirati D – fruktozu i D – psikozu, ali ne može rabiti glicerol kao izvor ugljika.

Tijekom infekcije pčelinje ličinke i patološkog procesa promjene njenog izgleda i ugibanja bakterija *P. larvae* može, genetski specifično, proizvoditi enzime poput hitin degradirajućeg enzima PICBP49 (GARCIA – GONZALEZ i GENERSCH, 2013.), toksine Plx 1, Plx 2 i C3 larvin (FÜNFHAUS i sur., 2013.), kao i sekundarne metabolite u vidu ribosomskih peptida, te posjedovati velike skupine gena sposobne za kodiranje enzimatskih skupina i proizvodnju ne-ribosomskih peptida (NRP) i poliketida (PK) poput penilarvina, penilamicina, bacilibactina i sevadicina (EBELING i sur., 2016.; FÜNFHAUS i sur., 2018.; BEIMS i sur., 2020.).

Mogućnost proizvodnje NRP i PK istraživana je uzgojem u različitim hranjivim medijima poput Bacillus medija, mediju embrioidnih tjelešaca (EBS medij) i Mueller – Hinton agara (BEIMS i sur., 2020.). Tako ERIC I proizvodi penilarvin A i C u EBS hranjivom mediju dok ERIC II i ERIC III proizvode penilarvin A i C u sva tri hranjiva medija. Međutim, genotip ERIC IV ne proizvodi niti penilarvin ni sevadicin. Novoutvrđeni genotip ERIC V proizvodi penilarvin A, B i C, a ERIC III penilarvin A i C u sva tri hranjiva medija. Jedini genotip bakterije *P. larvae* koji proizvodi sevadicin u sva tri hranjiva medija je ERIC II (BEIMS i sur., 2020.).

### **2.3.1.6. Površinska pokretljivost *P. larvae* u obliku roja („swarming motility“) i tvorba biofilma**

Vegetativni štapići bakterije *P. larvae* posjeduju duge, peritriho raspoređene cilije koje omogućuju aktivno kretanje (GENERSCH, 2008.). Logična pretpostavka je stoga bila da bi se bakterija *P. larvae* mogla koordinirano i aktivno kretati u obliku roja te tvoriti biofilm. Danas se kretanje u obliku roja smatra najbrže poznatim bakterijskim načinom površinske translokacije koje omogućuje brzu kolonizaciju okoliša i nosioca bogatih hranjivim tvarima (VERSTRAETEN i sur., 2008.). Biofilmove možemo definirati kao visoko strukturirane, kompleksne zajednice bakterija povezane izvanstaničnim matriksom koji same izlučuju (AGUILAR i sur., 2015.). Iznimna važnost biofilma za bakterijski život ogleda se u spoznaji da oni štite bakterije od imunološkog sustava nosioca i različitih dezinfekcijskih postupaka (ALGBURI i sur., 2017.). Tvorba biofilma počinje mikrobnom adhezijom te naknadnom proizvodnjom i nakupljanjem izvanstaničnog matriksa koji je sastavljen od bjelančevina, polisaharida, huminskih tvari, biosurfaktanta, izvanstanične DNK, a ponekad i drugih molekula uključenih u međustaničnu komunikaciju (FLEMMING i WINGENDER, 2010.). Biofilmovi se mogu pojaviti kao sesilne zajednice na biotičkim ili abiotičkim površinama ili mogu plutati na granici između zraka i vode (NAGAR i SCHWARZ, 2015.). Međutim, bakterije mogu tvoriti

i slobodno plutajuće biofilmove (KRAGH i sur., 2016.). FÜNFHAUS i suradnici (2018.) utvrdili su da se bakterija *P. larvae* genotipa ERIC II može površinski kretati u obliku roja te da tvori slobodno plutajući biofilm dok *P. larvae* genotipa ERIC I može tvoriti biofilm, ali se ne može kretati u obliku roja. Također, predložili su mogućnost da je NRP penilarvin, kao biosurfaktant, vjerojatno ključan za kretanje bakterija u obliku roja kod genotipa ERIC II.

Spoznaja da je bakterija *P. larvae* sposobna proizvoditi biofilm te se aktivno kretati u obliku roja uvjetovala je potrebu za novim pristupima u dezinfekcijskim postupcima pri prevenciji, te nakon sanacije klinički vidljive AGMP na pčelinjacima (FÜNFHAUS i sur., 2018.).

### **2.3.1.7. Virulencija bakterije *P. larvae***

Virulencija bakterije *P. larvae* uvjetovana je mogućnošću inficiranja pčelinje ličinke kao nosioca i vremenom potrebnim do uginuća inficirane ličinke (RAUCH i sur., 2009.). Stvaranje velike količine dugoživućih i otpornih spora te mogućnost umnažanja i razvoja vegetativnih oblika bakterije omogućuje visoku vjerojatnost infekcije s navedenim uzročnikom bolesti (RAUCH i sur., 2009.). Analizom patogenosti, odnosno virulencije, uočene su značajne razlike između genotipova bakterije *P. larvae* ERIC I do ERIC IV (GENERSCH i sur., 2005.; GENERSCH i sur., 2006.; RAUCH i sur., 2009.) te između genotipova ERIC I do ERIC V (BEIMS i sur., 2020.). ERIC I genotipu bakterije *P. larvae* potrebno je 12 dana da prouzroči ugibanje svih zaraženih ličinki ( $LT_{100} = 12$  dana), a genotipovima ERIC II do ERIC IV sedam dana (GENERSCH i sur., 2006.). Navedeni rezultati podudaraju se s nedavnim istraživanjima  $LT_{100}$  kod genotipova ERIC I i ERIC II, ali oni nisu u skladu jer  $LT_{100}$  za genotipove ERIC III i ERIC IV iznosi tri dana (BEIMS i sur., 2020.). Stoga su, s obzirom na brzinu ugibanja pčelinjih ličinki, genotipovi ERIC I do ERIC V svrstani u tri grupe: ERIC I koji sporo dovodi do ugibanja zaražene pčelinje ličinke, ERIC II koji umjereno brzo dovodi do ugibanja zaražene ličinke te ERIC III do ERIC V koji su genotipovi uzročnika koji brzo dovode do ugibanja zaražene ličinke (BEIMS i sur., 2020.).

Rezultati ispitivanja  $LT_{100}$  za ERIC II ukazuju da će sve zaražene pčelinje ličinke uginuti prije poklapanja stanica saća voštanim poklopcima. Na taj način kućne pčele čistačice imaju dovoljno dugo vremena za uklanjanje uginulih zaraženih pčelinjih ličinki. Pri tome dolazi do narušavanja procesa stvaranja spora na razini pčelinje zajednice što doprinosi usporavanju širenja i razvoja bolesti. Međutim, genotip ERIC I je slabije virulentan na razini pojedinačne

ličinke jer zaražene ličinke ugibaju nakon poklapanja stanica saća. Smatra se da se genotip ERIC I bakterije *P. larvae* evolucijski prilagodio kako bi izbjegao higijensko ponašanje pčela čistačica (RAUCH i sur., 2009.). Posljedično se smanjuje uklanjanje uginulih ličinki u takvim slučajevima, a mogućnost proizvodnje i širenja infektivnih spora uzročnika je znatno povećana (GENERSCH i sur., 2005.; RAUCH i sur., 2009.).

U konačnici, genotip ERIC I je visoko virulentan za pčelinju zajednicu što dovodi do njenog brzog propadanja u usporedbi s ERIC II koji pokazuje nižu virulenciju na razini pčelinje zajednice i time uzrokuje njeno sporije propadanje. Ovo je u skladu s predloženom negativnom korelacijom virulencije bakterije *P. larvae* na razini ličinke i razini pčelinje zajednice te epizootiološke prevalencije genotipa ERIC I u terenskim uvjetima (RAUCH i sur., 2009.; BEIMS i sur., 2020.).

### **2.3.2. EPIZOOTIOLOGIJA**

Poznavanje epizootioloških podataka pomaže pri utvrđivanju uzroka nastanka, širenja, dinamike, profilakse i prestanka određene zarazne bolesti (CVETNIĆ, 1993.). AGMP ima tendenciju relativno brzog širenja te se u kratkom vremenskom razdoblju može proširiti na velike udaljenosti (SULIMANOVIĆ i sur., 1995.), što uvelike ovisi o primjenjivanim pčelarskim praksama. Izvori zaraze su bolesne i uginule pčelinje zajednice, napuštene košnice i pčelinjaci, pčelinji proizvodi iz uginulih i bolesnih zajednica te sav pribor, oprema i alat koji su bili u dodiru s bolesnom ili uginulom pčelinjom zajednicom (SULIMANOVIĆ i sur., 1995.; HANSEN i BRØDSGAARD, 1999.).

Brzina i način prijenosa uzročnika ključni su čimbenici za razvoj virulencije u odnosu uzročnika i nosioca (LIPSITCH i sur., 1996.; DIECKMANN i sur., 2002.). Uzročnik se može širiti horizontalno i vertikalno između pčelinjih zajednica (GOODWIN i sur., 1993.; HORNITZKY, 1998.; FRIES i sur., 2006.). Smatra se da je odnos uzročnik – nosioc, kod vertikalnog prijenosa, evolucijski usklađeniji i manje virulentan nego kod horizontalnog načina širenja bolesti (LIPSITCH i sur., 1996.).

Horizontalni način širenja uključuje prirodne načine širenja bolesti, poput grabeža i/ili zalijetanja odraslih pčela u tuđe košnice u istom ili susjednom pčelinjaku, a vertikalni prijenos odvija se putem rojenja (FRIES i CAMAZINE, 2001.). Također, horizontalni prijenos odnosi se na prijenos uzročnika između jedinki iste generacije, dok vertikalni prijenos podrazumijeva prijenos uzročnika s roditelja na potomstvo (CANNING, 1982.). Najčešći prirodni put

horizontalnog širenja uzročnika između pčelinjih zajednica je grabež (HANSEN i sur., 1988.; RATNIEKS, 1992.; GOODWIN i sur., 1993.; SULIMANOVIĆ i sur., 1995.; SHIMANUKI, 1997.; HANSEN i BRØDSGAARD, 1999.; FRIES i CAMAZINE, 2001.; DE GRAAF i sur., 2001.). Bolesna pčelinja zajednica slabi i posljedično tome mehanizmi uspješne obrane zajednice izostaju. Posebice u razdoblju nedostatka nektara i peluda u prirodi, zajednica često postaje žrtva drugih jačih pčelinjih zajednica (SULIMANOVIĆ i sur., 1995.). Pri tome, pčele tuđice odnose uz med i uzročnike bolesti u svoje košnice. Grabež se najčešće događa na završetku pašne sezone u kasno ljeto ili jesen, a rjeđe tijekom proljeća (WINSTON, 1987.).

Brzom širenju AGMP pridonose i pčelari pri pregledu pčelinjih zajednica, vrcanju, formiranju nukleusa, spajanju zajednica, pojačavanju zajednica s hranom i leglom iz drugih zajednica, kupoprodaji pčela, hranjenjem pčela s medom u kojem se nalaze spore bakterije *P. larvae* te korištenjem satnih osnova načinjenim iz neraskuženog voska (SULIMANOVIĆ i sur., 1995.; HANSEN i BRØDSGAARD, 1999.).

Zalijetanje pčela u tuđe košnice nije značajno za širenje uzročnika između pčelinjih zajednica (GOODWIN i sur., 1994.; SULIMANOVIĆ i sur., 1995.; FRIES i CAMAZINE, 2001.; LINDSTRÖM i sur., 2008.a). Međutim, udaljenost pčelinjih zajednica od izvora zaraze ima izravan učinak na količinu spora i brzinu razvoja kliničkih znakova bolesti (LINDSTRÖM i sur., 2008.a). Pčelinje zajednice smještene od pola do jedan kilometar zračne udaljenosti od zaražene pčelinje zajednice imale su znatno veću količinu infektivnih spora *P. larvae* i razvile tipičnu kliničku sliku AGMP dok su pčelinje zajednice smještene dva i više kilometara od zaražene zajednice imale manju količinu spora bez vidljivih kliničkih znakova AGMP (LINDSTRÖM i sur., 2008.a).

Također, utvrđeno je da pčelinje zajednice mogu duže sadržavati veliku količinu spora bakterije *P. larvae* bez vidljivih kliničkih znakova AGMP (LINDSTRÖM i sur., 2008.a) što je djelomice u skladu s prethodnim istraživanjima kad su utvrđene zajednice koje su duže vrijeme održavale manju količinu spora uzročnika bolesti bez da su razvile vidljive karakteristične kliničke znakove (HANSEN i RASMUSSEN, 1986.; FRIES i sur., 2006.).

Tijek i ishod zaraze ne ovisi samo o količini spora bakterije *P. larvae* (LINDSTRÖM, 2008.) već i izvoru infektivnih spora (LINDSTRÖM i sur., 2008.a; LINDSTRÖM i sur., 2008.b). Naime, utvrđeno je da med može biti rezervoar spora *P. larvae* koje ulaze u hranidbeni lanac pčelinje zajednice tek kada postoji potreba za uzimanjem meda skladištenog u saću. Naime, pokusno davanje meda onečišćenog sporama bakterije *P. larvae* zdravim pčelinjim zajednicama ima sporiji infektivni učinak na prevalenciju spora u odraslih pčela, nego pri dodavanju zaraženog pčelinjeg legla u košnicu (LINDSTRÖM i sur., 2008.b). Međutim,

tijekom kasne jeseni i zime te u bezopasnim razdobljima povecava se potreba za medom te se posljedično povecava količina infektivnih spora bakterije *P. larvae* u odraslih pčela kao i mogućnost razvoja karakteristične kliničke slike AGMP u proljeće (LINDSTRÖM i sur., 2008.b).

Vertikalni prijenos bakterije *P. larvae* odvija se putem rojenja kada polovica odraslih pčela svih dobnih skupina s maticom napusti matičnu zajednicu u obliku roja, neovisno da li se radilo o tipičnoj kliničkoj ili subkliničkoj slici AGMP kod matične pčelinje zajednice (FRIES i sur., 2006.). Pri tome, količina spora uzročnika bolesti u matičnih pčelinjih zajednica s vidljivom kliničkom slikom se ne smanjuje, a simptomi AGMP budu i dalje prisutni s odmakom vremena. Međutim, količina infektivnih spora bakterije *P. larvae* kod rojeva, iz matičnih zajednica s kliničkom slikom, se brzo smanjuje, a klinički znakovi se uobičajeno ne pojavljuju. Također, utvrđeno je da se količina infektivnih spora uzročnika bolesti u matičnih zajednica sa subkliničkom slikom brzo smanjuje nakon rojenja.

Unutar pčelinje zajednice zarazu šire pčele radilice koje prvo obavljaju posao čišćenja košnice, a zatim hranjenja legla. Naime, pčele pokušavaju ukloniti promijenjene i uginule pčelinje ličinke te se pri tome onečiste sporama bakterije *P. larvae*. Kroz nekoliko dana iste radilice postaju hraniteljice pčelinjeg legla te dolaze u izravni kontakt s pčelinjim ličinkama u fazi savijene ličinke koje uzimaju hranu. Tom prilikom dolazi do zaražavanja do tada zdravog pčelinjeg legla.

Širenju spora uzročnika AGMP unutar pčelinje zajednice i između pčelinjih zajednica može doprinijeti i nametnička grinja *Varroa destructor* (ALIPPI, 1992.; ALIPPI, 1995.; SULIMANOVIĆ i sur., 1995.; DE RYCKE i sur., 2002.). Iako se smatralo da količina infektivnih spora bakterije *P. larvae* prenesena na tijelu *V. destructor* nije dovoljna za razvoj tipične kliničke slike AGMP (ALIPPI i sur., 1995.), zbog njenog načina parazitiranja moguća je takozvana atipična AGMP.

### **2.3.3. PATOGENEZA**

FÜNFHAUS i suradnici (2018.) utvrdili su da se patogeneza AGMP može podijeliti na patogenu fazu koja traje do trenutka uginuća pčelinje ličinke, te saprofitnu fazu u kojoj se odvija razgradnja uginule pčelinje ličinke. Obje faze su podjednako važne za životni ciklus bakterije *P. larvae* pri čemu uginuće pčelinje ličinke ne predstavlja kraj vegetativnog razvoja već samo razdoblje prijelaza od patogene prema saprofitnoj fazi.

Ubrzo nakon uzimanja hrane onečišćene sporama bakterije *P. larvae*, one klijaju u srednjem crijevu pčelinje ličinke. Pri tome dolazi do proliferacije vegetativnih oblika bakterije *P. larvae* bez oštećivanja epitela srednjeg crijeva (YUE i sur., 2008.a). Proliferacija traje danima, pa je vjerojatni izvor hranjivih tvari za bakteriju *P. larvae*, hrana bogata ugljikohidratima koju zaražene pčelinje ličinke još uvijek dobivaju od odraslih pčela hraniteljica, a vegetativni oblici *P. larvae* ju mogu metabolizirati (NEUENDORF i sur., 2004.).

U slijedećoj fazi vegetativni oblici oštećuju peritrofnu membranu i epitelne stanice srednjeg crijeva inficirane pčelinje ličinke te konačno ulaze u hemocel i uzrokuju njeno ugičanje (YUE i sur., 2008.a; GARCIA – GONZALEZ i GENERSCH, 2013.). Peritrofna membrana se sastoji od proteina, glikoproteina i hitinskih vlakana građenih od netopljivog linearnog beta-1,4-vezanog N-acetilglukozamina i njezina razgradnja je značajan čimbenik patogeneze bolesti (HEGEDUS i sur. 2009.; EBELING i sur., 2016.). Utvrđeno je da svi genotipovi bakterije *P. larvae*, ERIC I do ERIC V posjeduju hitin degradirajući enzim PICBP49 putem kojeg bakterija *P. larvae* razgrađuje peritrofnu membranu (BEIMS i sur., 2020.; EBELING i sur., 2021.). Na svom putu iz srednjeg crijeva u hemocel bakterija *P. larvae* genotipa ERIC I koristi izvanstanične puteve i oštećuje međustanične strukture epitelnih visokoprizmatičnih stanica srednjeg crijeva i peritrofne membrane (YUE i sur., 2008.b).

Na osnovu rezultata istraživanja provedenih molekularnim metodama DJUKIC i suradnici (2014.) predložili su postojanje različitih strategija prodiranja bakterije *P. larvae* u hemocel pčelinje ličinke za genotipove ERIC I i ERIC II. Naime, nakon razgradnje peritrofne membrane, genotip bakterije *P. larvae* ERIC I proizvodi toksine Plx 1 i Plx 2 koji oštećuju tkivo između epitelnih stanica srednjeg crijeva inficirane ličinke. Prisutnost toksina Plx 1 i Plx 2 kod genotipa bakterije *P. larvae* ERIC I smatra se specifičnim čimbenikom za njegovu virulenciju (FÜNFHAUS i sur., 2013.; EBELING i sur., 2021.). Kod genotipa bakterije *P. larvae* ERIC II nije utvrđena proizvodnja ni izlučivanje toksina Plx1, ali je prisutan toksin Plx2. Također, kod svih genotipova bakterije *P. larvae* ERIC I do ERIC V utvrđen je C3 larvin toksin (BEIMS i sur., 2020.), ali njegova pato-biološka uloga zasad nije razjašnjena (FÜNFHAUS i sur., 2013.; EBELING i sur., 2016.). Novijim istraživanjima (EBELING i sur., 2019.; EBELING i sur., 2021.) utvrđena je neučinkovitost C3 larvin toksina u patogenezi AGMP.

Međutim, genotip bakterije *P. larvae* ERIC II može kodirati gene za proizvodnju proteina površinskog sloja SplA (FÜNFHAUS i GENERSCH, 2012.; EBELING i sur., 2021.). Proteini površinskog sloja su netopivi glikoproteini i prekrivaju površinu mnogih patogenih bakterija (SLEYTR i sur., 2007.). Oni mogu činiti do 20 % ukupne mase bakterijskih proteina i važan su čimbenik bakterijske komunikacije s okolinom (SLEYTR i sur., 2014.). Pomažu



bakteriji u izbjegavanju odgovora imunološkog sustava nosioca (THOMPSON, 2002.). Također, posreduju u vezanju patogene bakterije na epitelne stanice srednjeg crijeva ličinke i smatraju se specifičnim čimbenicima za virulenciju genotipa bakterije *P. larvae* ERIC II (POPPINGA i sur., 2012.). Međutim, još uvijek nije potpuno razjašnjeno što se događa nakon vezanja SplA na površinu epitelnih stanica srednjeg crijeva inficiranih ličinka, kao niti način ulaska u hemocel pčelinje ličinke (EBELING i sur., 2016.). Sinteza proteina površinskog sloja moguća je i kod genotipa bakterije *P. larvae* ERIC V, ali izostaje kod genotipova ERIC I i ERIC III do ERIC IV. To dovodi do zaključka da prisutnost gena za sintezu SplA nije odlučujuća za brzo uginanje inficiranih pčelinjih ličinki, budući da ti geni nedostaju kod genotipova bakterije *P. larvae* ERIC III do ERIC IV (BEIMS i sur., 2020.).

Također, utvrđeno je da određeni ERIC genotipovi bakterije *P. larvae* sadrže gene za sintezu ribosomskih peptida, ali i velike skupine gena sposobne za kodiranje enzimatskih skupina i proizvodnju NRP i PK poput penilarvina, penilamicina, bacilibactina i sevadicina kod napada na epitelne stanice srednjeg crijeva inficirane ličinke (MÜLLER i sur., 2015.; EBELING i sur., 2016.; FÜNFHAUS i sur., 2018.). Pri tome se smatralo da NRP i PK pokazuju antibiotsko djelovanje (EBELING i sur., 2016.). Tako je za genotipove bakterije *P. larvae* ERIC I i ERIC II utvrđeno da proizvode NRP i PK hibrid penilamicin (EBELING i sur., 2016.), dok ERIC II i ERIC III proizvode penilarvin A i C te sevadicin (BEIMS i sur., 2020.). GARCIA-GONZALEZ i suradnici (2014.) utvrdili su antibakterijsko djelovanje sevadicina. DJUKIC i suradnici (2014.) nisu mogli sa sigurnošću potvrditi postojanje penilarvina kod genotipa ERIC I. No, BEIMS i suradnici (2020.) utvrdili su da genotip ERIC I proizvodi penilarvin A i C, isključivo u EBS mediju. Iako penilarvin pokazuje i protugljivičnu aktivnost, ne može se sa sigurnošću potvrditi citotoksičnost penilarvina i bacilibactina, kao ni njihova uloga u virulentnosti bakterije *P. larvae* (SOOD i sur., 2014.; HERTLEIN i sur., 2014.). Međutim, smatra se da penilarvin ima ključnu ulogu kao biosurfaktant kod površinskog gibanju bakterija u obliku roja (FÜNFHAUS i sur., 2018.), te je bitan za uklanjanje crijevne mikrobiote u saprofitskoj fazi (SOOD i sur., 2014.). Također, utvrđeno je da genotipovi ERIC I do ERIC IV vjerojatno sintetiziraju siderofor bacilibactin u uvjetima nedostatka željeza tijekom saprofitne faze (HERTLEIN i sur., 2014.). Nedavno provedena istraživanja potvrđuju da genotip bakterije *P. larvae* ERIC V može također sintetizirati bacilibactin (BEIMS i sur., 2020.). Snažnu antibakterijsku i protugljivičnu aktivnost pokazuje penilamicin koji se smatra odgovornim za uklanjanje mikrobiote iz srednjeg crijeva pčelinje ličinke u ranoj fazi te saprofitskih bakterija poput *P. alvei* u kasnoj fazi raspadanja uginule pčelinje ličinke (MÜLLER i sur., 2014.; EBELING i sur., 2016.). To je u skladu s ranije objavljenim radovima u kojima je potvrđeno

da bakterija *P. larvae* može uspješno ukloniti konkurentnu mikrofloru jer u uginulim i osušenim pčelinjim ličinkama nalazimo samo spore bakterije *P. larvae* (BAILEY i BALL, 1991.; WHITE, 1906.). Time je pretpostavka da bakterija *P. larvae* ima antimikrobna svojstva potvrđena (HOLST, 1945.).

Nakon ulaza u hemocel, vegetativni oblik bakterije *P. larvae* nastavlja s razgradnjom tkiva uginule ličinke i pretvara je u bezobličnu, smeđu i viskoznu masu. U tom stupnju infekcije bakterija *P. larvae* koristi izvanstanični sadržaj i stanične sastavnice tkiva propale ličinke kao izvor hranjivih tvari (NEUENDORF i sur., 2004.). Pri nastanku nepovoljnih životnih uvjeta slijedi sporulacija vegetativnih oblika bakterije u spore. Iako, prema podacima YUE i suradnika (2008.b) sporulacija se događa tijekom ukupnog trajanja infekcije, a ne samo u tkivu propale ličinke, već započinje odmah po uspješnoj kolonizaciji crijeva inficirane pčelinje ličinke. Osušena propala pčelinja ličinka sadrži milijarde novostvorenih infektivnih spora koje su spremne u povoljnim uvjetima proklijati i uzrokovati infekciju (EBELING i sur., 2016.).

#### 2.3.4. KLINIČKA SLIKA

Brzina napredovanja bolesti i pojava karakteristične kliničke slike uvjetovana je razlikom u toleranciji inficiranih ličinaka medonosne pčele na uzročnika bolesti (BRØDSGAARD i sur., 1998.; SPIVAK i REUTER, 2001.; EVANS i PETTIS, 2005.; DECANINI i sur., 2007.), ali i stupnjem genetski specifične virulencije bakterije *P. larvae* (GENERSCH i sur., 2006.; EBELING i sur., 2021.). Postoje različiti mehanizmi tolerancije pčela na uzročnika poput dobne rezistencije i prisutnosti inhibirajućih tvari u hrani (CRAILSHEIM i RIESSBERGER – GALLÉ, 2001.; RIESSBERGER - GALLÉ i sur., 2001.), higijenskog ponašanja odraslih pčela za brzo otkrivanje i uklanjanje uginulih ličinki (SPIVAK i REUTER, 2001.), uloge međucrijeva koje je smješteno na ulazu u srednje crijevo kao filtera spora uzročnika iz probavnog trakta u odraslih pčela (STURTEVANT i REVELL, 1953.) te zaštitne uloge propolisa u pčelinjoj zajednici (BORBA i SPIVAK, 2017.).

AGMP je bolest poklopljenog i nepoklopljenog pčelinjeg legla. Tamne mrlje na donjim dijelovima poklopca nad stanicama saća s leglom su prve uočljive promjene. Kasnije se poklopci nad promijenjenim pčelinjim leglom nabiru i sa sušenjem propale ličinke postupno uvlače u dubinu stanice. Pčele radilice pokušavaju ukloniti poklopce nad stanicama saća koje sadrže uginule ličinke pa se na njima pojavljuju rupice nepravilno izgriženih rubova.



Slika 2. Promjene izgleda poklopaca stanica saća karakteristične za bolesti pčelinjeg legla.

Uginula pčelinja ličinka gubi bijelu boju, kolutičavost, sedefasti sjaj, napetost i karakterističan oblik te se pretvara u mlohavu, bezobličnu, ljepljivu tvar smeđe boje koja se rasteže u tanke niti (SULIMANOVIĆ i sur., 1995.; HANSEN i BRØDSGAARD, 2001.; TOMLJANOVIĆ i sur., 2012.).



Slika 3. Uginula i raspala pčelinja ličinka.

Također, može se uočiti takozvano rešetkasto leglo jer ugibanjem ličinki zaostaje sve više poklopljenih stanica čime se dobiva izgled nepravilno raspoređenog poklopljenog i nepoklopljenog legla na saću. Prisutnost rešetkastog legla ima važno dijagnostičko značenje pri kliničkom pregledu pčelinjih zajednica u jesen kad matica fiziološki smanjuje i konačno prestaje s nesenjem jaja. Starenjem procesa masa propale pčelinje ličinke se smanjuje i povlači prema dnu stanice, a četiri do šest tjedana nakon uginuća priliježe u tankom sloju uz donju stjenku stanice.



Slika 4. Udubljeni poklopci nad stanicama saća koje sadrže uginule pčelinje ličinke.

Nakon dva mjeseca stanica izgleda „prazna“ pa neiskusni promatrač može postaviti lažno negativnu kliničku dijagnozu u terenskim uvjetima. Pri pregledu je važno držati okvir sa sumnjivim izgledom pčelinjeg legla u visini očiju promatrača tako da izvor svjetla dolazi iza njegovog ramena kako bi se lakše uočili ostaci propale ličinke u obliku blagog zadebljanja debljine oko jednog milimetra na donjoj stijenci stanice saća.

AGMP može se pojaviti i u subkliničkom obliku. Naime, utvrđeno je da pčelinje ličinke iz klinički zdrave zajednice mogu sadržavati spore bakterije *P. larvae* u medu (HANSEN i RASMUSSEN, 1986.; HANSEN i sur., 1988.; HORNITZKY i CLARK 1991.; RITTER, 1994.; RITTER, 1996.; VON DER OHE i sur., 1996.), ponajviše u mednom vijencu koji okružuje leglo, ali i drugim vrstama uzoraka iz košnice. Štoviše, HANSEN i RASMUSSEN (1986.) utvrdili su da određene zajednice mogu sadržavati godinama određene količine spora bakterije *P. larvae* u uzorcima meda bez vidljivih karakterističnih kliničkih znakova na leglu.

Također, u pokusno inficiranim pčelinjim zajednicama s infektivnim sporama bakterije *P. larvae* uočene su pojedine pčelinje zajednice u kojima se nije razvila pojava karakteristične vidljive kliničke slike.

### 2.3.5. DIJAGNOSTIKA

Sumnja na AGMP postavlja se na temelju svojstvenih znakova na poklopljenom pčelinjem leglu pri kliničkom i/ili patoanatomskom pregledu pčelinje zajednice, a službena potvrda bolesti postavlja se na osnovi pozitivnog laboratorijskog nalaza uzročnika u uginulim ličinkama (ANON, 2004.; ANON, 2021.). U RH bolest se suzbija na temelju Pravilnika o mjerama suzbijanja i iskorjenjivanja pčelinjih bolesti (ANON, 2004.) i Naredbi o mjerama

zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u tekućoj godini (ANON, 2021.). Sukladno tome obvezno je klinički pretražiti sve pčelinje zajednice. Nakon postavljene sumnje provodi se laboratorijska dijagnostika. Ovlašteni veterinar mora, zasebno iz svake pojedine sumnjive pčelinje zajednice, uzeti uzorak saća s promijenjenim pčelinjim leglom, veličine 10 x10 cm, umotan u zrakopropusnu ambalažu i poslati ga u službeni laboratorij u svrhu pretraživanja.

Međutim, sukladno međunarodnim propisima (ANON, 2019.) mogu se, osim ostataka uginulih ličinki, za laboratorijsku dijagnostiku AGMP uzeti različiti uzorci iz košnice. Tako se spore *P. larvae* mogu izdvojiti iz uzoraka meda (ALIPPI, 1995.; ANTÚNEZ i sur., 2004.), odraslih pčela (LINDSTRÖM i FRIES, 2005.; GILLARD i sur., 2008.), ostataka na podnici košnice (TITERA i HAKLOVA, 2003.; BZDIL, 2007.), peluda (GOCHNAUER i CORNER, 1974.), voska (GOCHNAUER i CORNER, 1987.; BZDIL, 2007.) te iz naizgled zdravih pčelinjih ličinki (PICCINI i sur., 2002.).

Postoji više metoda utvrđivanja spora *P. larvae* u laboratorijskoj dijagnostici (DE GRAAF i sur., 2006.a). Pri tome se često provodi mikroskopiranje karbol - fuksinom obojanog razmaza pčelinje ličinke (HORNTZKY i WILSON, 1989.), a rjeđe različite imunološke metode poput imunodifuznog testa (PENG i PENG, 1979.), imunofluorescencije s poliklonalnim antitijelima (ZHAVNENKO, 1971.), enzimski imunološki test s monoklonalnim antitijelima (OLSEN i sur., 1990.) i imunofluorescencije (OTTE, 1973.). Također, raširena je primjena lančane reakcije polimerazom (PCR) (DOBBELAERE i sur., 2001.a) i bakteriološka pretraga na različitim hranjivim podlogama (RITTER, 1996.). Uzorci se prije nasađivanja moraju zagrijati na temperaturi od 90 °C kroz šest do 10 minuta kako bi se uništili drugi osjetljiviji mikroorganizmi (STEINKRAUS i sur., 1998.). Zbog genotipske različitosti uzročnika inkubacija se provodi tijekom sedam dana, a vrsna specifičnost izraslih bakterijskih kolonija uobičajeno se potvrđuje PCR metodama (DE GRAAF i sur., 2006.a; GENERSCH i sur., 2006.), Plagemann testom (PLAGEMANN, 1985.), testom aktivnosti katalaze (RITTER, 1996.), prema specifičnim biokemijskim osobitostima (KILWINSKI i sur., 2004.; DOBBELAERE i sur., 2001.a) i morfološki na temelju boje, izgleda i površine bakterijskih kolonija (ASHIRALIEVA i GENERSCH, 2006.).

U novije vrijeme primjenjuju se metode rane dijagnostike AGMP (GENERSCH i OTTEN, 2003.; LINDSTRÖM i sur., 2008.b) koja ima snažno uporište u praktičnom pčelarstvu jer se spore *P. larvae* mogu utvrditi dvije do tri godine prije kliničkih znakova bolesti (OLSEN, 1990.; NORDSTÖRM i FRIES, 1995.; TITERA i HAKLOVA, 2003.) u uzorcima meda iznad legla, odraslih pčela, vosku te iz uzoraka ostataka na podnici košnice tijekom i nakon zime.

Tako se može provoditi rutinska godišnja pretraga navedenih uzoraka iz pojedinih košnica, a u pozitivnim slučajevima detaljno se pregledava cijeli pčelinjak i obavlja sanacija bolesti (DE GRAAF i sur., 2006.b). LINDSTRÖM (2008) smatra da su odrasle pčele najbolji materijal za ranu dijagnostiku AGMP jer je utvrđena povezanost između broja spora *P. larvae* u uzorku odraslih pčela i postotka ugibanja pčelinjih ličinkama u košnici. Ta saznanja omogućuju predviđanje vremena potrebnog od infekcije do pojave vidljivih karakterističnih kliničkih znakova bolesti. Tako jedna vidljivo karakteristično promijenjena ličinka u saću upućuje na oko 11 % pozitivnih pčela u pčelinjoj zajednici.

Stoga RITTER (2003.) smatra da rana dijagnostika AGMP može biti temelj uspješnog programa suzbijanja AGMP na nekom području.

### **2.3.6. SANACIJA I ISKORJENJIVANJE**

U RH način sanacije i suzbijanja američke gnjiloće provodi se sukladno Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2021. godini (ANON, 2021.). AGMP se nalazi na listi prenosivih zaraznih bolesti (ANON, 2016.) koje su od socio-ekonomskog i općeg zdravstvenog značaja za međunarodnu trgovinu pčela i pčelinjih proizvoda, sukladno međunarodnim propisima Svjetske organizacije za zdravlje životinja (OIE). Mjere suzbijanja predviđaju spaljivanje ili pretresanje bolesne pčelinje zajednice, ali i završnu dezinfekciju opreme, pribora, alata i okoliša – pčelinjaka (ANON, 2004.).

Spaljivanje predstavlja najbrži, najučinkovitiji i najskuplji način suzbijanja bolesti, a pretresanje uključuje narušavanje proizvodnosti pčelinje zajednice i učestale recidive klinički vidljivih znakova karakterističnih za bolest, a ponajviše zbog izostanka ili loše provedbe dezinfekcijskih mjera. U nekim zemljama, poput Sjedinjenih američkih država (SAD), dozvoljena je uporaba antibiotika (EVANS, 2003.; GENERSCH, 2010.), ali uz strogi nadzor i odobrenje nadležne veterinarske službe (FDA, 2021.). Međutim, unutar Europske unije (EU) nije dozvoljena uporaba antibiotika u liječenju bolesti pčela (EU 3/01/081).

Naime, uporaba antibiotika pomaže u prikrivanju kliničkih znakova bolesti, a ne djeluje na spore, koje su jedini infektivni oblik uzročnika i time odgovorne za nastanak i širenje bolesti. Uporaba antibiotika pospješuje pojavu recidiva bolesti (OLDROYD i sur., 1989.; OLDROYD i OSBORNE, 1999.). Također, utvrđeni su pojedini izolati bakterije *P. larvae* koji pokazuju rezistenciju na višekratno korištene antibiotike (MIYAGI i sur., 2000.; EVANS, 2003.; ALIPPI



i sur., 2007.). Naravno da se primjenom prakse uporabe antibiotika u pčelarstvu povećava mogućnost utvrđivanja njihovih rezidua ili njihovih razgradnih metabolita u pčelinjim proizvodima (HAMMEL i sur., 2008.; LOPEZ i sur., 2008.; BARGAŃSKA i sur., 2011.).

Različiti biljni pripravci, aromatska ulja, propolis i probiotici pokazuju inhibitorni učinak na rast i razmnožavanje bakterije *P. larvae* (ALONSO-SALCES i sur., 2017.). Međutim, njihova uporaba u svrhu učinkovitog sprečavanja i kontroliranja AGMP u terenskim uvjetima na pčelinjacima nije primjenjiva niti moguća.

U pčelinjaku u kojem je utvrđena AGMP naređuje se zabrana selidbe i trgovine pčelama, pčelinjim proizvodima i pčelarskom opremom do okončanja provođenja naređenih mjera. Obvezan je klinički pregled svih pčelinjih zajednica u pčelinjaku, a u zajednica u kojih se sumnja na bolest i slanje uzoraka na laboratorijsku pretragu. Također, obvezan je klinički pregled svih pčelinjih zajednica u području tri kilometra od zaraženog pčelinjaka, a u pčelinjih zajednica u kojih se sumnja na bolest i laboratorijska pretraga na američku gnjiloću. Nužna je dezinfekcija pčelinjaka odgovarajućim dezinfekcijskim sredstvom ili opaljivanjem plamenom drvenih dijelova pčelarske opreme (ANON, 2004.). Ovisno o epizootiološkoj situaciji, naređuje se mjere spaljivanja košnice, uključujući pčelinju zajednicu ili pretresanje pčela.



Slika 5. Spaljivanje košnica je učinkovit način sanacije AGMP.

Spaljivanje košnica s pčelinjom zajednicom naređuje se ako je zajednica slaba odnosno ako je bolest već u podmakloj fazi razvoja. Također, spaljivanje je indicirano ako se bolest pojavljuje rijetko u određenom kraju, zatim u zajednicama koje su smještene u košnicama s nepokretnim saćem (pletare, dubine, daščara) te na uzgajalištima matica. Bolesna pčelinja zajednica se uguši paljenjem sumpornih traka, a saće s leglom i ugušene pčele se spale u iskopanoj jami koja se poslije zatrpa zemljom (TOMLJANOVIĆ i sur., 2012.). Pčelinje zajednice u pletarama i dotrajalim košnicama i priborom spale se zajedno s košnicama. Dijelovi košnica koji su služili isključivo kao medišta, a koje su u dobrom stanju mogu se detaljno

mehanički očistiti, struganjem saća i propolisa, a zatim dezinficirati opaljivanjem plinskim plamenikom ili kuhanjem u vodenoj otopini natrijevog hidroksida (TRAYNOR, 2008.; BEDNÁŘ i sur., 2009.).

Pretresanje pčela može se provoditi isključivo kod jakih pčelinjih zajednica smještenih u novim košnicama koje dosad nisu bile podvrgnute dezinfekciji (DEL HOYO i sur., 2001.; LINDSTRÖM, 2006.; PERNAL i sur., 2008.). Pri pretresanju se spaljuju svi okviri koji sadrže i jednu stanicu legla, uklanjaju okviri sa zaraženim pčelinjim leglom, medom i peludom, a samo odrasle pčele se stresu u novu praznu košnicu. Prilikom gradnje novog saća s tijela odraslih pčela mehanički se uklanjaju spore *P. larvae*. Također, spore *P. larvae* u probavnom sustavu odraslih pčela budu probavljene. Na osnovu navedenih razloga smatra se da je tako pčelinjoj zajednici omogućen daljnji razvoj u novoj košnici. Iako je prema podacima iz literature preporučeno dvostruko pretresanje (MUNAWAR i sur., 2010.), LINDSTRÖM (2006.) dokazuje da nema značajne epizootiološke razlike između jednostrukog i dvostrukog pretresanja.

Odrasle pčele se otesu izravno u košnicu (ili prvo na kartonski papir ili limeni sipaonik, pa onda u košnicu) s letvicama (satonošama) na koje je stavljena dva centimetra duga satna osnova. Nakon 48 do 72 sata pčele s novoizgrađenog saća se pretresu u košnicu sa satnim osnovama. Saće s leglom treba neškodljivo uništiti spaljivanjem, a novoizgrađeno saće na satonošama okvira i ostalo saće nakon iskorištavanja pretopiti u vosak (KANE i FAUX, 2021.).



Slika 6. Pretresanje pčelinjih zajednica.

U posljednje vrijeme pojavljuje se interes za primjenu bakterifoga u kontroli i suzbijanju AGMP (BEIMS i sur., 2015.; TSOURKAS, 2020.). Razlog za to pronalazi se u spoznaji da se bakteriofazi mogu relativno lagano otkriti te da se koriste već duže vrijeme u liječenju infekcija u ljudi. Naime, bakteriofazi se autodoziraju na mjestu infekcije i pokazuju neznatnu toksičnost.



Zbog specifičnosti za nosioca, bakteriofazi ne uzrokuju znatne promjene u sastavu normalne flore. Način djelovanja im je drugačiji od antibiotika te postoji mala vjerojatnost pojavljivanja rezistencije na njihovo djelovanje. Također, bakteriofage možemo promatrati kao ekološki prihvatljive proizvode jer potječu iz neposredne prirode. Do sada je sekvencirano 48 genoma bakteriofaga *P. larvae*. Utvrđeno je da svi bakteriofazi bakterije *P. larvae* kodiraju enzim amidazu koja uzrokuje lizu peptidoglikana u staničnoj membrani *P. larvae*. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se primjena bakteriofaga *P. larvae* mogla uvesti kao rutinska metoda u kontroli i suzbijanju AGMP. Posebno je važno da terapijski bakteriofazi liziraju određene sojeve ciljanih bakterija, a da pri tome očuvaju mikrobiotu u pčela i cijeli habitat oko pčelinjaka. Također, još uvijek je nepoznanica kako bakteriofag penetrira u bakteriju *P. larvae* i uzrokuje njezinu lizu, odnosno, kako se *P. larvae* brani od bakteriofaga.

## **2.4. DEZINFEKCIJA - STERILIZACIJA U PČELARSTVU**

Dezinfekcija uključuje postupke kojima je cilj smanjiti broj patogenih mikroorganizama u neživim sredinama, površinama, predmetima, tekućinama i zraku ispod infekcijske doze, a sterilizacija podrazumijeva proces fizikalnog ili kemijskog uništenja svih mikroorganizama (BLOCK, 2001.). Budući je sterilizacija mnogo složeniji i skuplji postupak, dezinfekcija je učinkovit i zadovoljavajući postupak u mnogim slučajevima. Poznavanje tehnika i provedba mjera dezinfekcije u pčelarskoj proizvodnji utječu na biološko-uzgojno stanje pčelinjih zajednica te kvalitetu meda i drugih pčelinjih proizvoda. Najnoviji podaci iz Južne Amerike pokazuju da svega 54,7 % pčelara provodi dezinfekcijske mjere u vidu primjene opaljivanja plamenom i/ili kuhanja u vodenoj otopini kaustične sode (OLATE-OLAVE i sur., 2021.).

BEDNÁŘ i sur. (2009.) opisali su različite oblike fizikalne i kemijske dezinfekcije pčelarskog pribora i opreme. Također, navode da uspjeh provedbe dezinfekcijskih mjera u pčelinjaku ovisi o pravilnom izboru dezinficijensa, spektru mikroorganizama koji se žele uništiti, preporučenoj koncentraciji radnih otopina i načinu primjene dezinficijensa, dužini trajanja izlaganja dezinficijensu, te materijalu koji se dezinficira sa stanovišta njegovog mogućeg oštećenja i učinka na okoliš. Međutim, dezinfekcijski učinak ovisi i o fiziološkim svojstvima mikroorganizama. Posebice se to odnosi na starost odnosno stupanj razvoja mikroorganizma, sadržaj pigmenta, vrstu podloge potrebnu za rast te otpornost pojedinih vrsta mikroorganizama. Uočeno je da dezinficijensi ponekad imaju selektivni učinak na određene

mikroorganizme odnosno da može doći do inhibirajućeg ili pak pojačanog djelovanja ako se međusobno kombiniraju dva ili više dezinficijensa.

#### **2.4.1. MEHANIZMI DJELOVANJA DEZINFICIJENSA**

Dezinficijensi imaju značajan učinak na funkciju mnogih makromolekula (ugljikohidrati, masti, bjelančevine, nukleinske kiseline) i struktura koje su građene od tih makromolekula unutar mikroorganizama (VAN IMMERSEEL i sur., 2018.). Strukture koje se nalaze na vanjskoj površini bakterija su često primarna mjesta djelovanja dezinficijensa (McDONNELL i RUSSELL, 1999.). Nakon interakcije s površinskim strukturama moguće su daljnje interakcije dezinficijensa s citoplazmatskom membranom (DENYER, 1995.), narušavanja stanične homeostaze odnosno inhibicije enzimatske aktivnosti, transporta elektrona i oksidativne fosforilacije (KUYAKANOND i QUESNEL, 1992.).

McDONNELL (2008.) navodi koagulaciju, oksidaciju, prijenos energije te promjene u propusnosti stanične membrane i poremećaje u staničnoj strukturi mikroorganizama kao četiri najvažnija načina kemijskog djelovanja dezinficijensa. Tako aldehidi, fenoli i alkoholi dovode do križnog povezivanja dezinficijensa s različitim makromolekulama mikroorganizama i njihovom posljedičnom koagulacijom. Dezinficijensi na bazi klora, vodikovog peroksida, ozona i etilen oksida uklanjaju elektrone iz bjelančevina, masti i nukleinskih kiselina u mikroorganizama te tako dolazi do njihove oksidacije. Prijenos energije u obliku topline ili zračenja na mikroorganizme dovodi do denaturacije nukleinskih kiselina, fragmentacije i/ili koagulacije bjelančevina i oksidacije masnih kiselina u stanici mikroorganizma dok neki dezinficijensi poput kvarternih amonijevih spojeva i bigvanida posjeduju sposobnost narušavanja propusnosti bakterijske stanične membrane i izazivanja poremećaja u njihovoj strukturi.

S epizootiološkog stanovišta dezinfekcija može biti preventivna odnosno žarišna (BEDNÁŘ i sur., 2009.). Preventivna dezinfekcija obuhvaća postupke i mjere kada zarazna bolest nije prisutna u pčelinjaku ili njegovoj bližoj okolini. Redovito se provodi u okviru smjernica dobre pčelarske prakse i predstavlja sastavni dio normalne higijene u pčelinjaku. Održavanje pčelinjaka, opreme, pribora, hrane i vode za pčele u čistom stanju predstavlja osnovu preventivne dezinfekcije.

Žarišna dezinfekcija provodi se kada je zarazna bolest prisutna u pčelinjaku i ima za cilj uklanjanje mikroorganizama iz žarišta infekcije kako bi se spriječilo njeno daljnje širenje.

Prema načinu izvedbe može biti kontinuirana i završna. Kontinuirana dezinfekcija podrazumijeva sustavne i ponavljajuće postupke od trenutka pojave žarišta infekcije u pčelinjaku. Može biti kombinirana s veterinarsko upravnim mjerama sanacije bolesti poput spaljivanja pčelinjih zajednica. Pod završnom dezinfekcijom smatramo jednokratni postupak nakon provedenih mjera sanacije bolesti.

#### 2.4.2. METODE DEZINFEKCIJE

Dezinfekcija se najčešće provodi mehaničkim čišćenjem, te fizikalnim i kemijskim postupcima (VAN IMMERSEEL i sur., 2018.). Mehanički postupci, poput čišćenja, struganja i pranja, uklanjaju nečistoće i organsku tvar u kojoj su uklopljeni mikroorganizmi te na taj način olakšavaju postupak dezinfekcije (RUANO i sur., 2001.; MOUSTAFA GEHAN i sur., 2009.). Naime, uočeno je da su mnogi dezinficijensi nedjelotvorni u prisutnosti nečistoća i organske tvari. Također, sredstva za čišćenje - detergentski, sapuni i prašci za ribanje smanjuju broj mikroorganizama i uklanjaju ih s površina i predmeta (DEWAELE i sur., 2012.; LUYCKX i sur., 2015.; MAERTENS i sur., 2017.).



Slika 7. Mehaničko čišćenje drvenih dijelova košnice struganjem površinskog sloja.

Fizikalni postupci dezinfekcije podrazumijevaju uporabu vlažne ili suhe topline te zračenja (DVORAK, 2005.; RUTALA i WEBER, 2013.). Iako uporaba topline predstavlja jedan od najstarijih postupaka fizikalne dezinfekcije (BYERS, 2020.), postoje određene razlike u primjeni i očekivanom rezultatu dezinfekcije između vlažne i suhe topline. Tako, vlažna toplina brže djeluje u kraćem razdoblju i učinkovitija je u usporedbi sa suhom toplinom (QUINN i MARKEY, 2001.).

Spaljivanje košnica, pčelinjih zajednica te ostalog pribora, opreme i alata predstavlja učinkovit način sanacije AGMP (APHA 2014.). Međutim, opaljivanje plamenom potpuno uništava spore bakterije *P. larvae* samo na površinskim dijelovima drvenih košnica, dok značajan broj infektivnih spora ostaje aktivan u unutarnjim strukturama drveta. Rezultati provedenih suspenzijskih testova djelomice objašnjavaju zašto je otežana dezinfekcija unutarnjih struktura drveta (DEL HOYO i sur., 1998.). Naime, drvena vlakna ponašaju se poput organske tvari koja, već u koncentraciji od 2 %, znatno smanjuje učinak površinske dezinfekcije. Stoga su DOBBELAERE i suradnici (2001.b) pobili uvriježeno mišljenje pčelara da je metoda opaljivanja drvenih dijelova pčelarske opreme i pribora plamenom dovoljna dezinfekcijska mjera.

Primjena toplog zraka u pećnicama ili sušilima na temperaturi između 110 °C i 150 °C kroz trideset minuta pokazala se učinkovitom u dezinfekciji manjih predmeta i materijala, posebice ako toplina prodire do tri milimetra u dubinu (BEDNÁŘ i sur., 2009.). Isti autori navode da kuhanje u vodi pod normalnim pritiskom kroz trideset minuta uz dodatak 1 do 2 % natrijevog karbonata ili kuhanje u vodi pod pritiskom kroz dvadeset minuta uspješno uništava spore uzročnika AGMP.

LEWIS i MCINDOE (2004.) opisali su primjenu vodene pare pod umjerenim pritiskom i minimalnom temperaturom od 121 °C kroz petnaest minuta, odnosno, najvišom temperaturom od 134 °C tijekom tri minute. U tim uvjetima vodena para je suh i zasićen medij. Međutim, BEDNÁŘ i suradnici (2009.) navode uspješan učinak primijenjene vodene pare pod umjerenim pritiskom pri minimalnoj temperaturi od 110 °C tijekom 45 minuta za dezinfekciju okvira za košnice i manjih pčelarskih predmeta.

Postoji mogućnost uspješne primjene gama zračenja u dezinfekciji sporama bakterije *P. larvae* onečišćenog saća (HORNITZKY i WILLS, 1983.; TREMBLAY, 2010.). No, visoka cijena tretiranja kao i potreba transportiranja zaraženog materijala u mjesto gdje se provodi gama zračenje čine ovu metodu neprikladnom za praktično pčelarstvo (BEDNÁŘ i sur., 2009.).

Kemijski postupci dezinfekcije uključuju uporabu različitih dezinficijensa čiji izbor ovisi o spektru mikroorganizma koji se želi uništiti, prisutnosti organske materije na površini, uvjetima okoliša i otrovnosti dezinficijensa za ljude, životinje i okoliš (VAN IMMERSEEL i sur., 2018.). Tako, aldehidi, halogeni spojevi i oksidansi pokazuju učinak na bakterijske endospore dok anorganske kiseline, alkalne soli i fenoli imaju ograničeni učinak (McDONNELL i RUSSELL, 1999.; ŠULJAGIĆ, 2008.). Primjena alkohola ne uništava bakterijske endospore (LEWIS i MCINDOE, 2004.). OKAYAMA i suradnici (1997.) utvrdili su visoku i brzu sporicidnu aktivnost glutaraldehida i natrijevog hipoklorita na spore bakterije

*P. larvae*. Također, primjena 0,5 % vodene otopine natrijevog hipoklorita odnosno 1,1 % otopine kaustične sode uništavaju spore *P. larvae* (APHA, 2014.).



Slika 8. Primjena kuhanja drvenih okvira u vodenoj otopini kaustične sode.

BEDNÁŘ i suradnici (2009.) navode da se učinkovitost vodenih otopina kalij hidroksida, natrij hidroksida i natrij karbonata u koncentracijama od 2 do 6 % povećava pri temperaturama od 80 °C i više. Biocidnu učinkovitost dva komercijalno dostupna dezinficijensa, Disinfection for beekeeping i Virkon S na bakteriju *P. larvae* uspoređivali su KIRIAMBURI i suradnici (2021.). Učinak dezinficijensa promatran je u suspenziji spora *P. larvae* te na površini drva i stiropora koji su inokulirani sporama bakterije *P. larvae*. Disinfection for beekeeping pokazao je 100 % biocidni učinak na spore u suspenziji dok je Virkon S imao učinak između 87 i 88,6 % u istom mediju. Međutim, Virkon S je pokazao značajno bolji sporocidni učinak na *P. larvae* na stiroporu. Oba dezinficijensa imala su gotovo jednak, ali ipak slabiji dezinficijenski učinak na drvu, a u usporedbi s učinkom na spore u suspenziji i na stiroporu.

Dezinfekcijski učinak blago kisele vode s hipokloričnom kiselinom i slabo zakiseljene vode s klorovodičnom kiselinom na spore bakterije *P. larvae* kao i njihovu učinkovitost na pojedine genotipove *P. larvae* istraživali su OHASHI i suradnici (2020.). Oba ispitivana dezinficijensa pokazala su snažan biocidni učinak u suspenzijskim testovima bez prisutnosti organske tvari. Tako je utvrđeno da blago kisela voda s hipokloričnom kiselinom u koncentraciji 10 do 30 ppm klora smanjuje broj spora *P. larvae* u saću mnogo učinkovitije nego voda. Pri tome se dezinfekcijski učinak smanjivao ako je saće bilo starije i onečišćeno organskom tvari, te kad se postupak provodio pri temperaturi od 4 °C. Znatno jači dezinfekcijski učinak pokazala je slabo zakiseljena voda s klorovodičnom kiselinom u koncentraciji od 600 ppm klora uz prisutnost organske tvari i pri nižim temperaturama. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da se oba dezinficijensa mogu koristiti za dezinfekciju pčelarske opreme, a izbor

dezinficijensa i uspješnost postupka ovisi o stupnju onečišćenja saća i pojedinom genotipu bakterije *P. larvae*. Primjerice, djelovanje blago kisele vode s hipokloričnom kiselinom na spore bakterije *P. larvae* u suspenzijskim testovima i na saću bilo je znatno brže kod ERIC I nego kod ERIC II genotipa. Međutim, da bi se pokazala jasna povezanost između genotipova bakterije i osjetljivosti na dezinficijens, bilo je potrebno testirati barem nekoliko sojeva za svaki genotip.

HAKLOVA i suradnici (2003.) utvrdili su da je učinkovitost magnezij monoperoksifalata heksahidrata, kao sastavnog dijela dezinficijensa „Dismozon“, na spore bakterije *P. larvae* znatno veća u usporedbi s otopinom kaustične sode pri sobnoj temperaturi. Rezultati provedenih istraživanja pokazuju da otopina jodoforma smanjuje broj spora *P. larvae* s  $1 \times 10^6$  na  $1 \times 10^4$  u laboratorijskim uvjetima, te se može koristiti povremeno i preventivno u pčelarskoj praksi (TYL i sur., 2015.). Također, zasad nije utvrđena oralna i/ili kontaktna otrovnost za pčele, kao niti mogući štetni učinak jodoforma na kvalitetu meda.

Rezultati nedavno provedenih istraživanja ukazuju na sporocidnu učinkovitost plina klornog dioksida ( $\text{ClO}_2$ ) na *P. larvae* u vodi i na površinama različitih materijala (MAHDI i sur., 2022.). Mehanizam djelovanja klornog dioksida na spore *P. larvae* još nije potpuno objašnjen, ali se vjeruje da  $\text{ClO}_2$  djeluje na aminokiseline, uzrokujući oksidativno oštećenje proteina koji su uključeni u klijanje spore. Međutim, to bi se trebalo potvrditi biokemijskim analizama strukture proteina, te elektronskom mikroskopijom utvrditi promjene u strukturi spora. Dobiveni rezultati pokazuju kako se plin klorni dioksid može koristiti u rutinskoj dezinfekciji pčelarskog alata i pribora. No, potrebne su visoke koncentracije plina izložene kroz duže vremensko razdoblje. Učinkovita razina plina je 645 do 811 ng / mL  $\text{ClO}_2$  tijekom 30 minuta, 191 do 198 ng / mL tijekom jednog sata, 21 do 18 ng / mL tijekom 2 sata i 7 do 16 ng / mL  $\text{ClO}_2$  tijekom 4 sata. Za dezinfekciju površina, koncentracije od 214 do 245 ng / mL  $\text{ClO}_2$  tijekom jednog sata i 191 do 200 ng / mL  $\text{ClO}_2$  tijekom dva sata potpuno inaktiviraju spore bakterije *P. larvae*. Zbog zahtjevnog postupka fumigacije, potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi uporaba plina  $\text{ClO}_2$  ušla u rutinsku primjenu u pčelarstvu.

DINGMAN (2011.) je, koristeći iskustva HILGRENA i suradnika (2007.), istraživao djelovanje 23 % vodikovog peroksida i 5,3 % peroctene kiseline na spore bakterije *P. larvae*. Primijenio je vodenu otopinu vodikovog peroksida i peroctene kiseline u razrjeđenju od 1 : 250 i 1 : 500. Pri temperaturi od 25 °C broj bakterijskih kolonija smanjio se s 5 log veličine na 1 log veličinu tijekom 14 minuta, a u razrjeđenju 1 : 500, odnosno, tijekom 10 minuta u razrjeđenju 1 : 250. U slučaju veće količine spora bakterije *P. larvae*, vjerojatno bi trebalo duže izlaganje kako bi se broj bakterijskih kolonija smanjio ispod razine detekcije.

Također, na temelju zaključaka HILGRENA i suradnika (2007.) može se pretpostaviti da različite temperature pri postupku biocidnog tretmana *P. larvae* uzrokuju različito vrijeme za inaktivaciju spora.

Antibakterijski učinak organosilicijske kvartarne soli (alkoksilana) na spore i vegetativni oblik bakterije *P. larvae* istraživali su ÖZKIRIM i YALÇINKAYA (2011.). Utvrđeno je da alkoksilan inhibira klijanje spora i vegetativni rast bakterije *P. larvae* u laboratorijskim uvjetima. Također, tijekom pokusa nije utvrđena otrovnost za odrasle pčele držane u kavezićima pri laboratorijski kontroliranim uvjetima, prilikom, ni nakon izravnog prskanja 1 % vodene otopine alkoksilana. Stoga autori smatraju da je moguća uporaba 1 % vodene otopine alkoksilana u preventivne svrhe u proljeće i jesen radi zaštite pčelinjih zajednice od bakterijskih i gljivičnih infekcija pogodovanih visokom razinom vlage u košnicama. Naime, alkoksilan je nova vrsta kationskog surfaktanta s hidrofobnim skupinama koje sadrže silicij, a nastaje kao posljedica hidrolize kvarternih amonijevih spojeva. Pri tome visoke koncentracije kvartarnog amonij klorida narušavaju strukturu bakterijske stanične membrane dovodeći do lize stanice (VETTER i sur., 2009.).

Djelovanje pimarinske kiseline na spore bakterije *P. larvae* istraživali su SONG i suradnici (2020.). Utvrdili su da pimarinska kiselina uspješno djeluje na spore bakterije *P. larvae* s minimalnom inhibicijskom koncentracijom od 6,25 µg/mL na obogaćenoj Mueller – Hintonovoj hranjivoj podlozi (MYPGP) nakon 48 sati inkubacije. U agar difuzijskom testu izmjerena je zona inhibicije od 10 do 14 milimetara. Rezultati upućuju na zaključak da pimarinska kiselina vjerojatno inhibira stvaranje biofilma bakterije *P. larvae* te oštećuje plazmatsku membranu uzrokujući pri tome istjecanje sadržaja.

Antagonističko djelovanje različitih rodova bakterija iz vrsta *Bacillus* i *Brevibacillus*, na *P. larvae* i uzročnika vapnenastog legla (*Ascospaera apis*) istraživali su BARTEL i suradnici (2019.). Naime, većina vrsta iz roda *Bacillus* kao i srodni rodovi proizvode široku paletu antimikrobnih spojeva poput peptida, lipopeptida, bakteriocina i inhibitora slične bakteriocinu. Utvrđeno je da antagonistički odgovor ovisi o mediju, pripadnosti soju te je specifičan za vrstu. Molekularnim alatima istražena je prisutnost i distribucija homolognog slijeda devet gena koji kodiraju sintezu antimikrobnih peptida u sojevima antagonista. Lančanom reakcijom polimerazom utvrđena je prisutnost peptida bacilomicina L, fengicina, bacilizina, subtilina, iturina A i surfaktina. Njihova raspodjela i učestalost unutar bakterijskih antagonista je promjenjiva i ovisi o soju. Tako su najčešći surfaktini, iturini i bacilizini. Nadalje, utvrđena je korelacija između prisutnosti gena antimikrobnog peptida i gena antagonističkog djelovanja. Naime, 85 % antagonista sadržavao je barem jedan od antimikrobnih peptidnih

gena. Također, utvrđena je povezanost između antagonističkog djelovanja pojedinih peptida i određenog genotipa bakterija *P. larvae*. Primjerice, većina sojeva bakterije *Brevibacillus laterosporus* sadrži gene za sintezu peptida subtilina i surfaktina te pokazuje izrazito antagonističko djelovanje na genotipove bakterije *P. larvae* ERIC I i ERIC IV. Međutim, djelovanje istih sojeva na ERIC II je gotovo beznačajno.

IORIZZO i suradnici (2020.) istraživali su utjecaj bakterije *Lactiplantibacillus plantarum* na *P. larvae*. Pet sojeva *L. plantarum* (P8, P25, P86, P95 i P100) djelovalo je antagonistički na bakteriju *P. larvae* ATCC 9545. Pri tome su spomenuti sojevi pokazali prikladna fizikalna i biokemijska svojstva (hidrofobnost, autoagregacija, proizvodnja egzopolisaharida, osmotska tolerancija, enzimska aktivnost i asimilacija ugljikohidrata) za njihovu upotrebu kao probiotika u prehrani pčela i otvorili mogućnost novih strategija u bio-kontroli AGMP. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja u svezi sastavnica egzopolisaharida i njihove uloge u inhibiciji klijanja spora, tvorbi biofilma i vegetativnom rastu bakterije *P. larvae*. Također, dobiveni rezultati ukazuju da svojstva hidrofobnost i autoagregacija ovise o soju, a ne o vrsti bakterije pa je odabir i dostupnost novih bakterija s funkcionalnim osobitostima i antagonističkim djelovanjem protiv bakterije *P. larvae* uvjet za buduću praktičnu primjenu u pčelarstvu.

Inhibitorni učinak indolovih analoga na bakteriju *P. larvae* istraživali su ALVARADO i suradnici (2017.). Pri tome su koristili rezultate prethodnih istraživanja u kojima su utvrdili da u laboratorijskim uvjetima l-tirozin i mokraćna kiselina potiču klijanje, dok fenol i indol inhibiraju klijanje spora bakterije *P. larvae* (ALVARADO i sur., 2013.). U pokusu je potvrđeno da indoli, supstituirani halidima, inhibiraju klijanje spora *P. larvae* u laboratorijskim uvjetima te sprječavaju pojavnost AGMP na ličinkama pčela uzgojenim u laboratorijskim uvjetima. Također, indoli nisu toksični niti za vegetativne oblike bakterije *P. larvae* ni za ličinke pčela. Najbolji se pri tome pokazao 5-klorindol. Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost razvoja jeftinog, lako primjenjivog i neotrovnog načina kontrole i suzbijanja AGMP.

### **2.4.3. DEZINFICIJENSI**

#### **2.4.3.1. Ecocid S**

Proizvođač Ecocid S deklarira kao dezinficijens i opći biocidni pripravak. Na tržište dolazi kao vodotopivi, ružičasto-sivi prašak za pripremu radne otopine za dezinfekciju. Ecocid S sadržava kalijev peroksimonosulfat, natrijev dodecilbenzensulfonat, sulfaminsku kiselinu te



pomoćne tvari kao natrijev klorid, jabučnu kiselinu, natrijev heksametafosfat, miris kore limuna i bojilo Dyacid red.

U deklaraciji se navodi da Ecocid S brzo i učinkovito uništava sve poznate patogene viruse, Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te gljivice uzrokujući pri tome oksidaciju glikoproteina, polipeptida i nukleinskih kiselina mikroorganizama. Temelj njegovog djelovanja je tvorba oksidacijskog kompleksa koji djeluje na osnovi sinergističkog kiselog peroksidnog sustava (peroksimonosulfat i sulfaminska kiselina) i površinski aktivne tvari (dodecilbenzensulfonat - surfaktant).

Upotrebljava se za dezinfekciju površina, predmeta, opreme, zraka i sustava za napajanje te ima široku namjenu za opću uporabu. Radna otopina Ecocid-a S može se koristiti u obliku spreja, maglice, kupke i dezinfekcijskih barijera za tretiranje prethodno očišćenih površina i opreme kao 1 %-tna vodena otopina. Raskuživanje površina može se obaviti ručnim nanošenjem ili orošavanjem pomoću prskalice, a za dezinfekciju zraka koriste se raspršivači ili zamagljivači. Nakon 10 do 60 minuta, ovisno o stupnju onečišćenja, isperu se površine čistom vodom.

Mjere opreza nalažu da se prije raskužbe iz prostorije treba ukloniti sve životinje i ponovno ih vratiti kada se tretirane površine osuše. Poslije raskužbe čistom vodom treba isprati sve površine koje su bile u dodiru sa životinjskom hranom. Ecocid S nadražuje oči, kožu, sluznice i štetan je ako se proguta ili inhalira te može uzrokovati i opekline. Prilikom pripreme radne otopine dezinficijensa i njezine primjene preporučeno je nošenje gumenih rukavica, zaštitne odjeće, zaštitne polumaske za lice s prikladnim filtrom te zaštitne naočale. Po završetku rada ruke treba oprati vodom i sapunom.

Pohranjuje se u dobro zatvorenom originalnom pakiranju, na suhom i tamnom mjestu, pri temperaturi do 30 °C i dalje od zapaljivih tvari, a izdaje se bez veterinarskog recepta. Na tržište dolazi kao kutija u kojoj je 25 vrećica s po 50 g praška u svakoj vrećici ili kao plastične vrećice s 1 i 2,5 kg praška.

#### **2.4.3.2. Sekusept aktiv**

Prema uputama proizvođača Sekusept Aktiv je granulat, namijenjen za ručno čišćenje i dezinfekciju. Pokazuje visoku učinkovitost čišćenja površina čak i u prisutnosti većih količina organskog onečišćenja uz istovremenu dezinfekciju. Biocidno djeluje na bakterije, viruse i gljivice na osnovi aktivnog kisika koji se oslobađa iz peroctene kiseline i interferira s proteinima

stanične stijenke te enimatskim i genetskim materijalom unutar same stanice. Međutim, nije pogodan za dezinfekciju materijala od aluminijske, bakra i njihovih legura.

U deklaraciji se navodi da nije utvrđena nekompatibilnost s drugim aktivnim tvarima te je potpuno razgradiv. Pri djelovanju ne stvara pjenu pa je pogodan za predpranje i dezinfekciju materijala prije mehaničkog čišćenja kod uporabe aldehida. Miješanjem granulata s vodom stvara se aktivna tvar tijekom 15 minuta i ostaje stabilna 24 sata. Kontaktno vrijeme za visoki stupanj dezinfekcije iznosi 15 minuta, a za sporocidnost 30 minuta. Na tržište dolazi kao plastična kanta zapremine 1,5 kg.

#### **2.4.3.3. Incidin Oxyfoam S**

Prema deklaraciji Incidin Oxyfoam S je dezinficijens širokog spektra djelovanja na viruse, bakterije i gljivice. Također, opisan je kao sporocidan proizvod. Na tržištu se nalazi kao proizvod pripremljen za primjenu u obliku bezbojne tekućine u plastičnoj kanti od 750 mililitara ili 5 litara. Nije pogodan za primjenu na površinama od mramora, bakra i mjedi. Glavna sastavnica je vodikov peroksid, a njegova uporaba ograničena je na profesionalnu i industrijsku djelatnost.

Potrebno kontaktno vrijeme s dezinficijensom iznosi 30 sekundi do 15 minuta ovisno o vrsti patogenog mikroorganizma. Primjenjuje se prskanjem po površini, a zatim nakon potrebnog vremena obriše krpom.

#### **2.4.3.4. Despadac proizvodi**

Na temelju deklaracije Despadac proizvodi su dezinficijensi širokog spektra djelovanja (virusi, bakterije i gljivice) koji se koriste za čišćenje i dezinfekciju prostorija, pribora i opreme. Lako su topivi u vodi te su preporučeni za primjenu u pčelarstvu. Primjenjuju se u zatvorenim prostorima bez prisutnosti živih životinja.

Na tržištu su najzastupljeniji proizvodi Despadac i Despadac Secure. Prema proizvođaču razlika je u sastavu te u potrebnoj koncentraciji kod provođenja systemske dezinfekcije. Tako Despadac sadrži 10 % didecil-dimetil amonij klorida i 4 % glutaraldehida dok Despadac Secure sadrži 9,18 % didecil-dimetil amonij klorida i 10,2 % glutaraldehida.

Također, Despadac se koristi u 0,4 % koncentraciji, a Despadac Secure u 0,5 % kod systemske dezinfekcije. Despadac Secure pokazuje virucidni učinak u 2 % koncentraciji, a baktericidni i fungicidni u 0,5 % koncentraciji. Međutim, Despadac pokazuje virucidni učinak

pri 1 % koncentraciji. Na tržište oba dezinficijensa dolaze u plastičnoj ambalaži od 1, 2 i 5 litara.

#### **2.4.3.5. Genox i Genoll s pjenom**

Genox je registriran kao biocidni proizvod odnosno dezinficijens širokog spektra djelovanja (bakterije, virusi, gljivice, spore i alge) te je 100% biorazgradiv i ekološki certificiran. Prema deklaraciji Genox razara vitalne stanične dijelove mikroorganizma, a zahvaljujući djelovanju hipokloritnog iona nema pojave rezistencije.

Glavne sastavnice Genox-a su voda, hipokloritna kiselina, natrij klorid i hipokloritni ion. Međutim, Genox ne sadrži alkohol, boju, mirise i nije korozivan. Prema proizvođaču Genox ne isparava, ne ostavlja tragove te nije zapaljiv niti eksplozivan. Također, ne sadrži toksične tvari i smije se primjenjivati bez ograničenja za ruke, kožu, sve prostore, površine u prisutnosti ljudi i životinja te hrane i pića.

Genox se najčešće primjenjuje kao tekućina, maglica ili led, koncentriran ili razrijeđen vodom u omjeru 1:5, za dezinfekciju površina, opreme i pribora. Nanosi se prskanjem, uranjanjem ili brisanjem, a ispiranje nije potrebno. Na tržištu se nalazi u plastičnoj ambalaži od 0,5 litara te 1, 5 i 12 litara.

Proizvođač deklarira Genoll s pjenom kao detergent i dezinficijens koji blago dezinficira površine, reducirajući mikroorganizme za 50 do 60 %. Stvara gustu pjenu te brzo i temeljito uklanja i veže sve nečistoće i masnoće zahvaljujući djelovanju aktiviranih iona. Primjenjuje se kao učinkovit odmašćivač za ručno ili strojno pranje površina, opreme, pribora, vozila, objekata i ambalaže. Sadrži vodu, natrij hidroksid, aktivirane ione te koncentrirane otopine.

#### **2.4.3.6. Bee protect proizvodi**

Bee protect proizvodi registrirani su kao dodaci hrani za pčele s dezinfekcijskim učinkom. Sadrže vodu, saharozu, makronutrijente i organsku kiselinu. Pčelari najviše upotrebljavaju Bee protect H forte i Bee protect F s dodatkom zinka i bakra koji zaštićuju pčelinju zajednicu od oksidativnog stresa.

Prema deklaraciji Bee protect H forte smanjuje pojavu vapnenastog legla te se primjenjuje prskanjem košnica i okvira bez pčela dok Bee protect F djeluje na spore AGMP i

EGMP te sprječava pojavu nozemoze i vapnenastog legla s popratnim akaricidnim djelovanjem na grinje *V. destructor*.

Proizvođač preporuča primjenu Bee protect F tijekom prihrane pčelinjih zajednica kao dodatak šećernoj otopini ili šećernom tijestu. Preporučeno vrijeme primjene je od rane jeseni do proljeća, a svaki tretman se provodi četiri do šest dana uzastopno.

#### 2.4.3.7. EM® PROBIOTIK ZA PČELE

Prema deklaraciji EM® PROBIOTIK ZA PČELE je dodatak hrani s dezinfekcijskim učinkom. Potiče kolonizaciju dobrih mikroorganizama u probavnom traktu pčela. Prema proizvođaču sprječava pojavu nozemoze, kontrolira varoozu te se može koristiti protiv voskovog moljca. Sadrži vodu, melasu, bakterije mliječne kiseline, fototrofne bakterije i kvasce. Primjenjuje se prskanjem 0,5 % vodene otopine po pčelama, saću, letu i priboru.



Slika 9. Pakovanja dezinficijensa korištenih u pokusu - 1. Ecocid S 2. Sekusept aktiv 3. Incidin Oxyfoam S 4. Despadac proizvodi 5. Bee protect proizvodi 6. Genox i Genoll 7. EM® PROBIOTIK ZA PČELE.

### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

AGMP je bolest pčelinjih zajednica uzrokovana bakterijom *P. larvae*. Dosad je utvrđeno pet genotipova *P. larvae*: ERIC I, ERIC II, ERIC III, ERIC IV i ERIC V koji se međusobno fenotipski razlikuju po morfologiji, metaboličkom kapacitetu, virulenciju i čimbenicima koji utječu na virulenciju. Način sanacije i suzbijanja bolesti provodi se sukladno važećim zakonskim propisima. Mjere suzbijanja predviđaju spaljivanje ili pretresanje bolesne pčelinje zajednice, ali i završnu dezinfekciju opreme, pribora, alata i okoliša.

Polazeći od činjenice da u literaturi ne postoje istraživanja o učestalosti i raširenosti određenih genotipova bakterije *P. larvae* u RH te da postoje malobrojni, nedovoljno potvrđeni i kontroverzni rezultati glede učinkovitosti komercijalno dostupnih dezinficijensa koji se redovito preporučuju i koriste u svrhu završne dezinfekcije nakon sanacije AGMP, ciljeve istraživanja možemo podijeliti na: (1) provedbu genotipizacije *P. larvae* na pedeset terenskih izolata izdvojenih iz karakteristično promijenjenih uginulih pčelinjih ličinki u razdoblju od jedanaest godina (2010. – 2020.), te tako utvrditi raširenost i učestalost određenih genotipova u RH; (2) utvrđivanje učinka deset komercijalno dostupnih i uobičajeno korištenih dezinficijensa u pčelarstvu, na terenskim i certificiranim sojevima bakterije *P. larvae*, u laboratorijskim uvjetima; (3) uspoređivanje dobivenih rezultata o učinku ispitivanih dezinficijensa s pojedinim genotipovima bakterije *P. larvae*.

Očekivani znanstveni doprinos ovog istraživanja je: (1) dobiti bolji uvid u učinak pojedinog dezinficijensa na *P. larvae* u laboratorijskim uvjetima, a dobiveni rezultati mogli bi imati važno značenje u praktičnom pčelarstvu tijekom primjene postupka sprječavanja i suzbijanja AGMP; (2) utvrđivanje raširenosti i učestalosti određenih genotipova *P. larvae* u RH; (3) dobivanje jasnije slike o patofiziološkim procesima na razini pčelinje ličinke, odnosno, pčelinje zajednice kod AGMP; (4) usmjeravanje selekcijskog rada na proizvodnju linija pčelinjih matica s većim nagonom za čišćenje promijenjenih i uginulih pčelinjih ličinki; (5) smanjivanje pojavnosti klinički vidljive američke gnjiloće medonosne pčele.

Obzirom na učestale recidive klinički vidljive američke gnjiloće medonosne pčele na pčelinjacima, hipoteza je da komercijalno dostupni i za završnu dezinfekciju primjenjivani dezinficijensi pokazuju različiti stupanj učinkovitosti na bakteriju *P. larvae*.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. IZBOR I UZGOJ MIKROORGANIZAMA

Bakterije *P. larvae* koje smo koristili u našem istraživanju potječu iz dva izvora, jedan su validirani sojevi iz banke gena (German Collection of Microorganism and Cell Culture - DSMZ; Braunschweig, Germany) od kojih smo koristili četiri genotipa (DSM 7030 (ERIC I), DSM 25430a (ERIC II), LMG 16252 (ERIC III) i LMG 16247 (ERIC IV)), te terenski sojevi koji su prikupljeni na području RH tijekom 11 godina u okviru stručnog dijagnostičkog laboratorijskog rada i arhivirani u Laboratoriju za bolesti pčela APISlab Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Lokacije pčelinjaka s kojih potječu arhivirani uzorci bakterije *P. larvae* prikazani su u na Slici 10. i u Tablici 1. Arhivirani uzorci su bili pohranjeni u glicerolu, te prije početka pokusa u laboratorijskim uvjetima osvježeni i korišteni za potrebe genotipizacije i u pokusima utvrđivanja učinkovitosti istraživanih komercijalno dostupnih dezinficijensa.

Sojevi *P. larvae* uzgajani su na Columbia sheep blood agar (BD) krutoj hranjivoj podlozi pri temperaturi 37 °C s dodanih 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> tijekom 24 sata inkubacije. Sojevi *P. larvae* uzgajani su i u tekućem hranjivom mediju naziva Brain Heart Infusion (BHI). Pri tome za pripremu tekućeg hranjivog medija korišteno je 37 g BHI medija, 3 g ekstrakta kvasca i 1 L H<sub>2</sub>O. *P. larvae* je uzgajan pri temperaturi 37 °C, na tresilici (New Brunswick Innova 4340 Inkubator tresilica, New Brunswick, SAD) pri brzini okretaja 200 rpm, te inkubaciji tijekom 24 sata.



Slika 10. Prikaz karte s lokacijama pčelinjaka s kojih potječu terenski izolati bakterije *P. larvae*. Legenda pojedine lokacije prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz mjesta i pripadajućih GPS koordinata lokacija s kojih potječu terenski izolati bakterije *P. larvae* (poveznica rednih brojeva lokacija s oznakama lokacija na karti prikazanoj na Slici 10.).

REDNI BROJ	MJESTO	KOORDINATE	REDNI BROJ	MJESTO	KOORDINATE
1.	CRES	N 44° 51' 53" E 14° 23' 45"	26.	ORAHOVICA	N 45° 34' 52" E 17° 56' 50"
2.	NAŠICE	N 45° 33' 29" E 18° 22' 01"	27.	GORNJA STUBICA	N 45° 49' 16" E 16° 01' 16"

3.	DUGO SELO	N 45° 53' 01" E 16° 17' 09"	28.	BRNAZE	N 43° 38' 49" E 16° 38' 43"
4.	UDBINA	N 44° 29' 44" E 15° 45' 42"	29.	MALI ZDENCI	N 45° 41' 05" E 17° 04' 44"
5.	ZLATAR BISTRICA	N 46° 08' 06" E 15° 46' 08"	30.	KNIN	N 44° 07' 24" E 16° 19' 02"
6.	SENJ	N 44° 59' 24" E 14° 54' 36"	31.	SV. KRIŽ ZAČRETJE	N 46° 05' 27" E 15° 52' 54"
7.	ZAGREB	N 45° 48' 0" E 15° 58' 12"	32.	FERDINANDOVAC	N 46° 05' 30" E 17° 09' 21"
8.	KRIŽ	N 45° 38' 38" E 16° 33' 57"	33.	LEPOGLAVA	N 46° 15' 24" E 16° 01' 36"
9.	KRAPINA	N 46° 10' 56" E 15° 51' 51"	34.	VIROVITICA	N 45° 50' 13" E 17° 23' 16"
10.	LIPIK	N 45° 25' 01" E 17° 09' 42"	35.	IMOTSKI	N 43° 26' 41" E 17° 12' 49"
11.	ČAKOVEC	N 46° 23' 33" E 16° 26' 11"	36.	VELIKA GORICA	N 45° 37' 47" E 16° 03' 27"
12.	POŽEGA	N 45° 19' 50" E 17° 40' 36"	37.	POŽEGA	N 45° 19' 38" E 17° 39' 58"
13.	SISAK	N 45° 25' 28" E 16° 34' 47"	38.	SUNJA	N 45° 21' 31" E 16° 37' 20"
14.	KRAPINA	N 46° 09' 41" E 15° 49' 23"	39.	GRUBIŠNO POLJE	N 45° 48' 54" E 18° 25' 16"
15.	GRUDA	N 42° 50' 50" E 17° 42' 10"	40.	VALPOVO	N 45° 39' 36" E 18° 25' 16"
16.	POREČ	N 45° 18' 01" E 13° 41' 11"	41.	VODICE	N 43° 46' 37" E 15° 48' 06"
17.	OSIJEK	N 45° 32' 46" E 18° 43' 20"	42.	BEBRINA	N 45° 05' 26" E 17° 46' 53"
18.	SV. IVAN ZELINA	N 45° 53' 53" E 16° 12' 32"	43.	GRADINA	N 45° 52' 29" E 17° 29' 34"
20.	KRIŽEVCI	N 46° 04' 18"	45.	HRVACE	N 43° 50' 35"

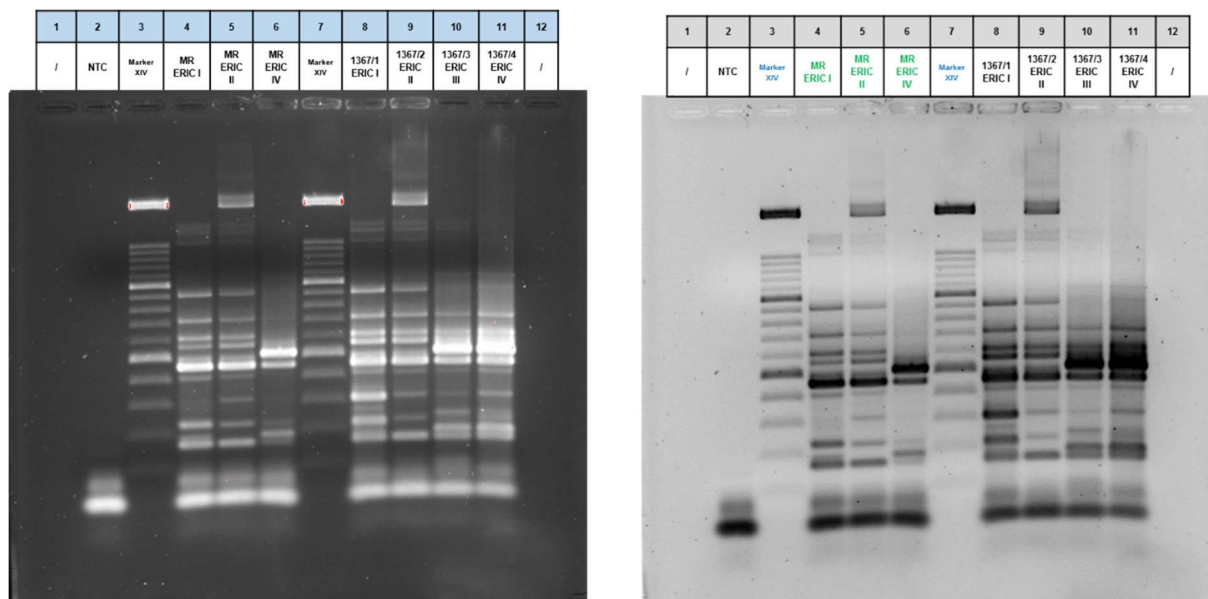


		E 16° 24' 55"			E 16° 30' 23"
21.	DUGA RESA	N 45° 27' 25" E 15° 28' 32"	46.	NOVA KAPELA	N 45° 11' 33" E 17° 39' 02"
22.	PREGRADA	N 46° 08' 27" E 15° 48' 03"	47.	DARUVAR	N 45° 50' 23" E 15° 53' 25"
23.	OTOČAC	N 44° 54' 17" E 15° 17' 42"	48.	ZAGREB	N 45° 50' 23" E 15° 53' 25"
24.	SLAVONSKI BROD	N 46° 48' 44" E 15° 59' 24"	59.	IMOTSKI	N 42° 59' 45" E 17° 15' 46"
25.	IVANEC	N 46° 18' 31" E 16° 06' 53"	50.	GLINA	N 45° 23' 18" E 16° 32' 01"

## 4.2. GENOTIPIZACIJA

U istraživanju genotipizacije izdvojenih terenskih sojeva bakterije *P. larvae* korištene su vrsno specifične početnice 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' (ERIC1R) i 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' (ERIC2) kako bi metodom ponavljajućih vangenskih palindromskih sljedova (engl. *repetitive extragenic palindromic sequence-PCR*, REP-PCR) (VERSALOVIC i sur., 1994.) odredili kojem genotipu pripadaju arhivirani uzorci. Naime, ponavljajući slijedovi u prokariotskim genomima mogu se koristiti kao vezna mjesta oligonukleotidnih početnica kod genotipizacije obzirom se metoda temelji na zapažanju da oligonukleotidne početnice okrenute prema van omogućuju umnažanje odsječaka DNK različite veličine, koji se sastoje od slijedova koji leže između pojedinih elemenata.

Umnažanjem izolirane DNK spomenutim početnicama za ERIC I i II, dolazi do stvaranja produkta specifičnog za *P. larvae* na veličini oko 970 pb. Nastali produkti se razlikuju po jednom istaknutom pojasu koji migrira na oko 2800 pb (ERIC II) i u manje izraženom produktu veličine 120 pb. Kod genotipa ERIC III nakon umnažanja i elektroforeze PCR produkta nalazimo dvostuku liniju veličine 1500 do 2000 pb. Kod genotipa karakterističnog za ERIC IV ne nalazimo produkt koji je manji od 1250 pb (GENERSH, 2006.).



Slika 11. Prikaz traka na gelu koji nastaju umnažanjem DNK uz specifične početnice primjenom REP-PCR metode, za pojedine genotipove (ERIC I do ERIC IV) bakterije *P. larvae*.

#### 4.2.1. IZOLACIJA GENOMSKE DNK

Izolacija genomske DNK je obavljena primjenom komercijalnog QIAamp Mini DNA blood and tissue kompleta (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača uz prethodnu pripremu bakterijskih kolonija. Bakterijske kolonije su sterilnom ezom skupljene s krute hranjive podloge i resuspendirane u fiziološkoj otopini koja je puferirana fosfatom (PBS). Tako pripremljene resuspendirane bakterije su nasađene u tekući hranjivi medij za uzgoj bakterija i centrifugirane nakon 48 sati inkubacije. Uvjeti centrifugiranja bili su  $20\ 000 \times g$  tijekom 10 minuta, nakon čega je nastali talog ponovno resuspendiran u PBS-u. Tako resuspendirani talog smo podvrgli djelovanju lizirajućih enzima (20 mg /mL lizozima, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA, 1,2 % Triton) tijekom jednog sata na temperaturi 37 °C. Nakon opisane inkubacije u suspenziju je dodana proteinaza K i lizirajući pufer (AL, Qiagen, Njemačka). Tako pripremljena suspenzija je inkubirana tijekom 30 minuta na 56 °C i dodatnih 5 minuta na 96 °C (inaktivacija enzima). Daljna izolacija bakterijske genomske DNK se temeljila na uputama proizvođača. Nakon izolacije izmjerena je koncentracija DNK fluorimetrijski korištenjem komercijalnog kompleta Qubit dsDNA (AL, Qiagen, Njemačka).

## 4.2.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM

Za genotipizaciju korištena je molekularna metoda REP-PCR. Pripremljena reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 25  $\mu$ L sastojala se od reakcijskog pufera (Qiagen, Njemačka), oligonukleotida konačne koncentracije 250  $\mu$ M (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10  $\mu$ M početnica (opis u podpoglavlju 4.2. Genotipizacija) i 0,3 jedinica HotStart Taq polimeraze (Qiagen, Njemačka) uz 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Uvjeti reakcije: nakon početnog koraka aktivacije tijekom 15 minuta i pri 95 °C slijedilo je umnažanje DNK koje se odvijalo tijekom 35 ciklusa (pri 4 °C tijekom jedne minute, pri 53 °C tijekom jedne minute i pri 72 °C tijekom 2,5 minute), nakon čega se odvijao završni korak produljenja (pri 72 °C tijekom 10 minuta). Produkt reakcije (5  $\mu$ L) razdvojen je na 0,8 % - tnom agaroznom gelu elektroforezom. DNK trake su obojene etidijevim bromidom i vizualizirane UV svjetlom, te analizirane ovisno o nastalom PCR produktu.

## 4.3. ISPITIVANJE UČINKA DEZINFICIJENSA

### 4.3.1. ODABRANI DEZINFICIJENSI

Dezinficijensi koje smo izabrali za ispitivanje razine djelotvornosti na bakteriju *P. larvae* te njene spore, odabrani su temeljem informacija o praktičnoj primjeni pojedinih dezinfekcijskih proizvoda dobivenih od predstavnika veterinarskih službi i pčelara, odnosno na osnovu preporuka proizvođača.

Ispitivani su ispod nabrojani dezinficijensi i njihovi proizvođači:

- Linija Bee Protect
  - Bee Protect H forte (mineralni dodatak prehrani pčela)
  - Bee Protect F (deklariran kao dodatak prehrani)
  
- Tvrtka Aquagenon
  - Genox (dezinficijens širokog spektra djelovanja)
  - Genoll s pjenom (detergent s dezinfekcijskim učinkom)

- Tvrtka Calier
  - Despadac Secure (dezinficijens širokog spektra djelovanja)
  - Despadac (dezinficijens širokog spektra djelovanja)
  
- Tvrtka Ecolab
  - Sekusept Aktiv (deklariran kao sredstvo za ručno čišćenje i dezinfekciju)
  - Incidin OxyFoam S (dezinficijens širokog spektra djelovanja)
  
- Tvrtka Krka
  - Ecocid S (dezinficijens i opći biocidni pripravak).
  
- Tvrtka EMRO Japan, distributer EM tehnologija Rijeka
  - EM® PROBIOTIK ZA PČELE (deklariran kao dodatak hrani za pčele koji sadrži efektivne mikroorganizme. Namijenjen je za sprječavanje razvoja bolesti, poboljšanje imunološkog sustava pčela te za održavanje higijene pčelarske opreme i alata).

#### 4.3.2. AGAR DIFUZIJA

Agar difuzija je jednostavna, kvalitativna metoda određivanja inhibitorne djelotvornosti neke tvari naspram bakterija. Metoda je korištena kao preliminarna, odnosno kako bi odredili koji dezinficijens zadovoljava minimalni kriterij smanjivanja broja vijabilnih bakterija. U istraživanju smo koristili četiri ERIC genotipa bakterije *P. larvae*.

Po jedna bakterijska kolonija ezom je prenešena s ploče s krutim hranjivim medijem BD u tekući hranjivi medij BHI optimiziran za rast bakterija *P. larvae* kako bi nakon 24 sata inkubacije uz stalnu agitaciju dobili vijabilne vegetativne oblike bakterija. Tako dobivene bakterijske kulture razrijeđene su na 0,6 McFarland jedinica (točna vrijednost je utvrđena nefelometrom (Biosan Ltd., Riga, Latvija). Tako pripremljene bakterije su razrijeđene s medijem u omjeru 1:9 i korištene u daljnjem pokusu. U čvrstom krvnom agaru su probušene dvije ili više (ovisno o očekivanom promjeru zone inhibicije) udaljenih jažica, te su u njih dodane pojedinačne ispitivane dezinfekcijske tvari, odnosno PBS koji je u ovom slučaju služio

kao kontrola. Kako bi se olakšala difuzija dezinfekcijskih tvari u agar, nasadne ploče su ostavljene tijekom četiri sata pri temperaturi 4 °C, te nakon toga premještene u inkubator na temperaturu 37 °C. Nakon inkubacije u trajanju 12 i 24 sata, mikrometarskom mjerkom izmjereni su promjeri zone inhibicije.

U daljnjem istraživanju korištene su samo tvari, odnosno dezinficijensi, koji su u preliminarnom testu agar difuzije pokazali djelotvornost na smanjenje broja bakterija *P. larvae*.

## **4.4. SPOROCIDNI UČINAK DEZINFICIJENSA**

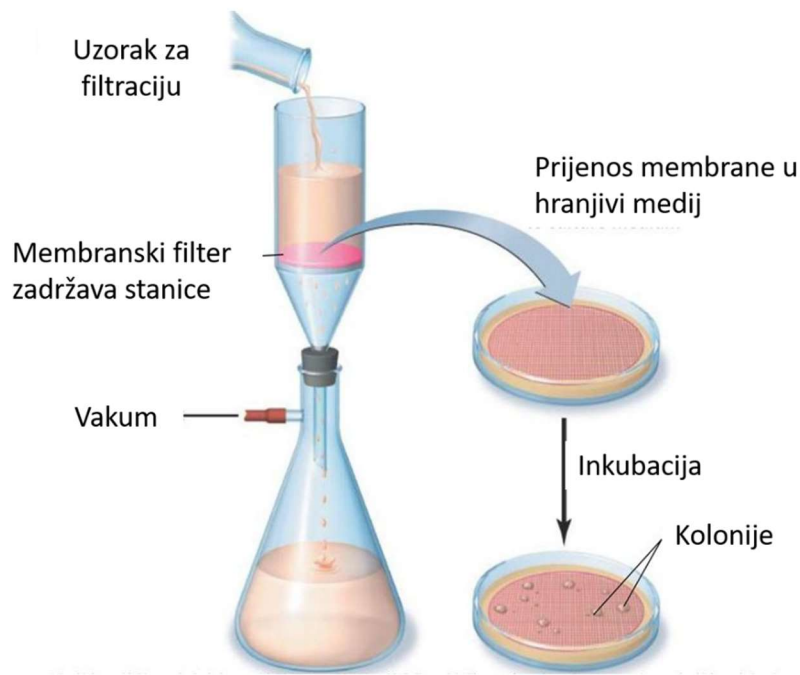
### **4.4.1. PRIPREMA SPORA *P. LARVAE* ZA ISPITIVANJE SPOROCIDNOG DJELOVANJA DEZINFICIJENSA**

Sojevi *P. larvae* (genotipovi ERIC I do IV) su uzgajani na površini čvrstog krvnog agara pri temperaturi 30 °C te je nekoliko dobro ograničenih i prema morfološkim osobitostima tipičnih kolonija suspendirano u 1 mL fiziološke otopine. Alikvoti (0,1 mL) tako pripremljenih bakterija *P. larvae* su raspoređeni na ploče s krutim krvnim agarom koje su inkubirane pri temperaturi 30 °C tijekom pet dana kako bi se potaknula sporulacija bakterije. Novostvorene spore su skupljene ezom i suspendirane u fiziološkoj otopini te dva puta isprane centrifugiranjem na 7500 × g tijekom 10 minuta. Dobiveni pelet je resuspendiran u fiziološkoj otopini i držan na temperaturi 4 °C do daljne upotrebe. Broj spora *P. larvae* u dobivenoj suspenziji je određen spektrofotometrijski (DEN-1, Biosan Ltd., Riga, Latvija), nakon toplinske obrade pri temperaturi 80 °C tijekom 10 minuta (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) kako bi se uklonili vegetativni oblici bakterija.

### **4.4.2. ODREĐIVANJE DJELOVANJA DEZINFICIJENSA NA SPORE BAKTERIJE *P. LARVAE***

Određivanje inhibitornog djelovanja dezinficijensa napravljeno je na način da je na resuspendirani pelet koji je sadržavao poznati broj spora *P. larvae* dodan pojedini dezinficijens u koncentraciji koja je preporučena u uputama proizvođača o primjeni. Nakon izlaganja spora *P. larvae* pojedinom dezinficijensu suspenzija spora je filtrirana (korištene Shottova boca i Milipore vakumska pumpa), te je filter s veličinom pora 0,45 µm stavljen u 2 mL sterilne

fiziološke otopine i vorteksiran (V-1, Biosan Ltd., Riga, Latvia) tijekom dvije minute kako bi se s njega otpustile spore. Od tako dobivene suspenzije, 100  $\mu$ L suspenzije je nasadeno na krutu podlogu BD. Nakon 24, odnosno 48 sati izbrojane su izrasle bakterijske kolonije *P. larvae*. Odnos broja izraslih bakterijskih kolonija u kontrolnoj netretiranoj skupini i broja izraslih bakterijskih kolonija u tretiranoj skupini čini logaritam smanjenja broja mikroorganizama.



Slika 12. Prikaz procjene broja bakterija primjenom membranske filtracije (prilagođeno prema GRIFFITH, 2016.).

Za određivanje broja spora bakterije *P. larvae* koje su preživjele postupak djelovanja dezinficijensa korištena je Kochova metoda brojanja bakterijskih kolonija koja služi određivanju broja živih stanica po principu jedna kolonija porasla na krutoj hranjivoj podlozi označava jednu živu sporu. Nasadivanje korištenjem metode razrjeđenja uzorka omogućeno je točnije određivanje i brojanje stvarnog broja izraslih kolonija obzirom da broj izraslih kolonija odgovara broju bakterijskih stanica, odnosno spora u uzorku (broj kolonija označava se kao broj jedinica koje tvore kolonije ili CFU (engl. *colony forming units*)). Točan broj spora dobili smo matematičkim putem kao omjer broja bakterijskih kolonija podijeljen s volumenom uzorka koji je nasaden i podijeljen s recipročnom vrijednošću razrjeđenja nasadenog na podlogu.

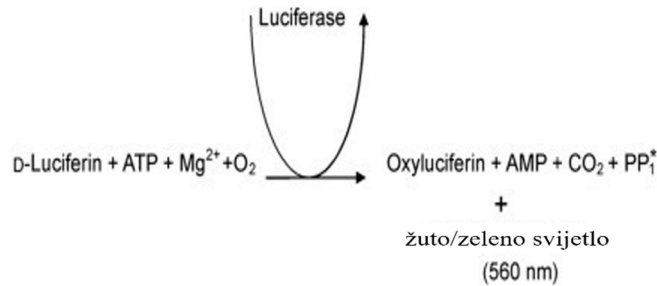
Pojedinačni uzorak nasađen je razmazivanjem po površini agara pomoću staklenog štapića savinutog pod 90° (engl. *spread plate*).



Slika 13. Izrasle kolonije bakterije *P. larvae* na krutoj hranjivoj podlozi.

#### 4.5. ENSURE LUMINOMETAR

Luminometar korišten u istraživanju učinkovitosti dezinficijensa za smanjivanje broja bakterija *P. larvae* i njihovih spora proizvela je tvrtka EnSURE (EnSURE Multi-Parameter *Luminometer*, Hygiena, Njemačka). To je instrument koji prikuplja, analizira i izvještava o različitim pokazateljima mikrobiološkog i/ili organskog onečišćenja nekog uzorka. Može se upotrebljavati za mjerenje razine adenzin trifosfata (ATP) iz površinskih i tekućih uzoraka, broja bakterija, razine alkalne i kisele fosfataze. Testovi koji se mogu koristiti ovise o samom uzorku, a to su ATP testovi, testovi za mikroorganizme, te testovi za mjerenje aktivnosti enzima. EnSure radi na principu spektrofotometrijskog mjerenja zamućenja otopine nakon spajanja testne tekućine (otapalo) s uzorkom uzetim testnim štapićem kojim u roku nekoliko minuta možemo obraditi veliki broj uzoraka, s visokom preciznošću.



Slika 14. Shematski prikaz bioluminiscencijske reakcije ATP-a (prilagođeno prema GRIFFITH, 2016.).

Test koji je korišten u ovom istraživanju je Super Snap High Sensitivity ATP test, koji je ujedno i najosjetljiviji test jer otkriva i izrazito niske koncentracije ATP-a u ispitivanom uzorku. Naime, ATP nalazimo u svim organskim materijalima, uključujući bakterije, pa iako ATP u nekim drugim sustavima ne mora biti bakterijskog podrijetla, u našem smo se sustavu odlučili za mjerenje ATP-a obzirom se radi o čistom zatvorenom sustavu u kojem je nemoguće da je ATP drugog osim bakterijskog porijekla. Cilj uzorkovanja je bio ispitati broj bakterija u kontrolnom uzorku te nakon izlaganja bakterija *P. larvae* pojedinom dezinficijensu u vremenskom slijedu, odnosno ovisno o trajanju ekspozicije. Naime, ukoliko bakterija kao organizam ostane intaktna ATP nije otpušten i zaključujemo kako nema djelovanja dezinficijensa na integritet membrane bakterijske stanice, odnosno gubitka citoplazmatskog materijala i posljedičnog ugibanja. S druge strane, ukoliko je u uzorku došlo do povećanja koncentracije ATP-a, zaključujemo kako je dezinfekcijsko sredstvo djelovalo na bakteriju *P. larvae*, te uslijed njenog raspadanja došlo i do povećanja koncentracije ATP-a u okolnom mediju. Postupak je vrlo jednostavan i brz, a podrazumjeva uranjanje testnog štapića u uzorak. Prema uputi proizvođača uzorak se spoji s testnom tekućinom, te se isti postavi u luminometar gdje se spektrofotometrijski odredi razina ATP-a.

#### 4.5.1. ODREĐIVANJE KOLIČINE ATP-A

Prvi korak je priprema suspenzije bakterija na standardiziranu jedinicu u mikrobiološkim testiranjima, McFarland. Bakterije *P. larvae* su prije ispitivanja uzgajane u tekućem hranjivom mediju BHI, na tresilici, kako bismo osigurali idealne uvjete za rast i razmnožavanje bakterijske populacije, a obzirom da smo htjeli utvrditi inhibitorno djelovanje dezinficijensa na vijabilni oblik bakterije. Kod uzgoja bakterije *P. larvae* na krutim hranjivim



podlogama ona vrlo brzo sporulira, što je korišteno u drugom dijelu istraživanja. Nakon uzgoja bakterija *P. larvae* tijekom 48 sati na temperaturi 35 °C, pripravljena suspenzija bakterija koncentracije 0.6 McFarland jedinica korištena je u daljnjim istraživanjima u razrjeđenju 1:10.

Bakterije u suspenziji izložene su djelovanju dezinficijensa i nakon testnog razdoblja izloženosti i pomoću EnSure luminometra (Super Snap test) određena je količina ATP-a u pojedinom uzorku. Super Snap High Sensitivity ATP testni štapić je uronjen u pojedinačni pripremljeni uzorak i nakon miješanja s otopinom, koja je sastavni dio štapića, a zatim je u luminometru određena razina ATP-a.

#### **4.5.2. TEST DJELOVANJA DEZINFICIJENSA NA POVRŠINI**

Kako bi odredili djeluje li odabrano dezinfekcijsko sredstvo na površini, čista, suha i tvrda površina, slobodna od organskog onečišćenja i mikroorganizama, pokusno je onečišćena bakterijom *P. larvae*. Nakon što je površina osušena, tretirana je odabranim dezinficijensom prema uputi proizvođača obzirom na koncentraciju i dužinu izlaganja. Nakon proteka vremena potrebnog izlaganja dezinficijensu, štapićem Super Snap High Sensitivity ATP testa, obrisana je površinu veličine 10 cm<sup>2</sup> i određena količina ATP-a.

U nastavku testa, površina pripremljena na ranije opisani način je uzorkovana testnim štapićem umočenim u fiziološku otopinu, štapić je zatim stavljen u PBS i vorteksiran, te je 100 µL tako dobivene suspenzije nasadeno na čvrsti krvni agar i bakterijska kultura je uzgajana u inkubatoru tijekom 48 sati na temperaturi 30 °C. Nakon isteka inkubacijskog razdoblja brojanjem izraslih bakterijskih kolonija određeno je smanjenje broja živih bakterija *P. larvae* nakon djelovanja pojedinog dezinfekcijskog sredstva.

#### **4.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Statistička analiza provedena je korištenjem programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Postojanje statistički značajne razlike među rezultatima određeno je primjenom jednosmjerne analize varijance (one-way ANOVA) uz Tukeyev post-hoc test. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) korištena je za utvrđivanje postojanja statistički značajnih razlika između tri ili više neovisnih (nepovezanih) skupina i pokazuje značajnost razlike. Značajnost testa unaprijed je zadana i obično je 0,05 (5 %) ili 0,01 (1 %). Prema tome, ukoliko je testiranjem p vrijednost iznosila < 0,05 ili < 0,01, postoje statistički

značajne razlike između testiranih skupina. Mana ANOVA testa je što nam govori da postoji statistički značajna razlika između najmanje dvije skupine, ali ne i između kojih skupina. Zato je izveden Turkeyev post hoc test, kojim je uspoređivana svaka skupinu međusobno, kako bi utvrdili između kojih ispitivanih skupina postoji značajna razlika.

## 5. REZULTATI

### 5.1. GENOTIPIZACIJA TERENSKIH IZOLATA BAKTERIJE *P. LARVAE*

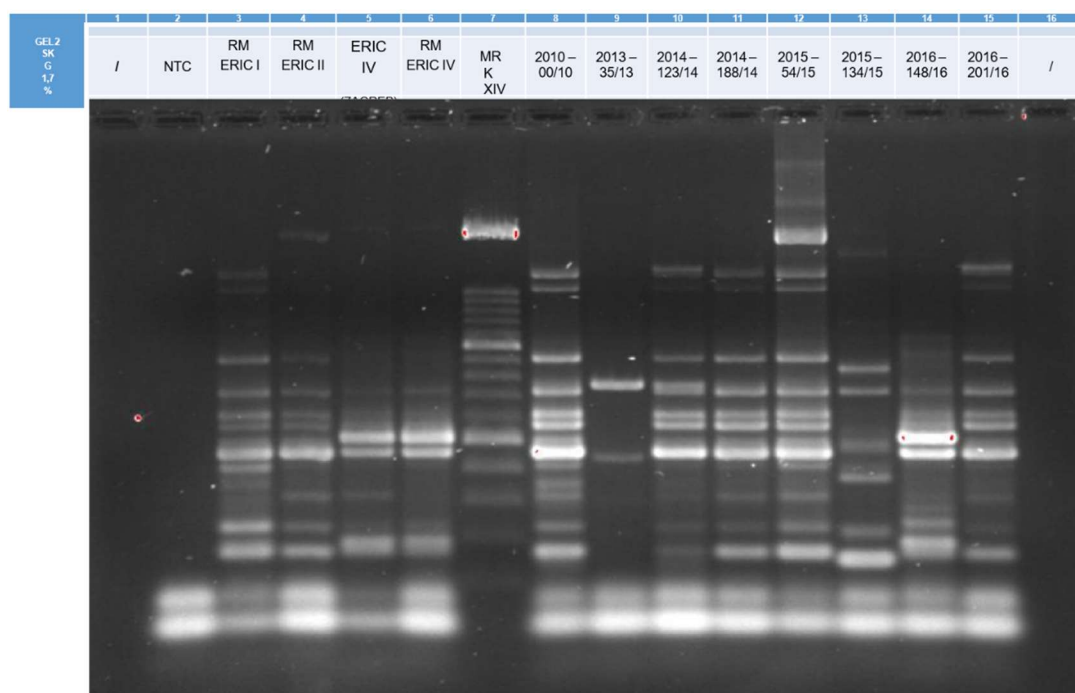
Rezultati pokazuju kako je većina prikupljenih terenskih izolata bakterije *P. larvae* svrstana u genotip ERIC I, dok su tek tri ispitivana izolata potvrđena kao ERIC II genotip. Kod jednog je ispitivanog terenskog izolata postavljena sumnja na pripadnost genotipu ERIC IV (148/16, Gornja Stubica) te je potrebna daljnja verifikacija takvog nalaza. Rezultati provedene genotipizacije prikazani su u Tablici 2. i na Slikama 15. do 17.

Tablica 2. Prikaz rezultata genotipizacije terenskih izolata bakterije *P. larvae* porijeklom s područja RH (2010.-2020.).

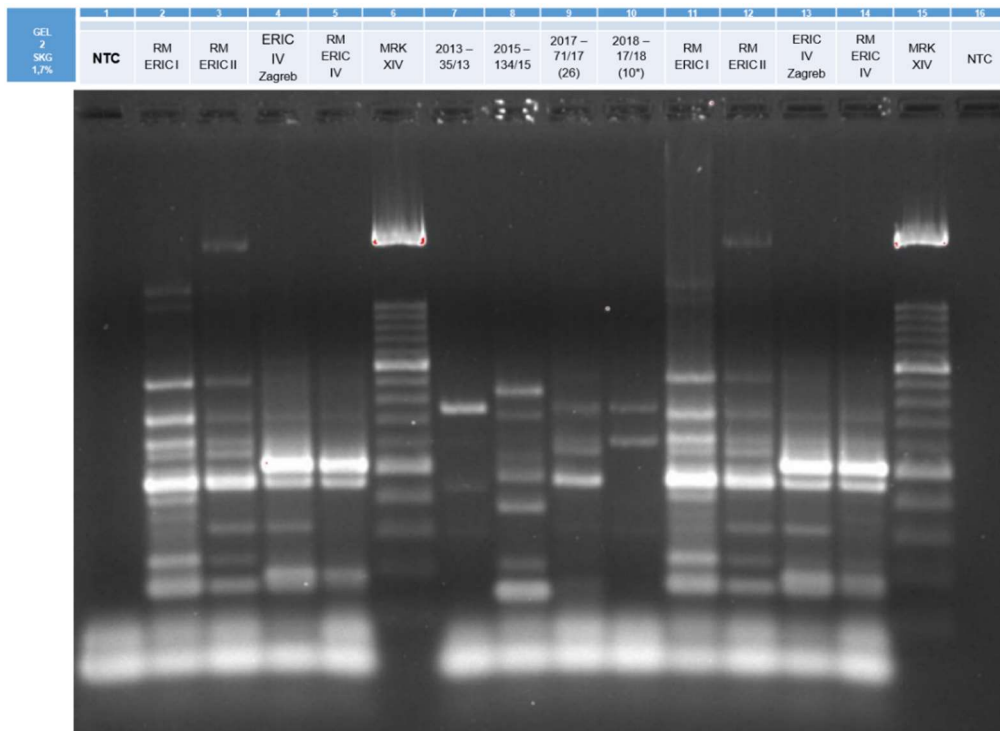
Rezultati genotipizacije terenskih izolata bakterije <i>P. larvae</i>			
Godina utvrđivanja i izdvajanja terenskog izolata <i>P. larvae</i>	Oznaka laboratorijske pretrage	Lokacija pčelinjaka	Genotip
2010.	00/10	Cres	ERIC I
2011.	06/11	Našice	ERIC I
	3/11	Dugo Selo	ERIC I
	10/11	Udbina	ERIC I
	20/11	Zlatar Bistrica	ERIC I
2012.	53/12	Senj	ERIC I
	00/12	Zagreb	Uzorak neprikladan za interpretaciju
2013.	35/13	Križ	Uzorak neprikladan za interpretaciju
	38/13	Krapina	ERIC I
	40/13	Lipik	ERIC I
	41/13	Čakovec	ERIC I
2014.	87/14	Požega	ERIC I
	114/14	Sisak	ERIC I
	136/14	Krapina	Uzorak neprikladan za interpretaciju
	141/14	Grude	Uzorak neprikladan za interpretaciju

	152/14	Poreč	Uzorak neprikladan za interpretaciju
	123/14	Osijek	ERIC I
	188/14	Sv. Ivan Zelina	ERIC I
<b>2015.</b>	28/15	Berek	Uzorak neprikladan za interpretaciju
	54/15	Križevci	ERIC II
	119/15	Duga Resa	ERIC I
	134/15	Pregrada	ERIC II
	129/15	Otočac	ERIC I
	158/15	Slavonski Brod	ERIC I
	153/15	Ivanec	ERIC I
<b>2016.</b>	145/16	Orahovica	ERIC I
	148/16	Gornja Stubica	ERIC IV
	199/16	Brnaze	ERIC I
	201/16	Mali Zdenci	ERIC I
	238/16	Knin	ERIC I
	242/16	Sv. Križ Začretje	ERIC I
	256/16	Ferdinandovac	Uzorak neprikladan za interpretaciju
<b>2017.</b>	66/17	Lepoglava	ERIC I
	71/17	Virovitica	ERIC I
	130/17	Imotski	ERIC I
<b>2018.</b>	17/18	Velika Gorica	ERIC I
	31/18	Požega	ERIC II
	164/18	Sunja	ERIC I
	130/18	Grubišno Polje	ERIC I
	141/18	Valpovo	ERIC I
<b>2019.</b>	211/19	Vodice	ERIC I
	214/19	Bebrina	ERIC I
	216/19	Gradina	Uzorak neprikladan za interpretaciju
	222/19	Obrovac	ERIC I

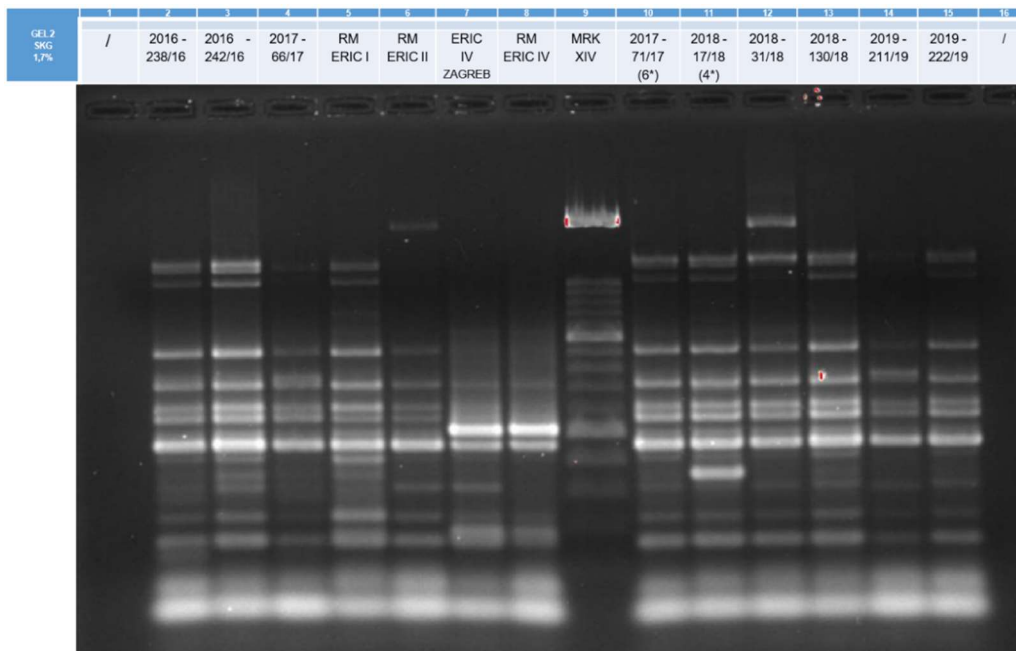
2020.	70/20	Glina	ERIC I
	85/20	Hrvace	ERIC I
	92/20	Nova Kapela	Uzorak neprikladan za interpretaciju
	268/20	Daruvar	ERIC I
	127/20	Zagreb	ERIC I
	198/20	Imotski	ERIC I



Slika 15. Prikaz rezultata genotipizacije pojedinih terenskih izolata bakterije *P. larvae* prikupljenih i izdvojenih 2010. do 2016. godine, na agaroznom gelu nakon elektroforeze PCR produkta. NTC - kontrola umnažanja, trake 2 do 5 pozitivna kontrola poznate DNK za ERIC I, ERIC II i ERIC IV genotip, traka 5 - DNK marker, traka 6 do 13 - terenski izolati.



Slika 16. Prikaz rezultata genotipizacije pojedinih terenskih izolata bakterije *P. larvae* prikupljenih i izdvojenih 2013. do 2018. godine, na agaroznom gelu nakon elektroforeze PCR produkta. NTC - kontrola umnažanja, trake 2 do 5 pozitivna kontrola poznate DNK za ERIC I, ERIC II i ERIC IV genotip, traka 6 - DNK marker, traka 7 do 15 - terenski izolati.



Slika 17. Prikaz rezultata genotipizacije pojedinih terenskih izolata bakterije *P. larvae* prikupljenih i izdvojenih 2016. do 2019. godine, na agaroznom gelu nakon elektroforeze PCR produkta. Trake 4 do 7 pozitivna kontrola poznate DNK za ERIC I, ERIC II i ERIC IV genotip, traka 9- DNK marker, traka 2 do 4 i 10 do 15 - terenski izolati.

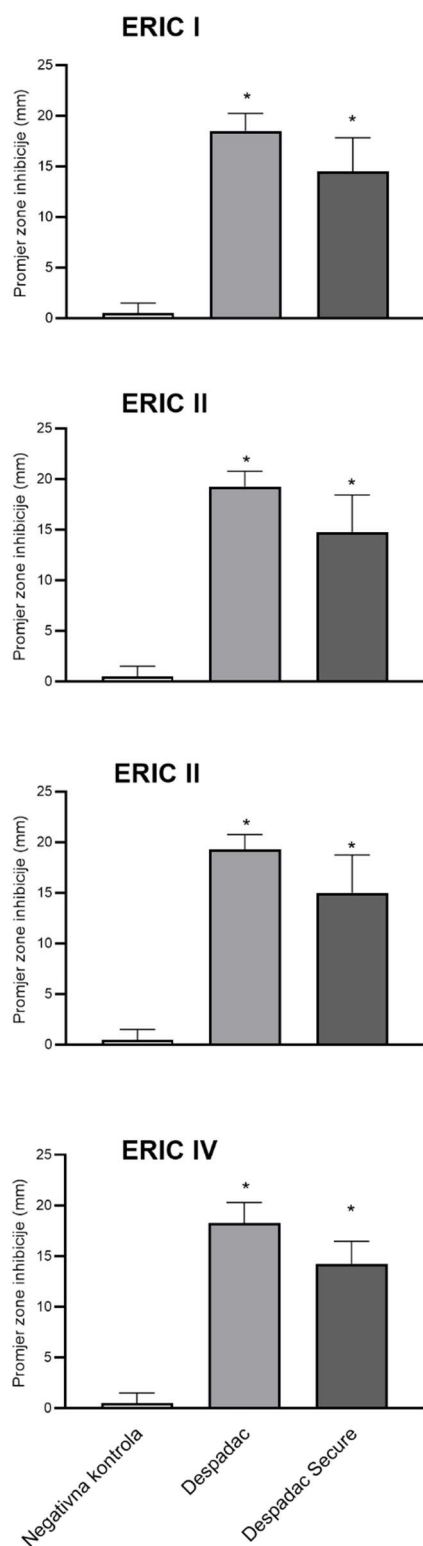
## **5.2. DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI NA BAZI GLUTARALDEHIDA U KOMBINACIJI S FORMALDEHIDOM**

### **5.2.1. REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE**

Rezultati pokazuju da je Despadac kao dezinfekcijsko sredstvo čija je glavna aktivna sastavnica glutaraldehid u kombinaciji s formaldehidom djelovao na vegetativne oblike bakterije *P. larvae*, i to na sva četiri ispitivana genotipa (ERIC I, ERIC II, ERIC III i ERIC IV), te stoga sve izmjerene vrijednosti promjera zone inhibicije vrijede za sva četiri genotipa (Slika 18.). Kako je vidljivo na slici Despadac (1 %-tna otopina) pokazuje inhibitornu aktivnost za rast bakterije *P. larvae*, a srednja vrijednost promjera zone inhibicije bila je 19,25 milimetara dok je Despadac Secure (10 %-tna otopina) pokazao srednju vrijednost promjera zone inhibicije 14,75 milimetara. Navedeni rezultati za Despadac Secure su statistički značajni (ANOVA,  $F(8,32) = 68.30$ ;  $p < 0,0001$ ) za sva četiri genotipa bakterije *P. larvae*, a u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu u kojoj je srednja vrijednost promjera zone inhibicije iznosila 0,5 milimetara.

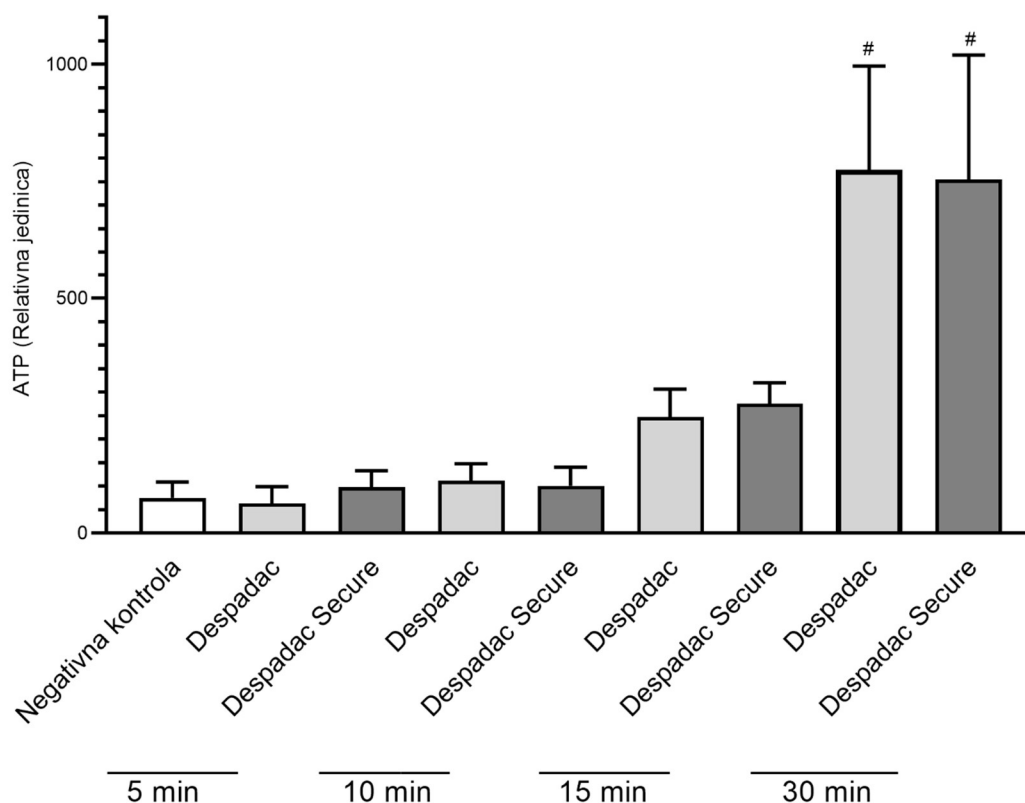
### **5.2.2. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE *P. LARVAE***

U suspenzijskom testu s primjenjenim živim vegetativnim oblikom bakterija *P. larvae* određena je učinkovitost djelovanja dezinficijensa Despadac tijekom izlaganja sukladno normama za baktericidno djelovanje. Rezultati pokazuju da je Despadac linija dezinfekcijskih proizvoda koja pokazuje statistički značajno baktericidno djelovanje na *P. larvae* (posredno mjereno količinom ATP-a u suspenziji) (ANOVA,  $F(8,31) = 26.74$ ;  $p < 0,0001$ ). Zbog jednostavnosti prikaza, a obzirom da su svi ispitivani genotipovi bakterije *P. larvae* pokazali vrlo sličnu ili jednaku osjetljivost, na Slici 19. prikazan je zbirni rezultat. Naime, broj relativnih jedinica ATP-a u kontrolnoj netretiranoj skupini iznosi  $74.75 \pm 14,58$ , dok je djelovanjem dezinficijensa Despadac došlo do porasta toga broja. Točnije nakon 15 minuta izlaganja bakterije dezinficijensu Despadac vrijednost relativnih jedinica ATP-a je porasla na  $247,50 \pm 29,55$ , a nakon 30 minuta izlaganja na  $775,50 \pm 110,70$ . Kod Despadac Secure je nakon izlaganja tijekom 15 minuta djelovanja zabilježen porast vrijednosti relativnih jedinica ATP-a na  $275,50 \pm 22,16$ , a nakon 30 minuta izlaganja na  $755,0 \pm 132,60$ .



Slika 18. Prikaz vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Despadac i Despadac secure, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .



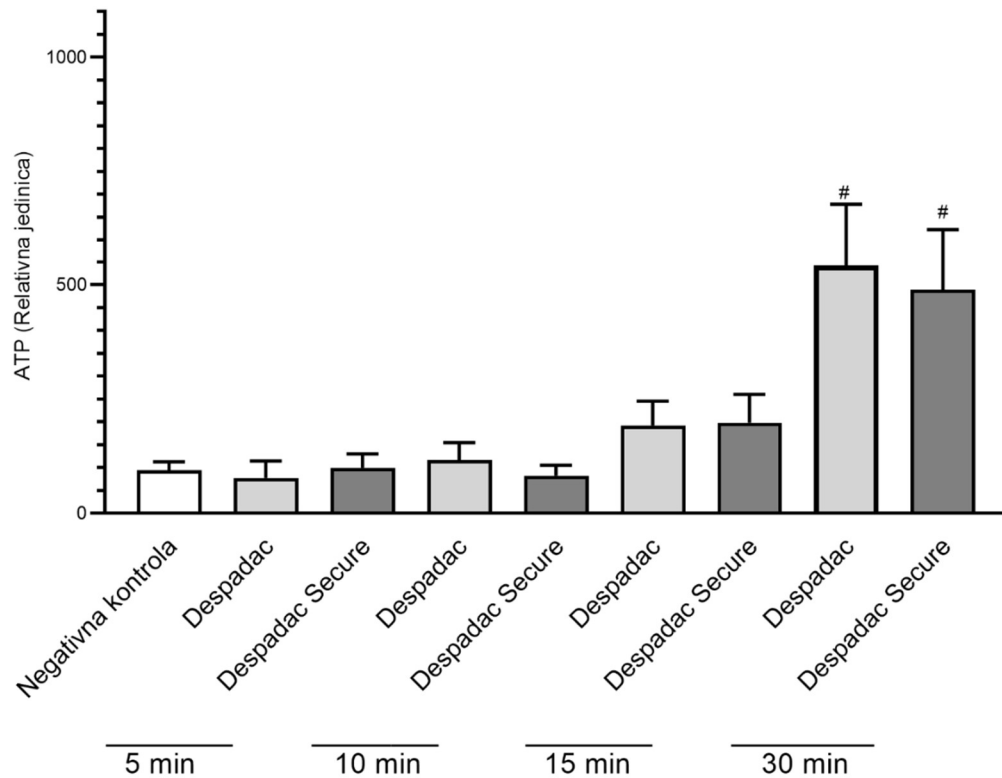


Slika 19. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Despadac i Despadac secure, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; # $p < 0,0001$ .

### 5.2.3. TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA

Kako bi odredili djelotvornost dezinficijensa na površinama, površine prethodno opterećene bakterijom *P. larvae* su tretirane dezinficijensom te je uzet bris kako bi odredili vrijednost ATP-a koji pokazuje broj raspadnutih bakterija *P. larvae*. Rezultati pokazuju da su Despadac i Despadac Secure tijekom izlaganja u trajanju 30 minuta doveli do značajnog povećanja količine ATP-a (ANOVA,  $F(8,31) = 28,39$ ;  $p < 0,0001$ ). U kontrolnoj skupini izmjerena ATP vrijednost iznosila je  $94,25 \pm 9,21$  relativnih jedinica, dok je u skupinama Despadac nakon izlaganja tijekom 5 minuta izmjereno  $77,25 \pm 18,51$ ; nakon 10 minuta  $116,30 \pm 15,53$ ; te nakon 15 minuta  $192,50 \pm 26,58$ . Despadac Secure je nakon 5 minuta izlaganja bakterijama *P. larvae* uzrokovao očitavanje  $99,80 \pm 13,58$  relativnih jedinica ATP-a; nakon 10 minuta  $82,40 \pm 10,1$ ; te nakon 15 minuta vrijednost  $198,30 \pm 30,90$ . Statistički značajna razlika pokusnih u odnosu na kontrolnu skupinu utvrđena je nakon tretmana površine u trajanju 30

minuta za Despadac ( $543,0 \pm 67,77$ ) i Despadac Secure ( $490,00 \pm 66,71$ ) (ANOVA,  $p < 0,0001$ ; za obje skupine). Obzirom je djelovanje Despadac linije proizvoda pokazalo jednak učinak spram sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I do ERIC IV), rezultati su prikazani zbirno na Slici 20.

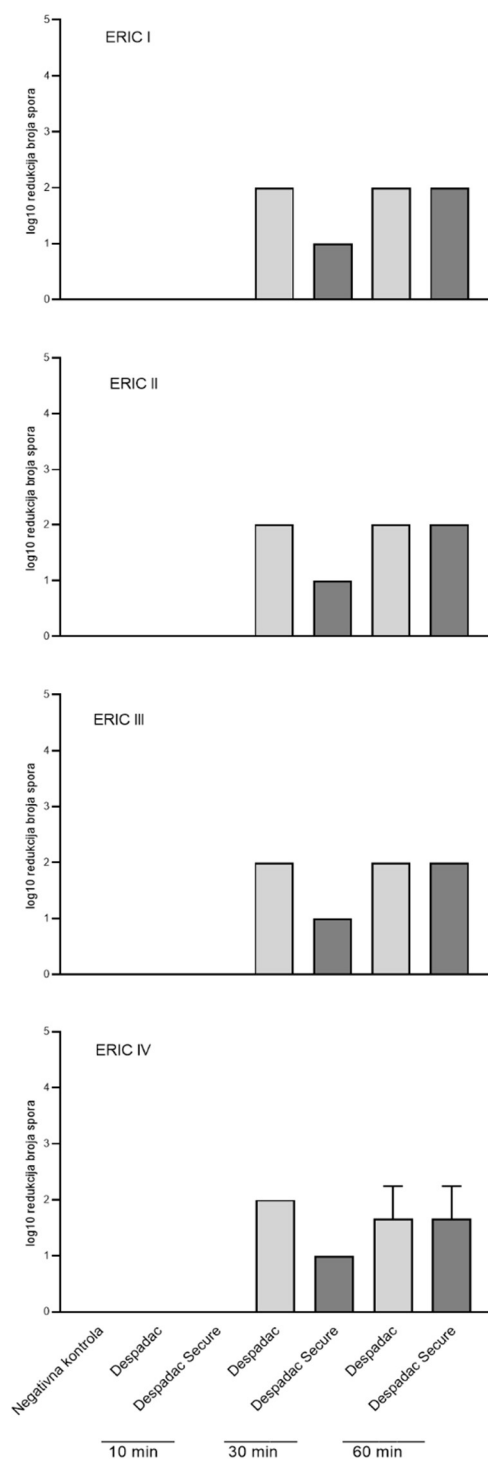


Slika 20. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Despadac i Despadac secure, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; # $p < 0,0001$ .

#### 5.2.4. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE *P. LARVAE*

Rezultati pokazuju kako dezinficijensi iz skupine Despadac nakon 10 minuta izlaganja sporama bakterije *P. larvae* nisu pokazali sporocidno djelovanje, dok je ono nakon 30 minuta izlaganja iznosilo jedan logaritam smanjenja broja spora za Despadac Secure, odnosno dva logaritma smanjenja broja spora za Despadac. Nakon 60 minuta djelovanja oba dezinficijensa ove skupine smanjen je broj spora bakterije *P. larvae* za 99 %, odnosno dezinficijensi su prouzročili smanjenje broja spora za dva logaritma. Rezultati su prikazani na Slici 21. Sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I do ERIC IV) u suspenzijskom testu sporocidnog djelovanja

pokazali su sličnu ili jednaku osjetljivost spram ispitivanih dezinficijensa s aktivnom tvari aldehida.

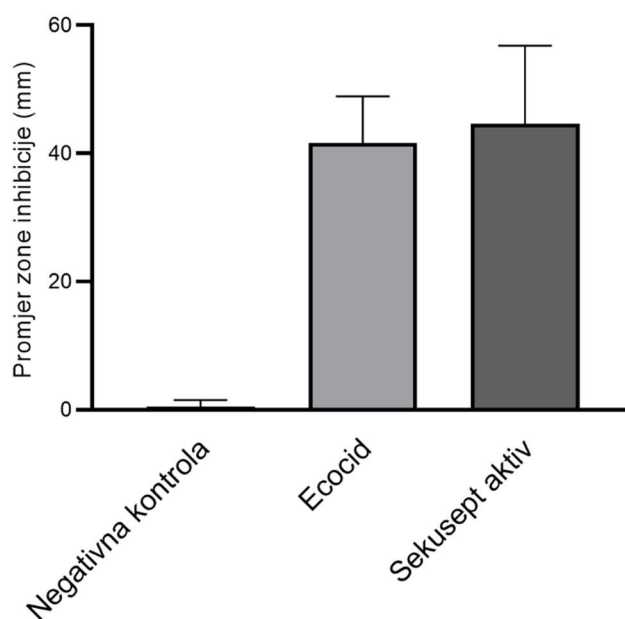


Slika 21. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Despadac i Despadac secure, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

## 5.3. DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI NA BAZI AKTIVNOG KISIKA

### 5.3.1. REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE

Rezultati pokazuju da dezinficijensi čija je glavna aktivna sastavnica aktivni kisik (Ecocid S, Krka i Sekusept Aktiv, Ecolab) statistički značajno djeluju na vegetativne oblike bakterije *P. larvae*, i to na sva četiri genotipa (ERIC I, ERIC II, ERIC III i ERIC IV), stvarajući relativno široki pojas zone inhibicije rasta bakterija (ANOVA,  $F(2,17) = 35,15$ ;  $p < 0,0001$ ). Obzirom da su sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* pokazala sličnu ili jednaku osjetljivost na ispitivane dezinficijense, sve vrijednosti promjera zone inhibicije prikazane su kao objedinjeni rezultati. Rezultati su prikazani na Slici 22. Ecocid S je prouzročio srednju vrijednost promjera zone inhibicije  $41,63 \pm 7,289$  milimetra, dok je Sekusept aktiv uzrokovao nastanak zone inhibicije širine  $44,63 \pm 12,19$  milimetara, a oboje u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu u kojoj je promjer zone inhibicije iznosio 0,5 milimetara.

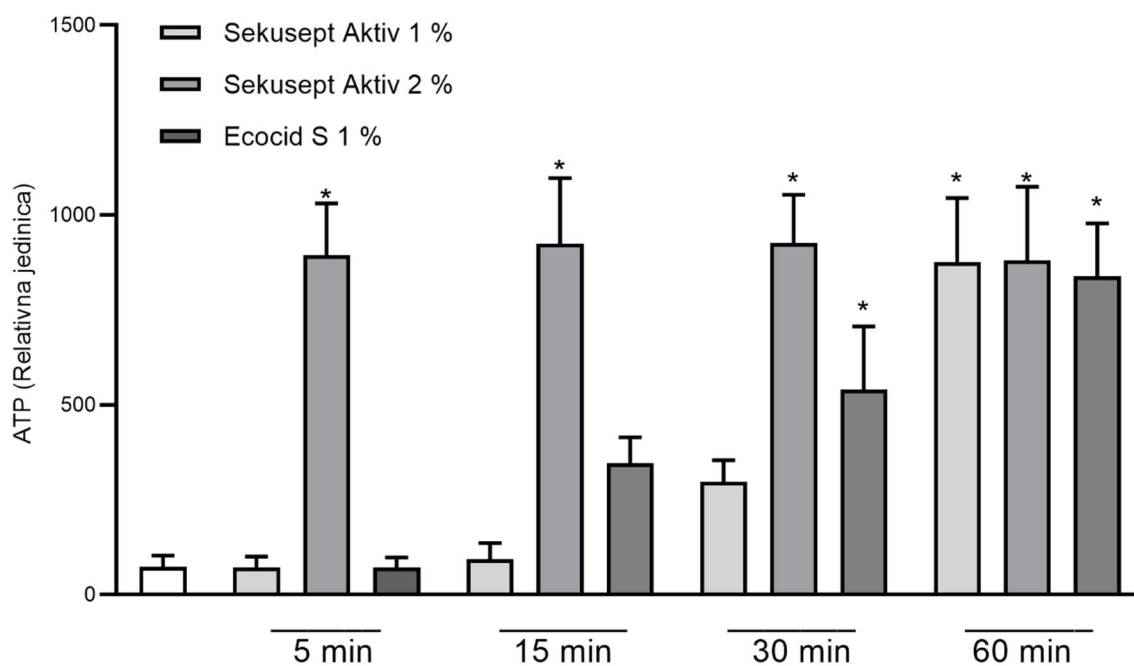


Slika 22. Prikaz vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Ecocid i Sekusept aktiv, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

### 5.3.2. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE *P. LARVAE*

U suspenzijskom testu s primjenjenim živim vegetativnim oblikom bakterija *P. larvae* određena je učinkovitost djelovanja dezinficijensa Ecocid S i Sekusept aktiv tijekom izlaganja sukladno normama za baktericidno djelovanje. Rezultati pokazuju da proizvodi na bazi aktivnog kisika imaju statistički značajno baktericidno djelovanje na *P. larvae* što je posredno utvrđeno mjerenjem količine ATP-a u suspenziji (ANOVA,  $F(12,44) = 46,18$ ,  $p < 0,0001$ ), ovisno o trajanju izloženosti. Zbog jednostavnosti prikaza, a obzirom da su svi genotipovi bakterija pokazali sličnu ili jednaku osjetljivost na primjenjena dezinfekcijska sredstva na bazi aktivnog kisika, na Slici 23. su prikazani zbirni rezultati. Naime, broj relativnih jedinica ATP-a u kontrolnoj netretiranoj skupini je iznosio  $73,40 \pm 13,36$ , dok je djelovanjem dezinficijensa došlo do oslobađanja ATP-a iz oštećenih bakterija *P. larvae* i posljedičnog porasta broja relativnih jedinica. Kod Sekusept aktiva u 2 %-tnoj koncentraciji učinak je bio značajan već nakon 5 minuta izlaganja ( $893,80 \pm 68,66$ ,  $p < 0,0001$ ), a u 1 %-tnoj koncentraciji nakon 30 minuta izlaganja ( $297,50 \pm 28,10$ ;  $p < 0,0001$ ). Djelovanje Ecocid S dezinficijensa nakon 15 minuta djelovanja zabilježen je porast vrijednosti relativnih jedinica ATP-a na  $346,50 \pm 33,98$ , a nakon 30 minuta na  $539,80 \pm 83,54$  ( $p < 0,0001$ ). Nakon 60 minuta izlaganja vegetativnih oblika *P. larvae* kod obje primijenjene koncentracije Sekusept Aktiva, kao i Ecocid-a S, utvrđen je vrlo sličan broj relativnih jedinica što označava njihovo značajno baktericidno djelovanje (vrijednosti relativnih jedinica kako slijedi:  $875,50 \pm 84,95$ ,  $880,0 \pm 97,21$  i  $838,50 \pm 69,65$ ;  $p < 0,0001$ ).

Statistički značajno djelovanje prouzročio je dezinficijens Sekusept aktiv u 2 %- tnoj koncentraciji nakon 5 minuta izlaganja ( $p < 0,0001$ ), dok su Sekusept aktiv u 1 % - tnoj koncentraciji i Ecocid S statistički značajno djelovanje pokazali nakon 30 minuta izlaganja ( $p < 0,0001$ ).

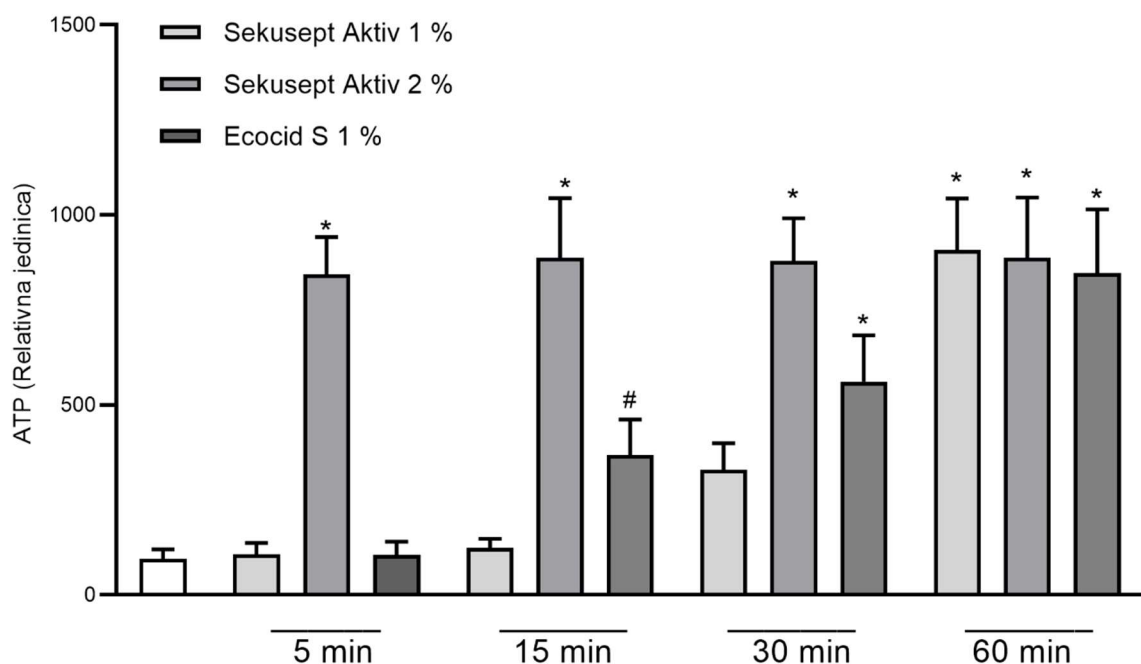


Slika 23. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Ecocid S i Sekusept aktiv, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

### 5.3.3. TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA

Kako bi odredili djelotvornost dezinficijensa Ecocid S i Sekusept aktiv na površinama, površine su prethodno bile opterećene bakterijom *P. larvae*, a zatim tretirane spomenutim dezinficijensima na bazi aktivnog kisika. Na ispitivanoj površini je napravljen bris ( $10 \text{ cm}^2$ ) kako bi odredili vrijednost ATP-a kao mjeru broja raspadnutih bakterija. Rezultati su pokazali da je skupina dezinfekcijskih proizvoda koji sadrže aktivni kisik tijekom 30 minuta izlaganja dovela do povećanja količine ATP-a (ANOVA,  $F(12,77) = 77,92$ ;  $p < 0,0001$ ). U kontrolnoj skupini vrijednost ATP relativnih jedinica je iznosila  $94,43 \pm 9,49$ , dok je nakon 5 minuta izlaganja onečišćenih površina dezinficijensu Sekusept aktiv u koncentraciji 2 % značajno smanjen broj bakterija *P. larvae*, odnosno došlo je do povećanja broja relativnih jedinica ( $843,20 \pm 44,09$ ;  $p < 0,0001$ ). Značajno smanjenje broja bakterija *P. larvae* nakon obrade površine dezinficijensom Ecocid S zabilježeno je nakon 15 minuta izlaganja ( $346,50 \pm 33,98$ ;  $p = 0,0006$ ), odnosno nakon 30 i 60 minuta izlaganja je primjećeno još značajnije povećanje broja relativnih jedinica ATP-a ( $539,80 \pm 83,94$ ;  $838,50 \pm 69,65$ ). Dezinficijens Sekusept aktiv u 1 % koncentraciji značajno smanjuje broj vijabilnih bakterija *P. larvae* nakon 60 minuta djelovanja ( $875,50 \pm 84,95$ ;  $p < 0,0001$ ). Obzirom da je djelovanje dezinficijensa Ecocid S i

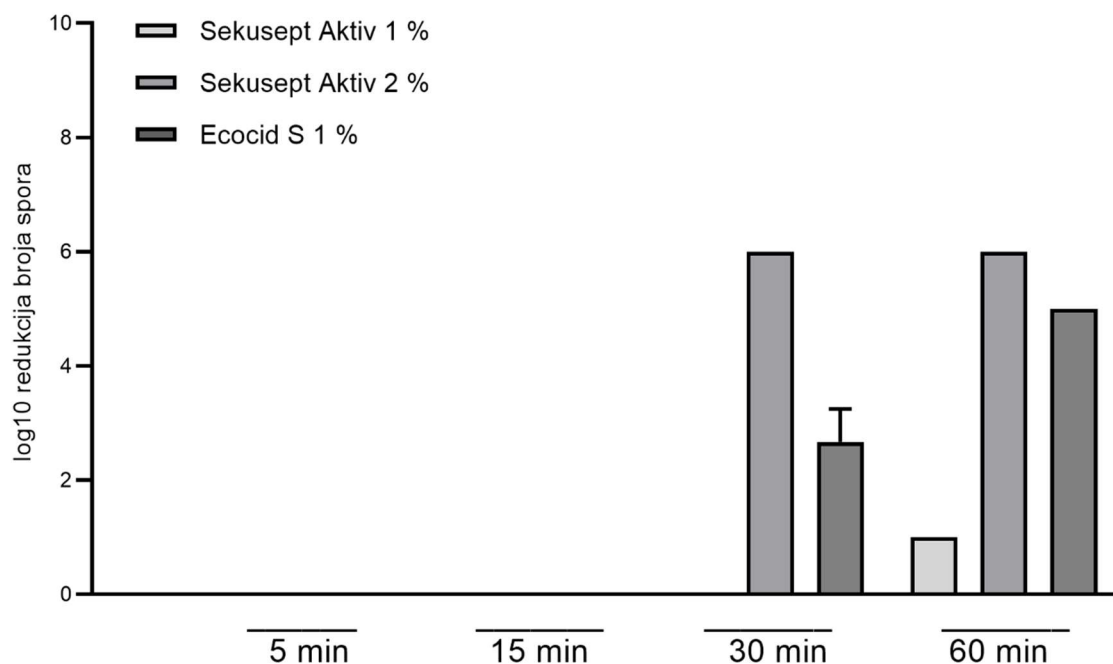
Sekusept aktiv bilo slično spram sva četiri genotipa bakterije *P. larvae*, rezultati su prikazani zbirno (Slika 24.).



Slika 24. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Ecocid S i Sekusept aktiv, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ ; # $p = 0,0006$ .

#### 5.3.4. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE *P. LARVAE*

Rezultati pokazuju kako dezinficijensi s djelotvornom tvari aktivni kisik pokazuju sporocidno djelovanje nakon 30 minuta djelovanja na spore *P. larvae*, i to šest logaritama za Sekusept aktiv 2 % i tri logaritma za Ecocid S 1 %. Nakon 60 minuta djelovanja i Ecocid S i Sekusept aktiv, uzrokuju smanjuje broja spora *P. larvae* za šest odnosno pet logaritama, dok Sekusept aktiv u 1% - tnoj koncentraciji smanjuje broj spora tek za jedan logaritam. Sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I do ERIC IV) u suspenzijskom testu sporocidnog djelovanja pokazuju sličnu ili jednaku osjetljivost spram ispitivanih dezinficijensa, pa su rezultati na Slici 25. prikazani zbirno.



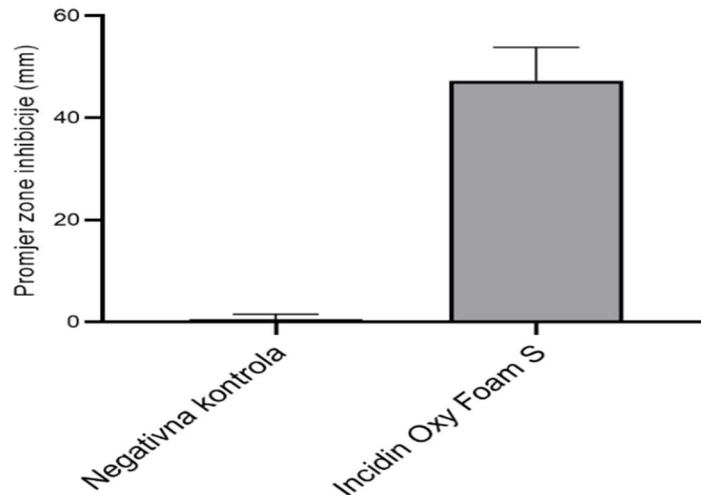
Slika 25. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Ecocid S i Sekusept aktiv, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

## 5.4. DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI NA BAZI VODIKOVOG PEROKSIDA

### 5.4.1. REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE

Rezultati dezinfekcijskog djelovanja proizvoda Incidin OxyFoam S na sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I, ERIC II, ERIC III i ERIC IV) su bili slični ili jednaki, pa su skupno prikazani na Slici 26. Dezinficijens Incidin OxyFoam S je prouzročio stvaranje relativno širokog pojasa zone inhibicije rasta bakterija *P. larvae* koja je iznosila  $47,52 \pm 12,19$  milimetara ( $p < 0,0001$ ).

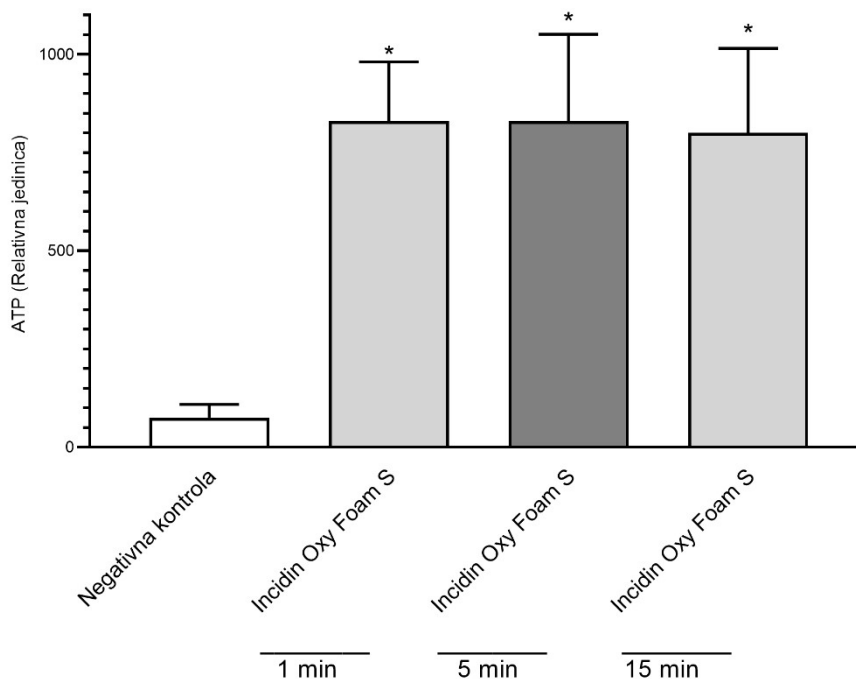




Slika 26. Prikaz rezultata vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvoda Incidin OxyFoam S, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

#### 5.4.2. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE *P. LARVAE*

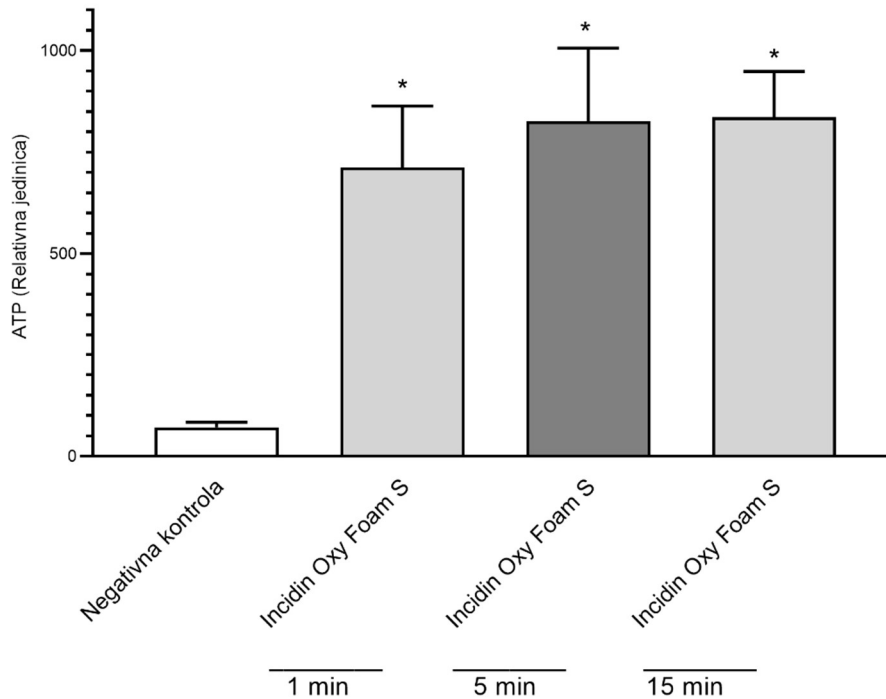
U suspenzijskom testu s primjenjenim živim vegetativnim oblikom bakterija *P. larvae* određena je učinkovitost djelovanja dezinficijensa Incidin OxyFoam S sukladno preporukama proizvođača za baktericidno djelovanje. Rezultati pokazuju da proizvod Incidin OxyFoam S pokazuje baktericidno djelovanje koje je utvrđeno posrednim mjerenjem količine ATP-a u suspenziji, a nakon izloženosti bakterija *P. larvae* tijekom jedne minute. Zbog jednostavnosti prikaza, a obzirom da su svi genotipovi bakterije *P. larvae* (ERIC I, ERIC II, ERIC III, ERIC IV) pokazali sličnu ili jednaku osjetljivost na primjenjeno dezinfekcijsko sredstvo na bazi peroksida, na Slici 27. je prikazan zbirni rezultat. Naime, broj relativnih jedinica ATP-a u kontrolnoj netretiranoj skupini je iznosio  $73,40 \pm 17,15$ , dok je djelovanjem dezinficijensa došlo do oslobađanja ATP-a iz oštećenih bakterija *P. larvae* i posljedičnog porasta broja relativnih jedinica. Nakon djelovanja Incidin OxyFoam S proizvoda tijekom jedne minute izmjerena vrijednost iznosila je  $830,70 \pm 61,39$  ( $p < 0,0001$ ), tijekom pet minuta  $830,70 \pm 83,70$  relativnih jedinica ATP-a, a nakon 15 minuta djelovanja zabilježeno je značajno povećanje vrijednosti na  $801,10 \pm 81,21$  (ANOVA  $F(3,20) = 18,05$ ,  $p < 0,0001$ ).



Slika 27. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodom Incidin OxyFoam S, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

### 5.4.3. TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA

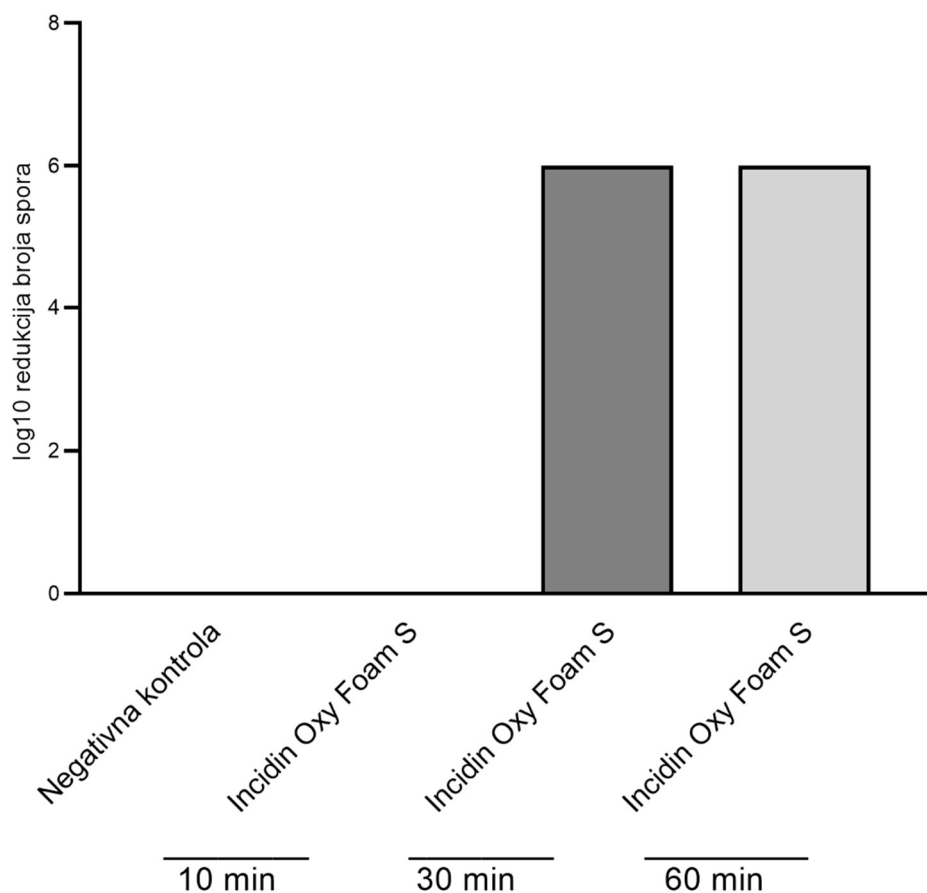
Kako bi odredili djelotvornost dezinficijensa na površinama, površine prethodno opterećene bakterijom *P. larvae* su tretirane proizvodom Incidin OxyFoam S, te je uzet bris na površini 10 cm<sup>2</sup> za određivanje količine ATP-a kao mjere broja raspadnutih bakterija. Rezultati su pokazali da je tijekom 30 minuta izloženosti dezinficijensu dovelo do značajnog povećanja količine ATP-a (ANOVA  $F(3,20) = 32,86$ ,  $p < 0,0001$ ). U kontrolnoj skupini ATP vrijednost je iznosila  $71,25 \pm 12,58$  relativnih jedinica. Nakon jedne minute od tretiranja površine dezinficijensom Incidin OxyFoam S, broj bakterija *P. larvae* značajno je smanjen, odnosno došlo je do povećanja broja relativnih jedinica ATP-a ( $577,70 \pm 57,72$ ,  $p < 0,0001$ ). Daljnje smanjenje broja bakterija *P. larvae* je zabilježeno nakon obrade površine Incidin Oxy Foam S proizvodom nakon pet minuta ( $826,60 \pm 68,11$ ,  $p < 0,0001$ ), odnosno nakon 15 minuta izlaganja ( $836,40 \pm 42,58$ ,  $p < 0,0001$ ). Obzirom da je djelovanje ispitivanog dezinficijensa bilo slično spram sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I do ERIC IV), rezultati su na Slici 28. prikazani zbirno.



Slika 28. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodom Incidin OxyFoam S, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

#### 5.4.4. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE *P. LARVAE*

Rezultati suspenzijskog testa učinka na spore bakterije *P. larvae* nakon primjene Incidin OxyFoam S dezinficijensa koji sadrži aktivnu tvar vodikov peroksid su pokazali njegovo sporocidno djelovanje nakon 30 minuta izlaganja i to za šest logaritama. Sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I do ERIC IV) u suspenzijskom testu sporocidnog djelovanja pokazali su jednaku osjetljivost spram dezinficijensa te su rezultati prikazani zbirno, na Slici 29.



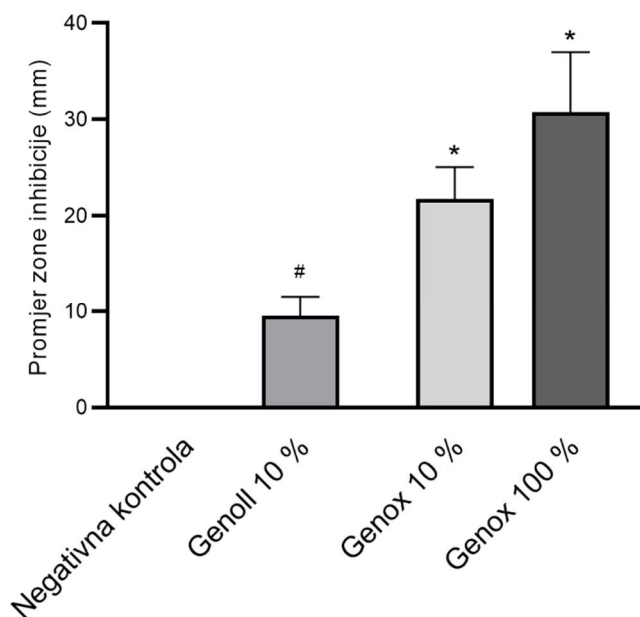
Slika 29. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodom Incidin OxyFoam S, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

## 5.5. DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI NA BAZI HIPOKLORITNE KISELINE

### 5.5.1. REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE

Rezultati pokazuju da sredstva čija je glavna aktivna sastavnica hipokloritna kiselina odnosno hipokloritni ion djeluje na vijabilne oblike bakterije *P. larvae*, i to na sva četiri genotipa (ERIC I, ERIC II, ERIC III i ERIC IV), na jednak način te su stoga vrijednosti promjera zone inhibicije prikazane kao objedinjeni rezultat. Kako je pokazano na Slici 30. proizvod Genox u koncentraciji 10 % pokazuje slabiji dezinfekcijski učinak od nerazrijeđenog proizvoda. Promjer zona inhibicije prouzročen primjenom proizvoda Genoll značajno je manji ( $9,50 \pm 1,041$  mm). Jednostruka analiza varijance pokazala je da Genox u obje koncentracije

ima značajni inhibitorni učinak spram rasta bakterije *P. larvae* ( $p < 0,0001$ ), kao i Genoll ( $p = 0,0088$ ). Rezultati su prikazani na Slici 30.

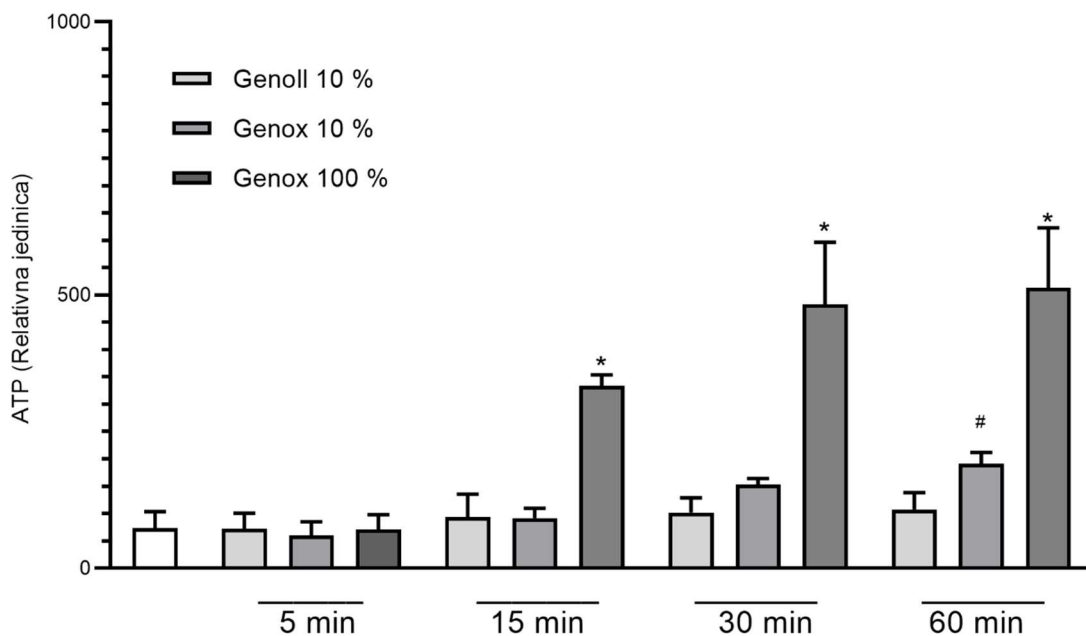


Slika 30. Prikaz vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Genox i Genoll, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ ; # $p < 0,0088$ .

### 5.5.2. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE *P. LARVAE*

U suspenzijskom testu određeno je djelovanje dezinfekcijskih proizvoda Genox i Genoll sukladno preporukama proizvođača. Rezultati su pokazali da primjenjeni dezinfekcijski proizvodi uzrokuju baktericidno djelovanje, a što je posredno izmjereno količinom ATP-a u suspenziji (ANOVA,  $F(12,45) 45,27$ ,  $p < 0,0001$ ). Zbog jednostavnosti prikaza, a obzirom da su svi genotipovi bakterije *P. larvae* pokazali jednaku osjetljivost na primjenjena dezinfekcijska sredstva prikazani su kao zbirni rezultat (Slika 31.). Naime, broj relativnih jedinica ATP-a u kontrolnoj netretiranoj skupini iznosio je  $73,40 \pm 13,36$ , dok je djelovanjem dezinficijensa došlo do oslobađanja ATP-a iz oštećenih bakterija i posljedično povećanja broja relativnih jedinica u suspenziji. Kako je prikazano, dezinfekcijski proizvod Genoll nije prouzročio smanjenje broja bakterija *P. larvae*, te su vrijednosti relativnih jedinica ATP-a u vremenskom okviru tretiranja bile kako slijedi:  $72,33 \pm 12,82$ ;  $93,20 \pm 19,02$ ;  $101,60 \pm 12,25$  i  $107,50 \pm 15,47$ . Slično tome su i dobiveni rezultati djelovanja Genoxa u koncentraciji 10 %, koji tek pri najduljem razdoblju

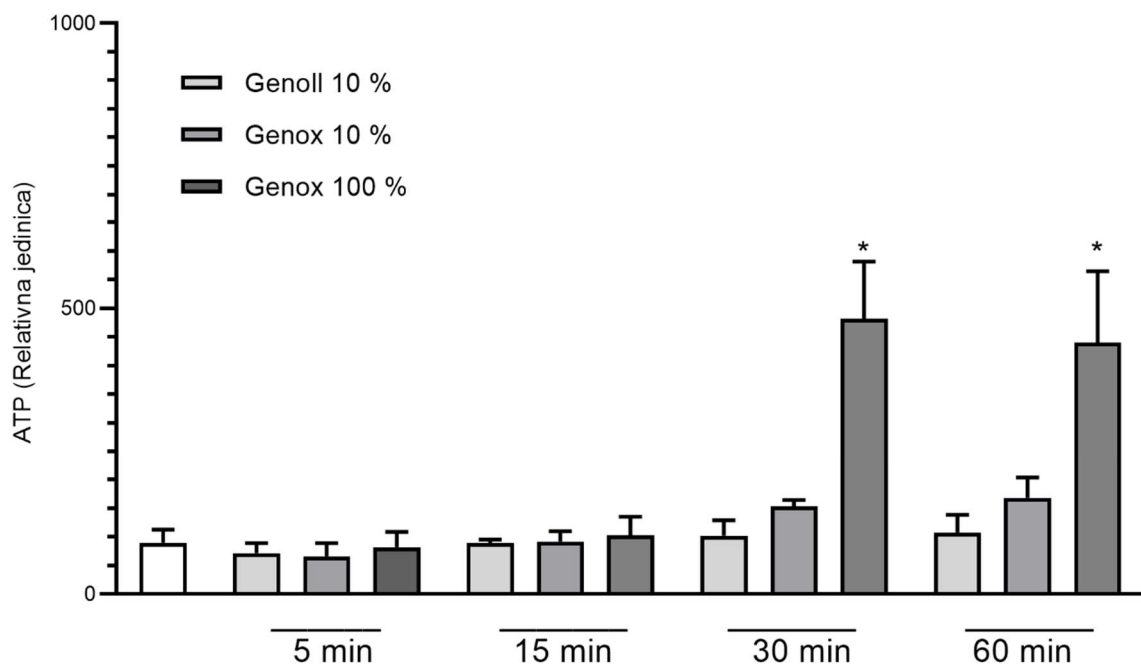
izlaganja doveo do blagog, ali statistički značajnog smanjenja broja bakterija *P. larvae* ( $191,30 \pm 10,33$ ,  $p = 0,03$ ). Suprotno tome, dezinfekcijski proizvod Genox je u 100 %-tnoj koncentraciji već nakon 15 minutnog djelovanja značajno smanjio broj živućih bakterija ( $333,50 \pm 10,24$ ;  $p < 0,0001$ ), također nakon 30 minuta djelovanja ( $483,50 \pm 56,76$ ;  $p < 0,0001$ ) i nakon 60 minuta djelovanja ( $513,50 \pm 54,94$ ;  $p < 0,0001$ ).



Slika 31. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Genox i Genoll, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ ; # $p < 0,001$ .

### 5.5.3. TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA

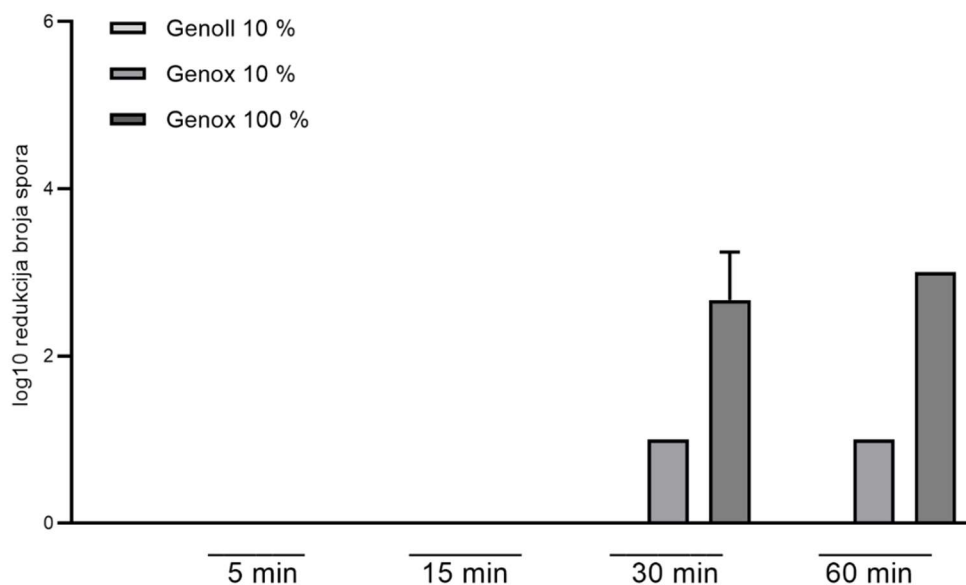
Površine prethodno opterećene bakterijom *P. larvae* su tretirane dezinfekcijskim proizvodima Genox i Genoll te je uzet bris na površini  $10 \text{ cm}^2$  kako bi odredili količinu ATP-a kao mjeru broja raspadnutih bakterija. Rezultati su pokazali da je primjenjena skupina proizvoda dovela do povećanja količine ATP-a (ANOVA  $F(12,57) = 39,38$ ;  $p < 0,0001$ ). Međutim, značajno djelovanje na smanjenje broja bakterija *P. larvae* pruzročio je samo Genox u 100 %-tnoj koncentraciji, nakon 30 minuta djelovanja ( $481,80 \pm 40,86$ ;  $p < 0,0001$ ) i 60 minuta djelovanja ( $440,40 \pm 46,95$ ,  $p < 0,0001$ ). U kontrolnoj skupini vrijednost relativnih jedinica ATP-a je iznosila  $89,33 \pm 9,47$ . Obzirom da je djelovanje primjenjenih dezinfekcijskih proizvoda na sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I, ERIC II, ERIC III, ERIC IV) bilo jednako, rezultati su prikazani zbirno na Slici 32.



Slika 32. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Genox i Genoll, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

#### 5.5.4. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE *P. LARVAE*

Rezultati su pokazali kako dezinfekcijski proizvod Genoll nije prouzročio sporocidno djelovanje na spore bakterije *P. larvae*. Genox je u koncentraciji 10 % prouzročio smanjenje broja spora bakterije *P. larvae* za jedan logaritam, a u 100 % koncentraciji za tri logaritma tijekom djelovanja 30 i 60 minuta. Sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I do ERIC IV) u suspenzijskom testu sporocidnog djelovanja pokazali su jednaku osjetljivost spram testiranih biocida te su rezultati prikazani zbirno (Slika 33.).



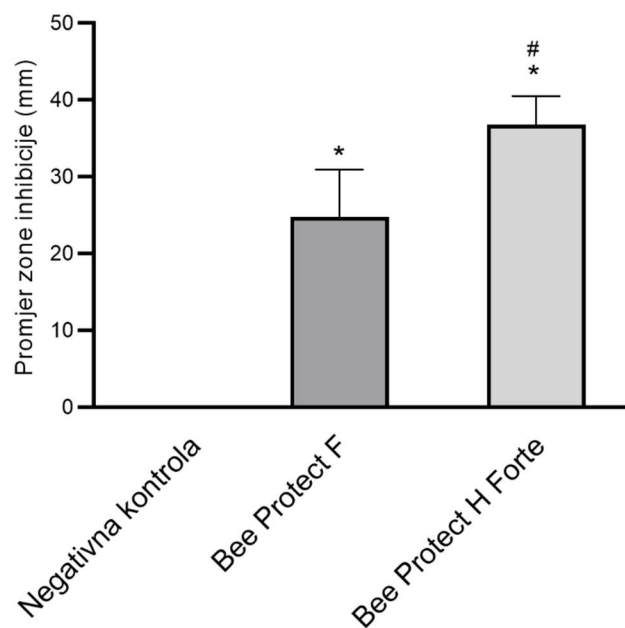
Slika 33. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Genox i Genoll, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

## 5.6. DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI LINIJE BEE PROTECT

### 5.6.1. REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE

Rezultati su pokazali da proizvodi Bee protect linije imaju značajan učinak na rast bakterije *P. larvae* u testu stvaranja zone inhibicije (ANOVA,  $F(2,9) = 80,27$ ;  $p < 0,0001$ ). Primjenom proizvoda Bee Protect F prouzročeno je stvaranje zone inhibicije  $24,75 \pm 3,09$  milimetra, a primjenom proizvoda Bee Protect H Forte zona inhibicije od  $36,75 \pm 1,89$  milimetra. Oba opisana rezultata u usporedbi s vrijednostima negativne kontrole su statistički značajni ( $p < 0,0001$ ). Također, statistička analiza je pokazala da je dezinfekcijski proizvod Bee Protect H Forte značajnije učinkovit ( $p < 0,001$ ) u usporedbi s proizvodom Bee Protect F. Rezultati su prikazani na Slici 34.

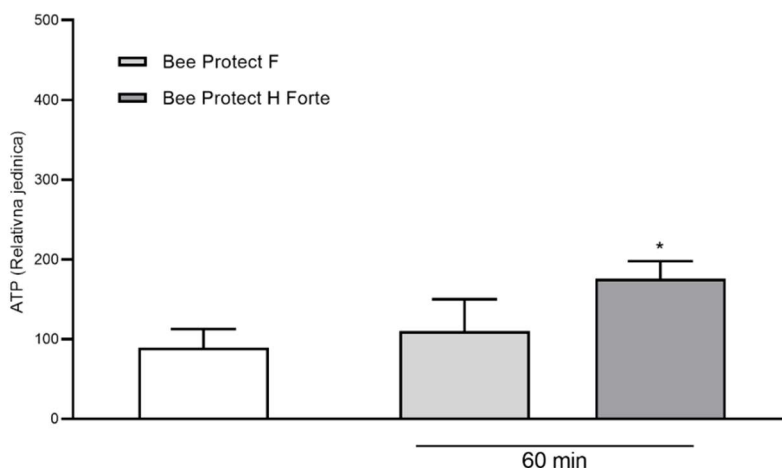




Slika 34. Prikaz vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Bee Protect F i Bee Protect H Forte, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; # - razlika u učinkovitosti između pokusnih skupina, \*# $p < 0,0001$ .

### 5.6.2. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA VIJABILNE BAKTERIJE *P. LARVAE*

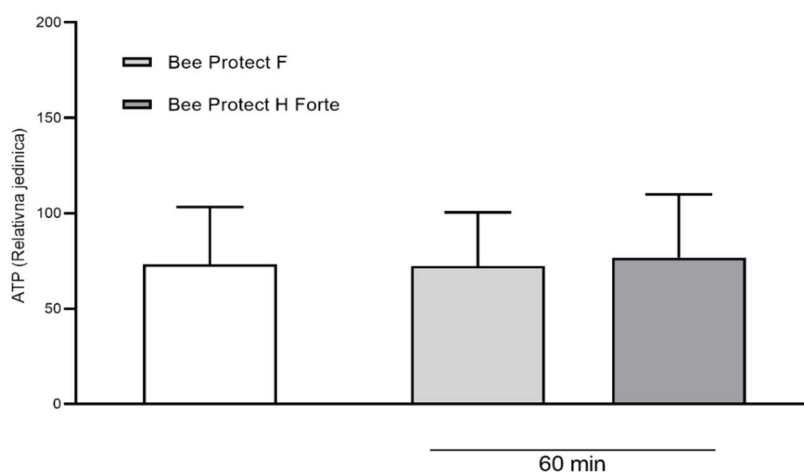
Obzirom da dezinfekcijsko djelovanje proizvoda Bee Protect F i Bee Protect H Forte na bakteriju *P. larvae* u suspenzijskom testu za izlaganje kraće od 60 minuta nije pokazalo nikakvu razliku u odnosu na negativnu kontrolu, ti rezultati za navedene proizvode iz linije Bee Protect nisu prikazani. Rezultati djelovanja proizvoda Bee Protect H Forte na vegetativni oblik bakterije *P. larvae* pokazali su kako je došlo do značajnog povećanja količine slobodnog ATP-a koji je pokazatelj raspadanja bakterija *P. larvae*. Posljedično tome došlo je do statistički značajnog smanjenja broje bakterija *P. larvae* (ANOVA,  $F(2,15) = 13,79$ ;  $p = 0,0004$ ), što je prikazano na Slici 35.



Slika 35. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Bee Protect F i Bee Protect H Forte, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

### 5.6.3. TEST DEZINFEKCIJSKOG DJELOVANJA NA POVRŠINAMA

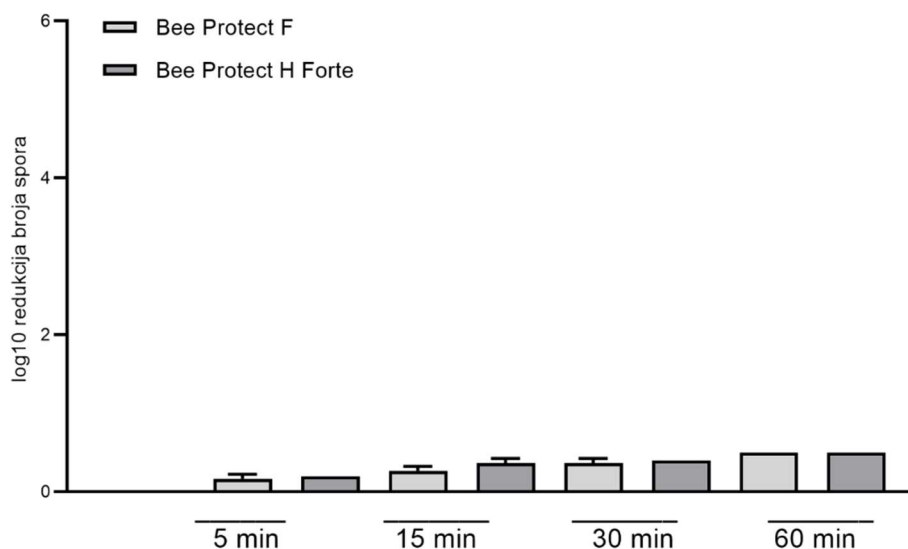
Nakon tretmana površine opterećene bakterijom *P. larvae* dezinfekcijskim proizvodima iz linije Bee Protect, čak niti nakon 60 minutnog djelovanja nije došlo do povećanja vrijednosti relativnog broja ATP jedinica. Sukladno tome primjenjeni dezinfekcijski proizvodi nisu prouzročili smanjenje broja bakterija *P. larvae*. Vrijednosti relativnih jedinica ATP-a za negativnu kontrolu su iznosile  $73,40 \pm 13,36$ ; za proizvod Bee Protect F  $72,33 \pm 11,51$ ; te za proizvod Bee Protect H Forte  $76,67 \pm 13,57$ . Rezultati su prikazani na Slici 36.



Slika 36. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Bee Protect F i Bee Protect H Forte, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

#### 5.6.4. SUSPENZIJSKI TEST UČINKA NA SPORE BAKTERIJE *P. LARVAE*

Rezultati suspenzijskog testa sporocidne učinkovitosti na spore bakterije *P. larvae* su pokazali kako proizvodi iz skupine Bee Protect ne pokazuju sporocidno djelovanje ili je ono zanemarivo jer i tijekom izlaganja od 60 minuta smanjuju broj spora za manje od jednog logaritma. Sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I do ERIC IV) u suspenzijskom testu sporocidnog djelovanja pokazuju jednaku osjetljivost spram testiranih biocida te su rezultati prikazani zbirno (Slika 37.).



Slika 37. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Bee Protect F i Bee Protect H Forte, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

### 5.7. DEZINFEKCIJSKI PROIZVODI LINIJE EFEKTIVNI

#### MIKROORGANIZMI

#### 5.7.1. REZULTATI VRIJEDNOSTI PROMJERA ZONE INHIBICIJE

Ispitan je učinak efektivnih mikroorganizama na bakteriju *P. larvae* i rezultati su pokazali kako su vidljive zone inhibicije širine tek nekoliko milimetara, pa za proizvod EM® PROBIOTIK ZA PČELE nisu napravljene dodatne analize.

## 5.8. DJELOVANJE DEZINFICIJENSA NA TERENSKJE IZOLATE

### BAKTERIJE *P. LARVAE*

Rezultati provedenog istraživanja su pokazali da je djelovanje dezinficijensa na bakteriju *P. larvae*, i u vegetativnom obliku i na spore, za sve genotipove (ERIC I do ERIC IV) jednako te su stoga prikazani skupni rezultati za sve terenske izolate, bez podjele po genotipu. Kako je prikazano u Tablici 3. baktericidno djelovanje tijekom izlaganja od 30 minuta imaju Ecocid S, Sekusept Aktiv 2 %, Incidin OxyFoam S i Genox u 100 %-tnoj koncentraciji. Produljenjem trajanja dezinfekcijskog djelovanja na 60 minuta, osim pobrojanih, baktericidni učinak pokazali su Despadac i Despadac Secure, te Sekusept Aktiv u koncentraciji 1 %.

Vrlo slično učincima dezinficijensa u suspenziji, utvrđeni su rezultati dezinfekcijskog djelovanja na površinama, s razlikom da unutar izlaganja od 30 minuta učinak pokazuje i Sekusept Aktiv koncentracije 1 %. Genox u koncentraciji 100 % je baktericidni učinak prouzročio tek nakon 60 minuta djelovanja na bakteriju *P. larvae*.

Sporocidno djelovanje dezinficijensa je ispitano sukladno podacima na deklaraciji proizvođača pojedinog dezinfekcijskog proizvoda. Proizvodi iz Despadac linije pokazali su blagi dezinfekcijski učinak, odnosno prouzročili su smanjenje broja spora *P. larvae* za dva logaritma (99 %). Genox u 10 %-tnoj koncentraciji smanjio je u obje duljine izlaganja broj spora *P. larvae* za jedan logaritam, a u 100 %-tnoj koncentraciji za tri logaritma. Najsnažnije sporocidno djelovanje prouzročili su proizvodi Ecocid S, Sekusept Aktiv 2 % i Incidin OxyFoam S (tri odnosno šest logaritama kod izlaganja tijekom 30 minuta; i 5 odnosno 6 logaritama kod izlaganja tijekom 60 minuta). Rezultati su prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz rezultata djelovanja dezinfekcijskih proizvoda na terenske izolate bakterije *P. larvae*.

	Baktericidno djelovanje – suspenzija (15 / 30 min)	Baktericidno djelovanje – površina (15 / 30 min)	Sporocidno djelovanje – suspenzija (30 / 60 min)
Despadac	- / +	- / +	2 log / 2 log
Despadac Secure	- / +	- / +	1 log / 2 log
Ecocid S 1 %	+ / +	+ / +	3 log / 5 log

Sekusept Aktiv 1 %	- / +	+ / +	0 log / 2 log
Sekusept Aktiv 2 %	+ / +	+ / +	6 log / 6 log
Incidin Oxyfoam S	+ / +	+ / +	6 log / 6 log
Genoll 10 %	- / -	- / -	0 log / 0 log
Genox 10 %	- / -	- / -	1 log / 1 log
Genox 100 %	+ / +	- / +	3 log / 3 log
Bee Protect F	- / -	- / -	0 log / 0 log
Bee Protect H Forte	- / -	- / -	0 log / 0 log
EM PROBIOTIK ZA PČELE	- / -	- / -	0 log / 0 log

## 6. RASPRAVA

AGMP je zarazna bolest nepoklopljenog i poklopljenog pčelinjeg legla koja nanosi pčelarstvu višestruke štete (GENERSCH, 2010.). Uzročnik bolesti je bakterija *P. larvae* koja u nepovoljnim uvjetima za razmnožavanje tvori dugo živuće i otporne spore (GENERSCH i sur., 2006.). Tvrdokoran tijek bolesti, otpornost uzročnika, poteškoće u kliničkoj dijagnostici i suzbijanju učinili su ovu bolest jednom od najtežih u svijetu (LOCKE i sur., 2019.). Bolesne pčelinje zajednice bez provedbe posebnih mjera ne mogu ozdraviti, a primjena antibiotika u liječenju bolesti nije dozvoljena zbog mogućeg utvrđivanja njihovih rezidua u pčelinjim proizvodima (BARGAŃSKA i sur., 2011.), rezistencije uzročnika (EVANS, 2003.; MURRAY i sur. 2007.) te spoznaje da antibiotici djeluju samo na vegetativne oblike bakterije *P. larvae*. Pri tome primjenom antibiotika može se prikriti kliničke simptome, a oni ne uništavaju infektivne spore uzročnika što doprinosi horizontalnom širenju bolesti u pčelinjacima (OLDROYD i sur., 1989.). Bolesnu pčelinju zajednicu najbolje je sanirati spaljivanjem zajedno s košnicom i sporama onečišćenim priborom (ALLIPI, 2014.; GENERSCH, 2010.). Nakon provedbe sanacijskih mjera nužno je odraditi završnu dezinfekciju čiji uspjeh ovisi o izboru učinkovitog dezinficijensa, preporučenoj koncentraciji radnih otopina, načinu i dužini trajanja aplikacije, vrsti mikroorganizama koji se žele ukloniti te površini/materijalu koji se dezinficira (BEDNÁŘ i sur., 2009.).

Patogeneza, klinička slika i stupanj virulentnosti kod AGMP poglavito ovise o genotipu *P. larvae* (DJUKIC i sur., 2014.). Dosad je utvrđeno pet genotipova *P. larvae* (BEIMS i sur., 2020.) koji se međusobno fenotipski razlikuju u morfologiji (GENERSCH i sur., 2006.), biokemijskim čimbenicima (NEUENDORF i sur., 2004.), virulenciji (GENERSCH i sur., 2005.; RAUCH i sur., 2009.) te čimbenicima koji utječu na virulenciju (POPPINGA i sur., 2012.; FÜNFHAUS i sur., 2013.).

Poznavanje rasprostranjenosti i dinamike pojavnosti pojedinih genotipova *P. larvae* na određenom području pruža uvid u patofiziološke procese na razini ličinke/pčelinje zajednice te utječe na procjenu rizika od pojave karakteristične vidljive kliničke slike AGMP jer postoji značajna korelacija između genotipa i pojavnosti znakova bolesti (LONCARIC i sur., 2009.).

Tako su tijekom posljednjih desetljeća najčešće izolirani genotipovi iz meda ili pčelinjih zajednica oboljelih od AGMP, ERIC I i ERIC II (GENERSCH i sur., 2006.). Genotipovi ERIC III i ERIC IV imaju slabiju učestalost (EBELING i sur., 2016.; BEIMS i sur., 2020.) te su

zastupljeni uglavnom u povijesnim izolatima (GENERSCH i sur., 2006.), dok je genotip ERIC V nedavno utvrđen u jednom uzorku meda iz Španjolske (BEIMS i sur., 2020.).

Također, utvrđene su značajne razlike u pojavnosti na određenom prostoru te stupnju patogenosti odnosno virulencije između genotipova ERIC I do ERIC II (GENERSCH i sur., 2005.; GENERSCH i sur., 2006.; RAUCH i sur., 2009.). Naime, utvrđena je negativna korelacija virulencije bakterije *P. larvae* na razini ličinke i razini pčelinje zajednice te epizootiološka prevalencija genotipa ERIC I u terenskim uvjetima (RAUCH i sur., 2009; BEIMS i sur., 2020). Genotip ERIC I je visoko virulentan za pčelinju zajednicu što dovodi do njenog brzog propadanja u usporedbi s genotipom ERIC II koji pokazuje nižu virulenciju na razini pčelinje zajednice i time uzrokuje njeno sporije propadanje. Međutim, na razini ličinke, genotip ERIC II uzrokuje uginuće svih zaraženih pčelinjih ličinki za sedam dana, a genotip ERIC I za 12 dana. Tako RAUCH i suradnici (2009.) smatraju da se genotip ERIC I bakterije *P. larvae* evolucijski prilagodio kako bi izbjegao higijensko ponašanje pčela čistačica.

BEIMS i suradnici (2020.) utvrdili su da je 66,7 % terenskih izolata pripadalo genotipu ERIC I, a 29,6 % izolata genotipu ERIC II iz uzoraka skupljenih na području Europe, Južne Amerike, Azije, Novog Zelanda i Meksika. Međutim, ŽUGELJ i suradnici (2021.) utvrdili su u svojim istraživanjima na pčelinjacima u Sloveniji da je 70,2 % izolata pripadalo genotipu ERIC II, a 29,8 % terenskih izolata genotipu ERIC I. Visoka pojavnost genotipa ERIC II u Sloveniji vjerojatno je rezultat monitoringa pčelinjih zajednica na spore *P. larvae* u medu i/ili uzorcima ostataka s podnica košnica tijekom zime u pčelinjim zajednicama te posljedično uspješne identifikacije i uklanjanja pčelinjih zajednica zaraženih genotipom ERIC I, za razliku od težeg utvrđivanja pčelinjih zajednica zaraženih genotipom ERIC II. Naime, pčelinje zajednice zaražene genotipom ERIC II često služe kao prikriveni rezervoar za horizontalni prijenos spora bakterije *P. larvae* unutar i između pčelinjaka (ŽUGELJ i sur., 2021.).

U našim istraživanjima na pčelinjacima na području RH u razdoblju 2010. do 2020. godine, od ukupnog broja uspješno analiziranih uzoraka ( $n = 41$ ), većina terenskih izolata je pripadala genotipu ERIC I (90,3 %), dok su tek tri izolata, uzorkovana iz međusobno udaljenih geografskih lokacija (Križevci, Pregrada i Požega), pripadala genotipu ERIC II (7,3 %). Za devet terenskih izolata *P. larvae* nakon provedene genotipizacije primjenom molekularne metode REP-PCR vizualizacija rezultata na agaroznom gelu nije bila prikladna za interpretaciju.

Kod jednog je izolata *P. larvae* postavljena sumnja na genotip ERIC IV (2,4%) (148/16, Gornja Stubica) te je potrebna daljnja verifikacija takvog nalaza posebice sa stanovišta da genotipovi ERIC III i ERIC IV nisu bili izolirani iz terenskih uzoraka već desetljećima i

utvrđeni su samo u arhiviranim kolekcijama bakterijskih kultura (GENERSCH, 2010.). Budući ne postoje anamnestički podaci vezani uz uzorkovanje promijenjenog pčelinjeg legla, može se pretpostaviti da je pčelar koristio staru opremu odnosno vosak, med i/ili dodatke hrani nepoznatog i/ili inozemnog podrijetla.

Izrazito velik udio izolata bakterije *P. larvae* koji pripadaju genotipu ERIC I može se objasniti izostankom sustavnog monitoringa na prisutnost AGMP na pčelinjacima, poput redovnih kliničkih pretraga prije selidbe pčelinjih zajednica, odnosno rane dijagnostike pretragom meda, pčela ili ostataka na podnici košnice prikupljenih tijekom zimskih gubitaka na prisutnost spora *P. larvae*. Štoviše, predmetni uzorak uzet je iz pčelinje zajednice u kojoj je pčelar postavio, a ovlaštenu veterinar potvrdio sumnju na AGMP na temelju tipičnih kliničkih znakova (TLAK GAJGER i sur., 2021.). To je u korelaciji sa spoznajom da je genotip ERIC I slabije virulentan na razini pojedinačne pčelinje ličinke, pa zaražene ličinke ugibaju nakon poklapanja stanica saća, te se klinički znakovi bolesti mogu jasno uočiti jer pčele čistačice nisu brzo uklonile uginule ličinke. Primjerice, istraživanjima provedenim na pčelinjacima u Austriji (LONCARIC i sur., 2009.) i u Italiji (BASSI i sur., 2014.) utvrđena je neznatna razlika u pojavnosti između genotipova ERIC I (58 %) i ERIC II (42 %) u austrijskim pčelinjacima, odnosno veća zastupljenost genotipa ERIC I (78,6 %) u odnosu na genotip ERIC II (18,6 %) u talijanskim pčelinjacima. To je vjerojatno posljedica slabijeg pasivnog monitoringa od strane pčelara u obje države. Slični rezultati dobiveni su istraživanjem u Belgiji (DESCAMPS i sur., 2016.) i tijekom pasivnog monitoringa AGMP na Kosovu (HULAJ i sur., 2021.). Istraživanjima provedenim u Južnoj Americi (ALIPPI i sur., 2004., ANTÚNEZ i sur., 2007.) i SAD-a autori su u terenskim izolatima utvrdili prisutnost isključivo *P. larvae* genotipa ERIC I (KRONGDANG i sur., 2019.). Međutim, prema rezultatima nedavno provedenih istraživanja o raširenosti ERIC genotipova bakterije *P. larvae* u Češkoj, utvrđena je visoka prevalencija genotipa ERIC II (80,4 %) u odnosu na genotip ERIC I (19,6 %), a koji je najučestalije utvrđen u graničnim područjima prema Poljskoj, Slovačkoj i Austriji (BIOVÁ i sur., 2021.). Izrazita pojavnost *P. larvae* genotipa ERIC II vjerojatno je također posljedica dugogodišnjeg aktivnog monitoringa AGMP od strane Državne veterinarske administracije. Povećanje učestalosti bakterije *P. larvae* genotipa ERIC II-ST10 u posljednjih desetak godina utvrđeno je u okviru istraživanja u pčelinjacima u Japanu, ali bez objašnjenja uzroka njihove veće zastupljenosti (UENO i sur., 2018.).

Naše istraživanje nedvojbeno upućuje na nužnu izradu i provedbu novog modela monitoringa pčelinjih zajednica na prisutnost AGMP na području RH koji bi uključivao aktivni i pasivni monitoring te ranu dijagnostiku AGMP kao akt utvrđivanja pčelinjih zajednica



kliconoša/rezervoara bolesti odnosno prevencije širenja vidljive kliničke slike bolesti u pčelinjacima.

Natrijev hipoklorit (NaOCl) je učestalo korišteno dezinfekcijsko sredstvo u prehrambenoj industriji, procesiranju vode, ali i na pčelinjacima posebice zbog lake dostupnosti i niske cijene. Natrijev hipoklorit ima brojne dezinfekcijske učinke, no učinkovitost mu ovisi o koncentraciji dostupnog klora i pH otopine. Naime, hipoklorasta kiselina (HOCl) je slaba kiselina i disocira na hipokloritni ion ( $\text{-OCl}$ ) i proton ( $\text{H}^+$ ) ovisno o kiselosti otopine. Hipoklorasta kiselina, aktivna sastavnica u natrijevom hipokloritu, brzo reagira s proteinima, DNK, lipidima, tiolima i disulfidima, te se vjeruje kako je klijanje spora bakterije *P. larvae* onemogućeno djelovanjem aktivne tvari na unutarnju membranu izloženih spora (YOUNG i SETLOW, 2003.).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da dva testirana dezinfekcijska proizvoda pod nazivima Genox i Genoll pokazuju inhibitorno djelovanje na vegetativne oblike bakterije *P. larvae* u agar difuzijskom testu, a za Genox rezultat je ovisio o njegovoj primijenjenoj koncentraciji. U suspenzijskom testu dobiven je značajan inhibitorni učinak nerazrijeđenog Genoxa već nakon 15 minuta primjene te je taj učinak bio ovisan o trajanju izlaganja bakteriji *P. larvae*. Sličan rezultat je dobiven i u testu dezinfekcijskog učinka na površinama, no tada je značajan učinak opažen nakon 30 minuta i nije bio ovisan o daljnjem produljenju kontakta. Štoviše, učinak Genoxa nakon 60 minuta u blagom je slabljenju što se može povezati sa činjenicom da svi biocidi koji kao aktivnu komponentu imaju klor imaju vremenski ograničeno djelovanje zbog njegovog trošenja tijekom izloženosti okolišnim čimbenicima. Istraživanja su također pokazala da se dezinficijensi temeljeni na hipokloritu pojačano troše kod prisutnosti organske tvari, te je za njihov učinak izuzetno značajno ima li u okruženju proteina, nukleinskih kiselina ili drugih organskih tvari koje mogu uzrokovati smanjenje njihove djelotvornosti (GODA i sur., 2017.). Mikrobicidni učinak klor ostvaruje oksidativnim oštećenjem funkcionalnih molekula mikroorganizmima, primjerice DNK ili proteina (FUKUZAKI i sur., 2006.), te njihovo djelovanje ovisi o oksidativnom potencijalu. Sam oksidacijski potencijal klora određen je razinom slobodno dostupnog klora (reaktivni klor). Kod hipokloritne kiseline ukupni klor je ekvivalentan slobodnom kloru, jer je ukupan klor ( $\text{HClO}$ ,  $\text{ClO}^-$ ) uključen u nukleofilne reakcije (GORDON i sur., 1972.).

Rezultati istraživanja su pokazali da su suhe spore bakterija osjetljivije na NaOCl nego vlažne spore (OKAYAMA i sur., 1997.). Naime, OKAYAMA i suradnici (1997.) nisu pronašli nijednu sporu u fazi klijanja nakon 40-minutnog izlaganja NaOCl - u spora u suhom okolišu, dok je u vlažnom okolišu bila djelotvorna koncentracija tek iznad 0,025 % aktivnog klora. Kako

je u ovom istraživanju sporocidnog djelovanja na *P. larvae* mikrookoliš u vlažnim uvjetima, pri kojima Genox u 10 %-tnoj smanjuje broj klijajućih spora za jedan logaritam, odnosno 100 %-tnoj za tri logaritma nakon 30 minuta kontaktnog djelovanja, za pretpostaviti da je da ovaj dezinficijens nema poželjan sporocidni profil zbog predugog vremena koje je potrebno da bi se ostvario sporocidni učinak, koji je ujedno i vrlo ograničen.

Naime za dobru sporocidnu aktivnost za očekivati je smanjenje broja spora *P. larvae* za minimalno 5 logaritama u realnom kontaktnom vremenu. Sporocidna aktivnost od 30 i više minuta kontaktnog djelovanja zahtjeva uranjanje onečišćene opreme u dezinfekcijsku otopinu što čini dezinfekciju otežanom i relativno skupom.

Vodikov peroksid je dobro poznato sredstvo koje se koristi u različite svrhe, a jedna od njih je dezinfekcija. U dezinfekcijskim sredstvima koja sadrže djelatnu tvar vodikov peroksid, on je stabiliziran kako ne bi došlo do smanjenja njegove dezinfekcijske aktivnosti tijekom vremena, obzirom da je prirodno nestabilan te dolazi do njegovog razlaganja na vodu i vodik. Naime, antimikrobno djelovanje ovisi o koncentraciji, svjetlosti, pH, temperaturi, prisutnosti teških metala i organskih tvari, pa je stabilizacija jedan od ključnih elemenata za njegovu uporabu kao dezinfekcijskog sredstva. Osim kao nepovoljna osobitost, oksidacijski procesi i razlaganje vodikovog peroksida ujedno su i njegova poželjna osobitost, jer prilikom odvijanja dezinfekcijskog procesa ne ostavljaju rezidue, što omogućava korištenje predmeta i opreme odmah nakon dezinfekcije, te bez potrebe za naknadno ispiranje.

Kao biocid, vodikov peroksid djeluje izravno putem radikalima posredovanih reakcija kojima dovodi do oksidacije organskog materijala (CHAPMAN, 2003.). Vodikov peroksid tako dovodi do oksidacije lipida i proteina vanjskog omotača bakterijske stanice, odnosno spora olakšavajući prodiranje dezinficijensa u unutarstanične odjeljke i protoplast bakterijskih spora. Antimikrobno djelovanje vodikovog peroksida pripisuje se također i stvaranju hidroksilnih radikala. Hidroksilni radikali kada su prisutni u dovoljnim koncentracijama mogu oštetiti nukleinske kiseline, proteine i lipide (JUVEN i PIERSON, 1996.). Za razliku od vegetativnih oblika bakterija, usmrćivanje spora vodikovim peroksidom ne uključuje oštećenje njihovog DNK.

U ovom istraživanju učinka komercijalno dostupnih dezinficijensa različitog kemijskog sastava, kao predstavnika koji sadrži vodikov peroksid izabrali smo proizvod Incidin OxyFoam S, s deklarirano sporocidnim djelovanjem i sadržajem stabiliziranog vodikovog peroksida od 1,5 grama na 100 grama tekućine. Rezultati su pokazali da ovaj dezinfekcijski proizvod, sukladno deklaraciji proizvođača, uzrokuje antimikrobno djelovanje na vegetativne oblike bakterije *P. larvae* već nakon izlaganja u trajanju jedne minute, i to u suspenzijskom testu i u

testu na površinama. Također, sporocidno djelovanje Incidin OxyFoam S je utvrđeno na razini smanjenja šest logaritama nakon 30 minuta kontakta.

U istraživanju SATTAR i suradnika (1998.) rezultati su pokazali je da je 7 % - tna otopina vodikovog peroksida tek nakon šest sati izlaganja bakterijama dovela do inaktivacije njihovih spora. U drugom istraživanju rezultati su pokazali da spore roda *Bacillus* spp. izložene 10 % - tnom vodikovom peroksidu tijekom jednog sata nisu sposobne germinirati (WARDLE i RENNINGER, 1975.). Ova istraživanja su izvedena s vodikovim peroksidom koji nije u kombinaciji s drugim tvarima, pa čak ni pomoćnim iz čega proizlaze razlike u odnosu na naše istraživanje. Novije formulacije stabiliziranog oblika vodikovog peroksida s dodanim sredstvima za ubranu oksidaciju i pojačavanje djelovanja (patentirane formulacije), imaju učinkovitije djelovanje na proteine iz omotača spora, te stvaranjem hidroksilnih slobodnih radikala dovode do oksidacije membranskih lipida čime je omogućeno djelovanje dezinfekcijskog sredstva unutar stanice, odnosno djelovanje na DNK i druge stanične sastavnice vegetativnih oblika bakterija.

Zbog visokog stupnja djelotvornosti na bakterije (ali i druge mikroorganizme) i njihove spore u različitim okruženjima (bolnice, industrija), danas se vodikov peroksid koristi kao plin, odnosno koristi se u uređajima za raspršivanje i nebulizaciju, sam ili u kombinaciji sa srebrom. Mehanizam inaktivacije bakterija i bakterijskih spora vodikovim peroksidom u obliku plina prilično je složen i još nije u potpunosti objašnjen, no rezultati provedenih istraživanja pokazuju da plin prodire dublje u strukturu spora i dovodi do oksidacije aminokiselina bitnih za klijanje spora (FINNEGAN i sur., 2010.).

Proizvodi tvrtke Laboratoriji Calier (Španjolska) deklarirani su za namjene čišćenja i dezinfekciju prostora, smještaja, posuđa, materijala, prijevoznih sredstava, dakle i za upotrebu u veterinarskoj medicini i srodnim područjima vezanima uz uzgoj i držanje životinja. Jedini na domaćem tržištu je deklariran kao siguran za pčele i uporabu u pčelarstvu. U ovo istraživanje uključena su dva dostupna proizvoda (Despadac i Despadac Secure) čije su aktivne komponente sastavljene od didecil-dimetil amonij klorida (kao kvarterne amonijeve soli 3. generacije; 1955.) i glutaraldehida. Kvarterne amonijeve soli u upotrebi su dugi niz godina u antisepticima za ruke, dezinficijensima, ali i kao konzervansima u obradi drva ili za pripravu očnih kapi, obzirom da imaju široki raspon mogućih kemijskih struktura koje imaju određenu učinkovitost u smanjenju broja bakterija ili inhibiciji i supresiji njihovog razmnožavanja.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su proizvodi iz linije Despadac pokazali baktericidno djelovanje tijekom izloženosti 30 minuta, a nakon čega je došlo do smanjenja broja klijajućih spora bakterije *P. larvae*, ali tek za jedan ili dva logaritma. Takav rezultat u uvjetima

dezinfekcije nije zadovoljavajuć, nego se eventualno kod primjene Despadac proizvoda može govoriti o sanitaciji. Slično našim rezultatima su i rezultati koji pokazuju da djelovanjem 0,06 % kvarterne amonijeve soli treće generacije u Carrier testu, nije utvrđen dezinfekcijski učinak na spore bakterije *Bacillus stearothermophilus* (BEST i sur., 1994.). Pretpostavka je da didecil dimetil ne djeluje na spore, jer je omotač spora sastavljen od proteina kao što su keratin i bigvanidi na koje kvarterni amonijev klorid ne djeluje (OKAYAMA i sur., 1997.).

Kvarterne amonijeve soli kao biocidi su membranski aktivne tvari koji svoje učinke ostvaruju nepovoljnim interakcijama s citoplazmatskom membranom bakterija. Ipak, njihovo inhibitorno i supresijsko djelovanje na mikroorganizame pokreće cijeli niz procesa kao što je adsorpcija na staničnu stijenku i prodiranje u nju; reakcija s citoplazmatskom membranom (lipid ili protein), a nakon čega slijedi dezorganizacija membrane, curenje unutarstaničnog materijala manje specifične težine, razgradnja proteina i nukleinskih kiselina te liza stanične stijenke uzrokovana autolitičkim enzimima (McDONELL, 2007.).

Pokazalo se da odabir formulacija i metoda primjene dezinfekcije utječe na učinkovitost kvarternih amonijevih soli, te je provedeno relativno malo istraživanja u kojima se procjenjuje njihova učinkovitost u praktičnim uvjetima. Također, danas je aktualna tematika i moguće utvrđivanje kemijskih rezidua (ekološka dinamika), te pojava rezistencije na višekratno primjenjivane dezinficijense (GERBA, 2015.). Međutim, ciljevi istraživanja nisu smisleno potvrdili moguću pojavu rezistencije na djelovanje kvarternih amonijevih soli jer nemaju potpuno usporedive podatke obzirom da kvarterne amonijeve soli danas postoje u sedam generacija te u kombinaciji s drugim tvarima (komercijalni pripravci) mogu imati promijenjeno djelovanje.

No, sukladno Uredbi (EZ) br. 396/2005 Europskog parlamenta i Vijeća (ANON, 2005.) iz aspekta maksimalnih razina ostataka za didecildimetilamonijev klorid u određenim proizvodima ili na njima, komisija zaključuje kako je didecildimetilamonijev klorid bio odobren kao aktivna tvar u sredstvima za zaštitu bilja za uporabu isključivo na ukrasnom bilju. Međutim, odobrenje za njegovu upotrebu u sredstvima za zaštitu bilja je ukinuto obzirom da njegova upotreba može dovesti do pojave ostataka u hrani za ljude i životinje. Obzirom da je primijećeno da njihovom upotrebom u sredstvima za zaštitu biljaka dolazi do pojave ostataka u hrani predložene su minimalne razine ostataka. Uzimajući navedeno u obzir, a sukladno tome da dezinfekcijski proizvodi korišteni u pčelarstvu moraju biti sigurni jer pčelinje zajednice proizvode hranu koja ne smije sadržavati rezidue kemijskog podrijetla, vjerujemo kako proizvodi Despadac nisu izbor za provedbu dezinfekcije u pčelarstvu. Također, pretragom službenog registra biocidnih pripravaka nismo utvrdili da su ova dva proizvoda registrirana u

RH kao biocidi te se postavlja pitanje regularnosti njihove distribucije, što svakako treba dodatno istražiti.

Rezultati pokazuju da najučinkovitije protiv vegetativnih oblika i spora bakterije *P. larvae* djeluju dezinfekcijska sredstva s perocetnom kiselinom kao djelatnom tvari, a koje su bile uključene u ovo istraživanje. Ovi dezinficijensi i prema deklaraciji proizvođača, a i prema testovima obavljenima u neovisnim mikrobiološkim laboratorijima pokazuju dobra baktericidna svojstva spram bakterija iz skupine štapičastih bakterija, te sporicidno djelovanje u relativno kratkim izlaganjima. Perocetna kiselina se smatra snažnim biocidom, čak i pri niskim koncentracijama (0,0001 % do 0,2 %).

Perocetna kiselina pokazuje prednost nad drugim vrstama djelatnih tvari dezinficijensa jer ona ostaje djelotvorna čak i u prisutnosti organskih ostataka, a razgrađuje se na netoksične i nemutagene tvari - octenu kiselinu i kisik. Tako osigurava visoki stupanj dezinfekcijskog učinka u kratkom kontaktnom razdoblju. Ova poželjna svojstva dezinficijensa uz stabilnost pripremljene otopine kroz duže razdoblje, iskoristili smo kako bi istražili djelovanje dva komercijalna proizvoda na vegetativne oblike bakterije *P. larvae* i njene spore. Naime, SUDHAUS i suradnici (2012.) utvrdili su da djelovanje perocetene kiseline kao dezinficijensa nije ovisno o temperaturi okoliša, iako se pri višim temperaturama rezultati očituju slabijim antimikrobnim djelovanjem. Rezultati iz istog istraživanja pokazali su da je tijekom cjelokupnog pokusnog razdoblja od 24 dana otopina Sekusept aktiva imala jednaki dezinfekcijski potencijal tijekom najmanje četiri uzastopna dana. Istraživanja su također pokazala da je učinkovitost perocetene kiseline različita ovisno da li se mikroorganizmi nalaze u suspenziji ili na površini što nije bio slučaj u našem istraživanju. KUNIGK i suradnici (2001.) utvrdili su da je kinetika razaranja bakterijskih stanica dvojaka i može biti da odgovara kontaktnom vremenu perocetene kiseline od 2 do 25 minuta kontakta, a druga 25 do 35 minuta kontakta. Slično našima je istraživanje u kojem je pokazana učinkovitost perocetene kiseline koja je konstantna u prvih 30 minuta kontakta dezinficijensa s bakterijama, ali se nakon toga povećava (ZHAO i sur., 2008.).

Sekusept Aktiv je prah koji se koristi u humanoj medicini za dezinfekciju instrumenata, no u veterinarskoj medicini još nema široku primjenu. Za razliku od ovog proizvoda, a iste aktivne komponente, Ecocid S, koji proizvodi slovenska tvrtka Krka, na tržištu je prisutan dugi niz godina i kao takav je relativno često primjenjivan kao dezinfekcijsko sredstvo u veterinarskoj medicini. Istraživanja pokazuju da baktericidne koncentracije dezinficijensa Ecocid S uzrokuju razaranja stanične stijenke i citoplazmatske membrane mikobakterija kao sinonima za mikroorganizam s vrlo visokom otpornošću na dezinficijense i vanjske čimbenike.

Rezultati su također pokazali da Ecocid S uzrokuje propadanje granularnih komponenata citoplazme uz nastanak finih zrnastih inkluzija i vakuola. Navedene ireverzibilne promjene u strukturnim elementima mikobakterija dovele su do propadanja bakterijskih stanica (PALIY, 2018.).

Rezultati istraživanja KIRIAMBURI i suradnika (2021.) imala je za cilj ispitati i usporediti biocidni učinak dva dezinfekcijska proizvoda: “Disinfection for beekeeping” (DFB) (Swienty, Danska) i Virkon S (Lanxess, Njemačka) na spore bakterije *P. larvae*. Ranija istraživanja pokazala su da 1% - tna otopina Virkona ima baktericidno djelovanje na bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* i *Mycobacterium smegmatis* u suspenzijskom testu te takozvanom Carrier testu na *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* i *E. hirae*. Međutim, ta ista koncentracija sredstva Virkon nije pokazala inhibicijski učinak na spore i gljive, odnosno istraživanje je pokazalo da koncentracija i potrebno vrijeme nisu u skladu sa smjernicama za sporocidno i fungicidno djelovanje (HERNÁNDEZ i sur., 2000.). U svom radu HERNÁNDEZ i suradnici (2000.), ali i drugi, zaključuju kako je 1% Virkon učinkovit samo protiv vegetativnih bakterija, kvasaca i virusa, te ga stoga treba smatrati dezinficijensom niske razine. Poboljšana formulacija Virkon S je u istraživanjima pokazala da usmrćuje do 80% spora bakterije *P. larvae* (HANSEN i BRØDSGAARD, 1999.). Međutim, u istraživanju KIRIAMBURI i suradnika (2021.) biocidni učinak kretao se od 88,6 do 96,8 % nakon 30 minuta trajanja tretmana.

U našem ispitivanju Bee protect proizvodi pokazali su u testu agar difuzije baktericidni učinak na vegetativne oblike bakterije *P. larvae*. U suspenzijskom testu na vijabilne bakterije *P. larvae* utvrđen je baktericidni učinak nakon primjene Bee protect H forte, dok u testu djelovanja na površinama Bee protect proizvodi nisu pokazali baktericidni učinak na *P. larvae*. Također, suspenzijskim testom nije utvrđen zadovoljavajući ukupni sporocidni učinak Bee protect proizvoda. Naime, Bee protect proizvodi prouzročili su određeni učinak koji se povećavao s vremenom izlaganja bakterija dezinficijensu. Međutim, taj učinak nije zadovoljio zadane norme te se Bee protect proizvodi ne mogu preporučiti za uporabu u završnoj dezinfekciji opreme, pribora i pčelinjaka nakon sanacije klinički vidljive AGMP. Moguće ih je preporučiti kao pomoć u dezinfekciji, unatoč spoznaji da su navedeni proizvodi deklarirani kao dodaci prehrani za pčele, te da proizvođač navodi da se proizvodi mogu koristiti u suzbijanju AGMP.

Potrebno je naglasiti kako u dezinfekcijskom smislu smanjenje broja spora bakterije *P. larvae* za dva logaritma (99 %) ne predstavlja dovoljan stupanj dezinfekcije obzirom se radi o velikom broju spora, te se smanjenjem njihovog broja možda postiže smanjenje obima

inficiranosti i/ili brzine razvoja bolesti unutar jedne pčelinje zajednice, no svakako ne dovodi do značajnog smanjenja pojavnosti bolesti.

Efektivni mikroorganizmi, proizvod koji je razvio profesor Higa, sadrži desetke sojeva mikroorganizama (bakterija, gljiva i plijesni) koji se smatraju korisnima za fiziološko funkcioniranje organizma, ali i postizanje ravnoteže u okolišu i prirodi. Efektivni mikroorganizmi se koriste u poljoprivredi, šumarstvu, stočarstvu, akvakulturi, pčelarstvu, zaštiti okoliša te medicini (ZAKARIA i sur., 2010.; NAMSIVAYAM i sur., 2011.; YUN-HEE i sur., 2011.; TLAK GAJGER i sur., 2020.). Korist mikroorganizama u pročišćavanju voda je dokumentirana dugi niz godina (ZAKARIA i sur., 2010.) kao i u smanjenju neugodnih mirisa na farmama (LEE i sur., 2000.). Pokazano je također da ova formulacija mikroorganizama primijenjena u kulturi stanica tumora dovodi do apoptoze stanica (CHUI i sur., 2006.).

U ovom istraživanju, učinak efektivnih mikroorganizama istraživan je primjenom dodatka prehrani za pčele EM® PROBIOTIK ZA PČELE na smanjenje broja bakterije *P. larvae*. Postignuti inhibitorni učinak je bio minimalan i stoga se ovaj proizvod ne može smatrati klasičnim dezinficijensom ili biocidom u pravom smislu riječi. No, djelovanje efektivnih mikroorganizama u živom organizmu je višestruko. Navedeni proizvod djeluje na očuvanje normalne mikroflore u gastrointestinalnom sustavu sisavaca i kukaca temeljem ekskluzije patogenih mikroorganizama i kompetitivnog antagonističkog djelovanja (KIZERWETTER-ŚWIDA i BINEK, 2016.), mijenjanjem metaboličkih putova pojačavanjem djelovanja probavnih enzima uz smanjenje aktivnosti bakterijskih enzima i stvaranja amonijaka (YOON i sur., 2004.), te pozitivnim učincima na imunološki sustav pčela (TLAK GAJGER i sur., 2020.).

## 7. ZAKLJUČCI

1. Iz dobivenih rezultata genotipizacije terenskih izolata bakterije *P. larvae* porijeklom s područja RH može se zaključiti da je genotip ERIC I utvrđen u 90,3 %, a genotip ERIC II u 7,3 % uspješno analiziranih izolata. Kod jednog terenskog izolata bakterije *P. larvae* postavljena je sumnja na pripadnost genotipu ERIC IV (2,4 %), no potrebna je dodatna verifikacija takvog nalaza.
2. Zadovoljavajući sporocidni učinak pokazali su proizvodi Incidin OxyFoam S i Sekusept aktiv u koncentraciji od 2 % na sva četiri genotipa bakterije *P. larvae* (ERIC I do ERIC IV).
3. Proizvodi iz linije Despadac (Despadac i Despadac Secure) pokazali su baktericidno djelovanje, ali njihov sporocidni učinak nije zadovoljavajući kao ni kod Genox-a, dok proizvod Genoll s pjenom nije uopće pokazao sporocidno djelovanje.
4. Ecocid S u koncentraciji od 1%, kao i Bee protect proizvodi (Bee protect H forte i Bee protect F) nisu pokazali zadovoljavajući sporocidni učinak na bakteriju *P. larvae*.
5. Dodatak hrani za pčele EM® PROBIOTIK ZA PČELE nije pokazao značajan baktericidni učinak.
6. Potrebna je izrada novog modela aktivnog i pasivnog monitoringa pčelinjih zajednica na prisutnost AGMP na području RH, kao i novog modela provedbe završne dezinfekcije nakon sanacije AGMP kao izuzetno bitnog dijela mjera za suzbijanje bolesti.



## 8. LITERATURA

AGUILAR, C., C. EICHWALD, L. EBERL (2015): Multicellularity in Bacteria: From division of labor to biofilm formation. U: Evolutionary transitions to multicellular life (Ruiz-Trillo, I., A. Nedelcu, ur.). Adv. Mar. Biol. 2, 79-95.

ALGBURI, A., N. COMITO, D. KASHTANOV, L. M. T. DICKS, M. L. CHIKINDAS (2017): Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. Appl. Environ. Microbiol. 83.

ALIPPI, A. M. (1992): Characterization of *Bacillus larvae white*, the causative agent of american foulbrood of honey-bees. First record of its occurrence in Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 24, 67-72.

ALIPPI, A. M. (1995): Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using semi – selective medium. Microbiol. SEM 11, 343-350.

ALIPPI, A. M. (1999): Bacterial diseases. U: Bee disease diagnosis (Colin, M. E., B. V. Ball, M. Kiliani, ur.). Méditerranéennes B: Etudes et Recherches. No. 25. Zaragoza, 31-55.

ALIPPI, A. M. (2014): Bacterial diseases of honey bees. U : World Organization for Animal Health (Ritter, W. ur.). Paris, 117-124.

ALIPPI, A. M., A. C. LÓPEZ, F. J. REYNALDI, D. H. GRASSO, O. M. AGUILAR (2007): Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. Vet. Microbiol. 125, 290-303.

ALIPPI, A. M., A. C. LOPEZ, O. M. AGUILAR (2004): A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honey bees, at the subspecies level. Lett. Appl. Microbiol. 39, 25-33.

ALIPPI, A. M., G. N. ALBO, J. MARCANGELLI, D. LENIZ, A. NORIEGA (1995): The mite *Varroa jacobsoni* does not transmit american foulbrood from infected to healthy colonies. Exp. Appl. Acarol. 19, 10, 607-613.

ALONSO - SALCES, R. M., N. M. CUGNATA, E. GUASPARI, M. C. PELLEGRINI, I. AUBONE, F. G. DE PIANO, K. ANTUNEZ, S. R. FUSELLI (2017): Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. *Apidologie*, 48, 387-400.

ALVARADO, I., A. PHUI, M. M. ELEKONICH, E. ABEL - SANTOS (2013): Requirements for *in vitro* germination of *Paenibacillus larvae* spores. *J. Bacteriol.* 195, 1005-1011.

ALVARADO, I., J. W. MARGOTTA, M. M. AOKI, F. FLORES, F. AGUDELO, G. MICHEL, M. M. ELEKONICH, E. ABEL-SANTOS (2017): Inhibitory effect of indole analogs against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease. *J. Insect Sci.* 17, 104, 1-8.

ANONYMOUS (2004): Pravilnik o mjerama suzbijanja i iskorjenjivanja pčelinjih bolesti. Narodne novine br. 114/2004.

ANONYMOUS (2005): Uredba (EZ) 396/2005 Europskog parlamenta i Vijeća o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla i o izmjeni Direktive Vijeća 91/414/EEZ. Službeni list Europske unije od 23. veljače 2005. L 70/1, 129-144.

ANONYMOUS (2016): Uredba (EU) 2016/429 Europskog parlamenta i Vijeća o prenosivim bolestima životinja te o izmjeni i stavljanju izvan snage određenih akata u području zdravlja životinja. Službeni list Europske unije od 31.03.2016. L 84/1 - L 84/208.

ANONYMOUS (2019): OIE Terrestrial Animal Health Code. 28<sup>th</sup> edition. Apidae. Section 9. Chapter 9.2.

ANONYMOUS (2021): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2021. godini. Narodne novine br. 02/2021.

- ANTÚNEZ, K., C. PICCINI, S. CASTRO-SOWINSKI, A. S. ROSADO, L. SELDIN, P. ZUNINO (2007): Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Vet. Microbiol.* 124, 178-183.
- ANTÚNEZ, K., B. D’ALESSANDRO, C. PICCINI, E. CORBELLA, P. ZUNINO (2004): *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J. Invertebr. Pathol.* 86, 56-58.
- APHA (2014): Hive cleaning and sterilisation. Animal and Plant Health Agency, National Bee Unit. National Agri – Food Innovation Campus, York.
- ASHIRALIEVA, A., E. GENERSCH (2006): Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - a review. *Apidologie* 37, 411-420.
- BAILEY, L. (1983): *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honeybees (*Apis* spp.). *J. Appl. Bacteriol.* 55, 65-69.
- BAILEY, L., B. V. BALL (1991): Honey bee pathology. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press Limited. London. UK. 1993.
- BAKONYI, T., D. IRMGARD, E. GRABENSTEINER, N. NOWOTNY (2003): Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3, 1504-1510.
- BARGAŃSKA, Ź., M. ŚLEBIODA, J. NAMIEŚNIK (2011): Determination of antibiotic residues in honey. *TrAC.* 30, 1035-1041.
- BARTEL, L. C., E. ABRAHAMOVICH, C. MORI, A. C. LÓPEZ, A. M. ALIPPI (2019): *Bacillus* and *Brevibacillus* strains as potential antagonists of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, *J. Apicul. Res.* 58, 1, 117-132.

BASSI, S., G. FORMATO, M. MILITO, K. TREVISIOL, C. SALOGNI, E. CARRA (2014): Phenotypic characterization and ERIC-PCR based genotyping of *Paenibacillus larvae* isolates recovered from American foulbrood outbreaks in honey bees from Italy. *Vet. Q.* 35, 1, 27-32.

BEDNÁŘ, M., J. DOLÁNEK, M. HAKLOVÁ, T. JAŠA, F. KAMLER, D. TITĚRA, V. VESELÝ (2009): Hygiene in the apaiary. Bee Research Insitute, Dol.

BEIMS H., B. BUNK, S. ERLER, K. I. MOHR, C. SPRÖER, S. PRADELLA, G. GÜNTHER, M. ROHDE, W. 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. *Int. J. Med. Microbiol.* 310, 2, 151394.

BEIMS, H., J. WITTMANN, B. BUNK, C. SPRÖER, C. ROHDE, G. GÜNTHER, M. ROHDE, W. VON DER OHE, M. STEINERTA (2015): *Paenibacillus larvae* - Directed bacteriophage HB10c2 and its application in american foulbrood-affected honey bee larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5411-5419.

BEST, M., V. S. SPRINGTHORPE, S. A. SATTAR (1994): Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: studies with a mixture of five types of microorganisms. *Am. J. Infect. Control.* 22, 3, 152-162.

BIOVÁ, J., J. BZDIL, S. DOSTÁLKOVÁ, M. PETŘIVALSKÝ, J. BRUS, E. CARRA, J. DANIHLÍK (2021): American Foulbrood in the Czech Republic: ERIC II genotype of *Paenibacillus larvae* is prevalent. *Front. Vet. Sci.*

BLOCK, S. S. (2001): Disinfection, sterilization and preservation. 5<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA 19106, USA.

BORBA, R. S., M. SPIVAK (2017): Propolis envelope in *Apis mellifera* colonies supports honey bees against the pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Sci. Rep.* 7, 11429.

BRØDSGAARD, C. J., W. RITTER, H. HANSEN (1998): Response of *in vitro* reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. *Apidologie* 29, 569-578.

BUDGE, G. E., B. BARRET, B. JONES, S. PIETRAVALLE, G. MARRIS, P. CHANTAWANNAKUL, R. THWAITES, J. HALL, A. G. S. CUTHBERTSON, M. A. BROWN (2010): The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 164-170.

BZDIL, J. (2007): Detection of *Paenibacillus larvae* spores in the debris and wax of honey bee by the Tween 80 Method. *Acta. Vet. Brno* 76, 643-648.

BYERS, C. G. (2020): Biosecurity measures in clinical practice. *Vet. Clin. Small Anim.* 50, 1277-1287.

CANNING, E.U. (1982): An evaluation of protozoal characteristics in relation to biological control of pests, *Parasitology* 84, 119-149.

CHANTAWANNAKUL, P., B. N. DANCER (2001): American foulbrood in honey bees. *Bee World* 82, 168-180.

CHAPMAN, J.S. (2003): Biocide resistance mechanisms. *Int. Biodet. Biodeg.* 51, 133-138.

CHAUZAT, M.-P., L. CAUQUIL, L. ROY, S. FRANCO, P. HENDRIKX, M. RIBIERE – CHABERT (2013): Demographics of the European apicultural industry. *Plos. One.* 8, 1: e 79018.

CHESHIRE, F. R., W. W. CHEYNE (1885): The pathogenic history and history under cultivation of a new *Bacillus* (*B.alvei*) the cause of disease of bee hives known as foulbrood. *J. R. Microsc. Soc.* V, 581-581.

CHRISTIEA, G., P. SETLOW (2020): *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cell. Signal.* 74, 109729.

CHUI, C. H., D. K. P. HAU, F. Y. LAU, G. Y. M. CHENG, R. S. M. WONG, R. GAMBARI, S. H. L. KOK, K. B. LAI, I. T. N. TEO, T. W. T. LEUNG, T. HIGA, B. KE, J. C. O. TANG,

D. W. F. FONG, A. S. C. CHAN (2006): Apoptotic potential of the concentrated effective microorganism fermentation extract on human cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 17, 279-284.

CORTEZZO, D. E., P. SETLOW (2005): Analysis of factors influencing the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 98, 606-617.

COWAN, A. E., D. E. KOPPEL, B. SETLOW, P. SETLOW (2003): A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: implications for spore dormancy. *PNAS.* 100, 4209-4214.

CRAILSHEIM, K., U. RIESSBERGER-GALLÉ (2001): Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie* 32, 91-103.

CVETNIĆ, S. (1993): *Opća epizootiologija. Školska knjiga.* Zagreb.

D'ALESSANDRO, B., K. ANTÚNEZ, C. PICCINI, P. ZUNINO (2007): DNA extraction and PCR detection of *Paenibacillus larvae* spores from naturally contaminated honey and bees using spore-decoating and freeze-thawing techniques. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 593-597.

DE GRAAF, D. C., A. M. ALIPPI, M. BROWN, J. D. EVANS, M. FELDLAUFER, A. GREGORC, M. HORNITZKY, S. F. PERNAL, D. M. T. SCHUCH, D. TITERA, V. TOMKIES, W. RITTER (2006a): Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 583-590.

DE GRAAF, D. C., P. DE VOS, M. HEYNDRICKX, S. VAN TRAPPEN, N. PEIREN, F. J. JACOBS (2006b): Identification of *Paenibacillus larvae* to the subspecies level: An obstacle for AFB diagnosis. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 2, 115-123.

DE GRAAF, D. C., D. VANDEKERCHOVE, W. DOBBELAERE, J. E. PEETERS, F. J. JACOBS (2001): Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie* 32, 587-599.

DE RYCKE, P. H., J. J. JOUBERT, S. H. HOSSEINIAN, F. J. JACOBS (2002): The possible role of *Varroa destructor* in the spreading of American foulbrood among apiaries. *Exp. Appl. Acarol.* 27, 313-318.

DECANINI, L. I., A. M. COLLINS, J. D. EVANS (2007): Variation and heritability in immune gene expression by diseased honeybees. *J. Hered.* 98, 3, 195-201.

DEL HOYO, M. L., M. BASUALDO, A. LORENZO, M. A. PALACIO, E. M. RODRIGUEZ J. TORRES, E. BEDASCARRASBURE (2001): Effect of shaking honey bee colonies affected by american foulbrood on *Paenibacillus larvae* spore loads. *J. Apicul. Res.* 40, 2, 65-69.

DEL HOYO, M. L., M. BASUALDO, J. TORRES, E. BEDASCARRASBURE (1998): Use of DHT – equipment for disinfection of AFB –contaminated beehive materials in Argentina. *Am. Bee J.* 138, 738-740.

DENYER, S. P. (1995): Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 36, 227-245.

DESCAMPS, T., L. DE SMET, P. STRAGIER, P. DE VOS, D. C. DE GRAAF (2016): Multiple locus variable number of tandem repeat analysis: A molecular genotyping tool for *Paenibacillus larvae*. *Microb Biotechnol.* 9, 6, 772-781.

DEWAELE, S., H. VAN MEIRHAEGHE, G. RASSCHAERT, M. VANROBAEYS, E. DE GRAEF, L. HERMAN, R. DUCATELLE, M. HEYNDRICKX, K. DE REU (2012): Persistent *Salmonella enteritidis* environmental contamination on layer farms in the context of an implemented national control programme with obligatory vaccination. *Poult. Sci.* 91, 282-291.

DIECKMANN, U. (2002): Adaptive dynamics of pathogen–host interactions. U: Adaptive dynamics of infectious disease in pursuit of virulence management ( Dieckmann, U., J. A. J. Metz, M. W. Sabelis, K. Sigmund, ur.). Cambridge University Press, Cambridge.

DIETEMANN, V., C. W. W. PIRK, R. CREWE (2009): Is there a need for conservation of honeybees in Africa. *Apidologie* 40, 285-295.

DINGMAN, D. W. (2011): Inactivation of *Paenibacillus larvae* endospores by a hydrogen peroxide / peroxyacetic acid biocide. *J. Apicul. Res.* 50, 173-175.

DJUKIC, M., E. BRZUSZKIEWICZ, A. FÜNFHAUS, J. VOSS, K. GOLLNOW, L. POPPINGA, H. LIESEGANG, E. GARCIA-GONZALEZ, E. GENERSCH, R. DANIEL (2014): How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE* 9(3): e90914.

DOBBELAERE, W., D. C. GRAAF, J. E. PEETERS, F. J. JACOBS (2001a): Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* 32, 363-370.

DOBBELAERE, W., D. C. GRAAF, E. REYBROECK, E. DESMEDT, J. E. PETERS, F. J. JACOBS (2001b): Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores. *J. Appl. Microbiol.* 91, 2, 211-216.

DRIKS, A. (1999): The *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 1-20.

DVORAK, G. (2005): Disinfection 101. Center for Food Security and Public Health, 2160 Veterinary Medicine Ames, Iowa State University, USA.

DZIERZON, J. (1882): Rational bee – keeping. Houlston and sons. London.

EBELING, J., A. FUNFHAUS, E. GENERSCH (2021): The buzz about ADP-ribosylation toxins from *Paenibacillus larvae*, the causative agent of american foulbrood in honey bees. *Toxins* 13, 151.

EBELING, J., H. KNISPEL, A. FÜNFHAUS, E. GENERSCH (2019): The biological role of the enigmatic C3larvinAB toxin of the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Environ. Microbiol.* 21, 3091-3106.

EBELING, J., H. KNISPEL, G. HERTLEIN, A. FÜNFHAUS, E. GENERSCH (2016): Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 7387-7395.



ERRINGTON, J. (2003): Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 117-126.

EVANS, J. D. (2003): Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 46-50.

EVANS, J. D., J. S. PETTIS (2005): Colony - level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. *Evolution* 59, 2270-2274.

FDA (2021): Presentation on Medically Important Antimicrobials in Animal Agriculture – Honey Bees. U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, USA.

FINNEGAN, M., E. LINLEY, S. P. DENYER, G. MCDONNELL, C. SIMONS, J. Y. MAILLARD (2010): Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2108-2115.

FLEMMING, H. C., J. WINGENDER (2010): The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623-633.

FLESAR, J., J. HAVLIK, P. KLOUCEK, V. RADA, D. TITERA, M. BEDNAR, M. STROPNICKY, L. KOKOSKA (2010): *In vitro* growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Vet. Microbiol.* 145, 129-133.

FORSGREN, E., A. T. LAUGEN (2014): Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie* 45, 10-20.

FORSGREN, E., J. STEVANOVIĆ, I. FRIES (2008): Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. *Vet. Microbiol.* 129, 342-349.

FRIES, I., A. LINDSTRÖM, S. KORPELA (2006): Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Vet. Microbiol.* 114, 269-274.

FRIES, I., S. CAMAZINE (2001): Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, 32, 199-214.

FRIES, I., S. RAINA (2003): American foulbrood and African honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 96, 1641-1646.

FUKUZAKI, S. (2006): Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci.* 11, 4, 147-157.

FÜNFHAUS, A., E. GENERSCH (2012): Proteome analysis of *Paenibacillus larvae* reveals the existence of a putative S-layer protein. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 194-202.

FÜNFHAUS, A., J. GÖBEL, J. EBELING, H. KNISPEL, E. GARCIA-GONZALEZ, E. GENERSCH (2018): Swarming motility and biofilm formation of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*). *Sci. Rep.* 8, 8840.

FÜNFHAUS, A., L. POPPINGA, E. GENERSCH (2013): Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood; two novel *Paenibacillus larvae* toxins. *Environ. Microbiol.* 15, 2951-2965.

GARCIA - GONZALEZ, E., E. GENERSCH (2013): Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus larvae*, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. *Environ. Microbiol.* 15, 2894-2901.

GARCIA-GONZALEZ, E., S.MÜLLER, P. ENSLE, R. D. SÜSSMUTH, E. GENERSCH (2014): Elucidation of sevadicin, a novel nonribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Environ. Microbiol.* 16, 1297-1309.

GENERSCH, E. (2008): *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood – long since known and still surprising. *J. Verbr. Lebensm.* 3, 429-434.

GENERSCH, E. (2010): Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 87-97.

GENERSCH, E., A. ASHIRAILEVA, I. FRIES (2005): Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood in honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 11, 7551-7555.

GENERSCH, E., C. OTTEN (2003): The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep - PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie* 34, 195-206.

GENERSCH, E., E. FORSGREN, J. PENTIKÄINEN, A. ASHIRAILEVA, S. RAUCH, J. KILWINSKI, I. FRIES (2006): Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulfifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 501-511.

GENERSCH, E., J. D. EVANS, I. FRIES (2010): Honey bee disease overview. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S2-S4.

GERBA, C. P. (2015): Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2, 464-469.

GERHARDT, P., S. H. BLACK (1961): Permeability of bacterial spores. II. Molecular variables affecting solute permeation. *J. Bacteriol.* 82, 750-760.

GILLARD, M., J. D. CHARRIERE, L. BELLOY (2008): Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 92-95.

GOCHNAUER, T. A., J. CORNER (1974): Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial sample of bee-collected pollen. *J. Apic. Res.* 13, 265-267.

GOCHNAUER, T. A., J. CORNER (1987): Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. *J. Apic. Res.* 13, 264-267.

GODA, H., H. YAMAOKA, H. NAKAYAMA-IMAOHJI, H. KAWATA, I. HORIUCHI, Y. FUJITA, T. NAGAO, A. TADA, A. TERADA, T. KUWAHARA (2017): Microbicidal effects of weakly acidified chlorous acid water against feline calicivirus and *Clostridium difficile* spores under protein-rich conditions. PLoS One. 12, 5:e0176718.

GONZÁLEZ, M. J., J. M. MARIOLI (2010): Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. J. Invertebr. Pathol. 104, 209-213.

GOODWIN R. M., J. H. PERRY, A. TEN-HOUTEN (1994): The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections, J. Apic. Res. 33, 209-212.

GOODWIN R. M., J. H. PERRY, P. BROWN (1993): American foulbrood disease part III: spread, N. Z. Beekeep. 219, 7-10.

GORDON, G., R. G. KIEFFER, D. H. ROSENBLATT (1972): The chemistry of chlorine dioxide. U: Progress in inorganic chemistry (Lippard, S. J., ur.). John Wiley & Sons, New York, 201-286.

GORDON, R. E., W. C. HAYNES, C. H. PANG (1973): The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook. US Department of Agriculture 427, 283.

GOULD, G. W., A. J. H. SALE (1970): Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. J. gen. Microbiol. 60, 335-346.

GRIFFITH, C. (2016): Surface sampling and the detection of contamination. Handbook of hygiene control in the food industry, 673-696.

HAKLOVA, M., J. BACOVA, D. TITERA (2003): Effect of magnesium monoperoxyphthalate against *Paenibacillus larvae larvae* spores. Apiacta 38, 146-148.

HAMMEL, Y - A., R. MOHAMED, E. GREMAUD, M – H. LEBRETON, P. A. GUY (2008): Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1177, 58-76.

HANSEN H., B. RASMUSSEN (1986): The investigation of honey from bee colonies for *Bacillus larvae*. Tidss. Planteavl. 90, 81-86.

HANSEN H., B. RASMUSSEN, F. CHRISTENSEN (1988): A preliminary experiment involving induced infection from *Bacillus larvae*. Dan. J. Plant Soil Sci. 92, 11-15.

HANSEN, H., C. J. BRØDSGAARD (1999): American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. Bee World 80, 5-23.

HANSEN, H., C. J. BRØDSGAARD (2001): World-wide distribution, early detection and control of american foulbrood. Proc. 37th Int. Apic. Congr., 28 Oct – 1 Nov 2001, Durban, South Africa.

HANSEN, H., C. J. BRØDSGAARD, P.KRYGER, M. NICOLAISEN (2003): A scientific note on the presence of *Paenibacillus larvae larvae* spores in sub-Saharan African honey. Apidologie 34, 471-472.

HASEMAN, L. (1961): How long can spores of American Foulbrood live. Am. Bee J. 101, 298-299.

HEGEDUS, D., M. ERLANDSON, C. GILLOTT, U. TOPRAK (2009): New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. Annu. Rev. Entomol. 54, 285-302.

HENRIQUES, A. O., C. P. MORAN, Jr. (2007): Structure, assembly, and function of the spore surface layers. Annu. Rev. Microbiol. 61, 555-588.

HERNÁNDEZ, A., E. MARTRÓ, L. MATAS, M. MARTÍN, V. AUSINA (2000): Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. J. Hosp. Infect. 46, 3, 203-209.

HERTLEIN, G., S. MÜLLER, E. GARCIA-GONZALEZ, L. POPPINGA, R. SÜSSMUTH, E. GENERSCH (2014): Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. PLoS One 9:e108272

HEYNDRICKX, M., K. VANDEMEULEBROECKE, B. HOSTE, P. JANSSEN, K. KERSTERS, P. DE VOS, N. A. LOGAN, N. ALI, R. C. BERKELEY (1996): Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 270-279.

HILGREN, J., M. J. SWANSON, F. DIEZ-GONZALEZ, B. CORDS (2007): Inactivation of *Bacillus anthracis* spores by liquid biocides in the presence of food residue. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6370-6377.

HOLST, E. C. (1945): An antibiotic from a bee pathogen. Science 102, 593-595.

HORNITZKY, M. A. Z. (1998): The spread of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* infection in apiary. J. Apicul. Res. 37, 261-265.

HORNITZKY, M. A. Z., P. A. WILLS (1983): Gamma radiation inactivation of *Bacillus larvae* to control american foulbrood. J. Apicul. Res. 22, 196-199.

HORNITZKY, M. A. Z., S. CLARK (1991): Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. J. Apicul. Res. 30, 13-16.

HORNITZKY, M. A. Z., S. C. WILSON (1989): A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees. J. Apicul. Res. 28, 118-120.

HULAJ, B., I. GOGA, A. CANA, X. MEROVCI, F. ROSSI, S. CRUDELE, L. RICCHIUTI, F. MUTINELLI (2021): Passive surveillance of American foulbrood in the Republic of Kosovo: geographic distribution and genotype characterization. J. Apic. Res.

HUMAN, H., C.W.W. PIRK, R.M. CREWE, V. DIETEMANN (2011): The honeybee disease American foulbrood – An African perspective. Afr. Entomol. 19, 551-557.

IORIZZO, M., B. TESTA, S. J. LOMBARDI, S. GANASSI, M. IANIRO, F. LETIZIA, M. SUCCI, P. TREMONTE, F. VERGALITO, A. COZZOLINO, E. SORRENTINO, R. COPPOLA, S. PETRARCA, M. MANCINI, A. DE CRISTOFARO (2020): Antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae* and functional properties of *Lactiplantibacillus plantarum* strains: potential benefits for honeybee health. *Antibiotics*, 9, 442.

JEDRZEJAS M. J., P. SETLOW (2001): Comparison of the binuclear metalloenzymes diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and alkaline phosphatase: their mechanism of catalysis by a phosphoserine intermediate. *Chem. Rev.* 101, 607-618.

JUVEN, B. J., M. D. PIERSON (1996): Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J. Food Prot.* 59, 11, 1233-1241.

KANE, T. R., C. M. FAUX (2021): Honey bee medicine for the veterinary practitioner. Wiley Blackwell, Hoboken, NJ.

KAIEDA, S., B. SETLOW, P. SETLOW, B. HALLE (2013): Mobility of core water in *Bacillus subtilis* spores by 2H NMR. *Biophys. J.* 105, 2016-2123.

KILWINSKI, J., M. PETERS, A. ASHIRALIEVA, E. GENERSCH (2004): Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM 3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study. *Vet. Microbiol.* 104, 1/2, 31-42.

KIRIAMBURI, J., J. MUTURI, J. MUGWERU, E. FORSGREN, A. NILSSON (2021): Short communication: Efficacy of two commercial disinfectants on *Paenibacillus larvae* spores. bioRxiv.

KIZERWETTER-ŚWIDA, M., M. BINEK (2016): Assessment of potentially probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from chickens. *Pol. J. Vet. Sci.* 19, 1, 15-20.

KLOBUTCHER, L. A., K. RAGKOUSI, P. SETLOW (2006): The *Bacillus subtilis* spore coat provides “eat resistance” during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *PNAS.* 103, 165-170.

KRAGH, K. N., J. B. HUTCHISON, G. MELAUGH, C. RODESNEY, A. E. L. ROBERTS, Y. IRIE, P. Ø. JENSEN, S. P. DIGGLE, R. J. ALLEN, V. GORDON, T. BJARNSHOLT (2016): Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *mBio*. 7.

KRONGDANG, S., J. D. EVANS, Y. CHEN, W. MOOKHPLOY, P. CHANTAWANNAKUL (2019): Comparative susceptibility and immune responses of Asian and European honey bees to the American foulbrood pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Insect Sci.* 26, 831-842.

KUNIGK, L., M. C. B. ALMEIDA (2001): Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. *Braz. J. Microbiol.* 32, 1, 38-41.

KUYAKANOND T., L. B. QUESNEL (1992): The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiol. Lett.* 100, 211-216.

LAUE, M., H-M. HAN, C. DITTMANN, P. SETLOW (2018): Intracellular membranes of bacterial endospores are reservoirs for spore core membrane expansion during spore germination. *Sci. Rep.* 8, 11388.

LEE, J. H., J. O. JOENG, S. H. PARK (2000): A Study on the composting process of food waste by seeding the isolated effective microorganism. *J. Env. Hith. Soc.* 26, 1-10.

LEWIS, S., A. K. MCINDOE (2004): Cleaning, disinfection and sterilization of equipment. *Anaesth. Intensive Care Med.* 5, 360-363.

LINDSTRÖM, A. (2006): Distribution and transmission of american foulbrood in honey bees. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, 1652-6880, 2006:22.

LINDSTRÖM, A. (2008): Distribution of *Paenibacillus larvae* spores among adult honey bees (*Apis mellifera*) and the relationship with clinical symptoms of american foulbrood. *Microb. Ecol.* 56, 253-259.



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. Apicul. Res. 44, 82-86.

LINDSTRÖM, A., S. KORPELA, I. FRIES (2008a): Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. Apidologie 39, 515-522.

LINDSTRÖM, A., S. KORPELA, I. FRIES (2008b): The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. J. Invertebr. Pathol. 99, 82-86.

LIPSITCH, M., S. SILLER, M. A. NOWAK (1996): The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. Evolution 50, 1729-1741.

LOCKE, B., M. LOW, E. FORSGREN (2019): An integrated management strategy to prevent outbreaks and eliminate infection pressure of American foulbrood disease in a commercial beekeeping operation. Prev. Vet. Med. 167, 48-52.

LOISAN, P., N. A. HOSNY, P. GERVAIS, D. CHAMPION, M. K. KUIMOVA, J. M. PERRIER-CORNET (2013): Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: a molecular rotor/FLIM study. Biochim. Biophys. Acta 1828, 2436-2443.

LOLIN, M. (1985): Bolesti pčela. Naučna knjiga. Beograd.

LONCARIC, I., I. DERAHSHIFAR, J. T. OBERLERCHNER, H. KÖGLBERGER, R. MOOSBECKHOFER (2009): Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria. J. Invertebr. Pathol. 100, 44-46.

LOPEZ, M. L., J. S. PETTIS, I. B. SMITH, P – S. CHU (2008): Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 56, 1553-1559.

LUYCKX, K., S. VAN WEYENBERG, J. DEWULF, L. HERMAN, J. ZOONS, E. VERVAET, M. HEYNDRIKX, K. DE REU (2015): On-farm comparisons of different cleaning protocols in broiler houses. *Poult. Sci.* 94, 740-749.

MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO, K. S. BENDER, D. H. BUCKLEY, D. A. STAHL (2015): *Brock Biology of Microorganisms*. 14th edition. Prentice Hall, New Jersey, USA. International Edition.

MAERTENS, H., K. DE REU, S. VAN WEYENBERG, E. VAN COILLIE, E. MEYER, F. VAN IMMERSEEL, V. VANDERBROUCKE, M. VANROBAEYS, J. DEWULF (2017): Evaluation of the hygienogram scores and related data obtained after cleaning and disinfection of poultry houses in Flanders during the period 2007 to 2014. *Poult. Sci.* 97, 620-627.

MAHDI, O. S., K. J. GREENLEE, E. ROSE, J. P. RINEHART, D. J. SMITH (2022): The sporicidal activity of chlorine dioxide gas on *Paenibacillus larvae* spores. *J. Apicul. Res.* 61, 1, 52-62.

MALLOZZI, M., V. K. VISWANATHAN, G. VEDANTAM (2010): Spore-forming Bacilli and Clostridia in human disease. *Future Microbiol.* 5, 1109-1123.

MASON, J. M., P. SETLOW (1986): Essential role of small, acid-soluble spore proteins in resistance of *Bacillus subtilis* spores to UV light. *J. Bacteriol.* 167, 174-178.

MATHESON, A. (1993): World Bee Health Report. *Bee World* 74, 176-212.

McDONELL, G. E. (2007): *Antisepsis, disinfection, and sterilization*. ASM Press, Washington, DC.

McDONNELL, G. (2008): *Biocides: modes of action and mechanisms of resistance*. U: *Disinfection and decontamination: Principles, applications and related issues* ( Manivannan, G. ur.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 87-124.

McDONNELL, G., A. D. RUSSELL (1999): Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 147-179.

McKENNEY, P. T., A. DRIKS, P. EICHENBERGER (2013): The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 33-44.

MIYAGI T., C. Y. S. PENG, R. Y. CHUANG, E. C. MUSSEN, M. S. SPIVAK, R. H. DOI (2000): Verification of oxytetracycline - resistant american foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 95-96.

MOUSTAFA GEHAN, Z., W. ANWER, H. M. AMER, I. M. EL-SABAGH, A. REZK, E. M. BADAWEY (2009): In vitro efficacy comparisons of disinfectants used in the commercial poultry farms. *Int. J. Poult. Sci.* 8, 237-241.

MÜLLER, S., E. GARCIA-GONZALEZ, A. MAINZ, G. HERTLEIN, N. C. HEID, E. MÖSKER, H. VAN DEN ELST, H. S. OVERKLEEF, E. GENERSCH, R. D. SÜSSMUTH (2014): Paenilamicin: structure and biosynthesis of a hybrid nonribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 40, 10821-10825.

MÜLLER, S., E. GARCIA-GONZALEZ, E. GENERSCH, R. D. SÜSSMUTH (2015): Involvement of secondary metabolites in the pathogenesis of the American foulbrood of honey bees caused by *Paenibacillus larvae*. *Nat. Prod. Rep.* 32, 765-778.

MUNAWAR, M. S., S. RAJA, E. S. WAGHCHOURE, M. BARKAT (2010): Controlling american foulbrood in honeybees by shook swarm method. *Pak. J. Agric. Sci.* 23, 1-2, 53-58.

MURRAY, K. D., K. A. ARONSTEIN, J. H. DE LEON (2007): Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Plasmid*, 58, 2, 89-100.

NAGAR, E., R. SCHWARZ (2015): To be or not to be planktonic? Self-inhibition of biofilm development. *Environ. Microbiol.* 17, 5, 1477-1486.

NAMSIVAYAM, S. K. R., G. NARENDRAKUMAR, J. A. KUMAR (2011): Evaluation of effective microorganism (EM) for treatment of domestic sewage. *J. Exp. Sci.* 2, 30-32.

NEUENDORF, S., K. HEDTKE, G. TANGEN, E. GENERSCH (2004): Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiol.* 150, 2381-2390.

NICHOLSON, W. L., N. MUNAKATA, G. HORNECK, H. J. MELOSH, P. SETLOW (2000): Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548-572.

NORDSTÖRM, S., I. FRIES (1995): A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *J. Apicul. Crisp.* 34, 97-103.

OHASHI, I., K. KATO, M. OKAMOTO, S. KOBAYASHI, D. TAKAMATSU (2020): Microbicidal effects of slightly acidic hypochlorous acid water and weakly acidified chlorous acid water on foulbrood pathogens. *J. Vet. Med. Sci.* 82, 3, 261-272.

OKAYAMA, A., T. SAKOGAVA, C. NAKAJIMA, T. HAYAMA (1997): Sporicidal activities of disinfectants of *Paenibacillus larvae*. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 10, 953-954.

OLATE - OLAVE, V. R., M. VERDE, L. VALLEJOS, L. PEREZ RAYMONDA, M. C. CORTESE, M. DOORN (2021): Bee health and productivity in *Apis mellifera*, a consequence of multiple factors. *Vet. Sci.* 8, 76.

OLDROYD, B. P., K. E. OSBORNE (1999): The evolution of worker sterility in honeybees: the genetic basis of failure of worker policing. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 1335-1339.

OLDROYD, B. P., R. D. GOODMAN, M. A. Z. HORNITZKY, D. CHANDLER (1989): The effect on american foulbrood of standard oxytetracycline hydrochloride treatments for the control of european foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Aust. J. Agric. Res.* 40, 691-697.

OLSEN, W. P. (1990): Automated microbial identification and quantitation. CRC Press LLC, USA.

OTTE, E. (1973): A contribution of laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with a particular reference to the immunofluorescence method. *Apidology* 4, 331-339.

ÖZKIRIM, A., A. YALÇINKAYA (2011): Preventive and antimicrobial activities of alkoxysilane against the american foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in *Apis mellifera* L. *J. Apicul. Res.* 51, 85-90.

PALIY, A. P. (2018): Antibacterial effect of "Ecocide C" disinfectant against mycobacteria. *Ukr. J. Ecol.* 8, 1, 141-147.

PAREDES-SABJA, D., A. SHEN, J. A. SORG (2014): *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol.* 22, 406-416.

PENG, Y.-S., K.-Y. PENG (1979): A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as the diagnostic for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 33, 284-289.

PERNAL, S. F., R. L. ALBRIGHT, A. P. MELATHOPOULOS (2008): Evaluation of the shaking technique for the economic management of american foulbrood disease of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econom. Entomol.* 101, 1095-1104.

PICCINI, C., B. D'ALESSANDRO, K. ANTÚNEZ, P. ZUNINO (2002): Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 761-765.

PIGGOT, P. J., D. W. HILBERT (2004): Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 579-586.

PLAGEMANN, O. (1985): Eine einfache Kulturmethode zur bakteriologischen Identifizierung von *Bacillus larvae* mit Columbia – Blut – Scrägagar. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 98, 61-62.

POPPINGA, L., B. JANESCH, A. FÜNFHAUS, G. SEKOT, E. G. GONZALEZ, G. HERTLEIN, K. HEDTKE, C. SCHÄFFER, E. GENERSCH (2012): Identification and

functional analysis of the S-layer protein SplA of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. Plos. Pathog. 8, 5: e1002716.

QUINN, P. J., B. K. MARKEY (2001): Disinfection and disease prevention in veterinary medicine. U : Disinfection, sterilization and preservation (Block, S. S. ur.). 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, USA. 1069-1103.

RATNIEKS, F. L. W. (1992): American foulbrood: the spread and control of an important disease of the honey bee, Bee World 73, 177-191.

RAUCH, S., A. ASHIRAILEVA, K. HEDTKE, E. GENERSCH (2009): Negative correlation between individual – insect – level virulence and colony – level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American Foulbrood of honeybees. Appl. Environ. Microbiol. 75, 10, 3344-3347.

RIESSBERGER - GALLÉ, U., W. VON DER OHE, K. CRAILSHEIM (2001): Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae larvae*, the causative agent of the american foulbrood. J. Invertebr. Pathol. 77, 231-236.

RITTER, W. (1994): Bienenkrankheiten. Ulmer, Stuttgart, Germany.

RITTER, W. (1996): Diagnostik und Bekämpfung der Bienenkrankheiten. Stuttgart. Fischer.

RITTER, W. (2003): Early detection of American foulbrood by honey and wax analysis. Apiacta 38, 125-130.

RODE, L.J., C. W. JEWIS, Jr., J. W. FOSTER (1962): Electron microscopy of spores of *Bacillus megaterium* with special reference to the effects of fixation and thin sectioning. J. Cell Biol. 13, 423-435.

RUANO, M., J. EL-ATTRACHE, J. VILLEGAS (2001): Efficacy comparisons of disinfectants used by the comercial poultry industry. Avian Dis. 45, 972-977.

RUTALA, W. A., D. J. WEBER (2013): Disinfection and sterilization: An overview. *Am. J. Infect. Control* 41, S2-S5.

RUTTNER, F. (1988): *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer, Berlin.

SANTOS, R. C. V., L. Q. S. LOPES, C. F. S. ALVES, V. P. FAUSTO, K. PIZZUTTI, V. BARBOZA, M. E. SOUZA, R. P. RAFFIN, P. GOMES, D. TAKAMATSU, Y. MORIANGA, A. A. BOLIGON, M. L. ATHAYDE, C. C. FELIPPI, R. A. VAUCHER (2014): Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood disease agents. *J. Asia-Pac. Entomol.* 17, 342-347.

SATTAR, S. A., V. S. SPRINGTHORPE, M. A. ROCHON (1998): A product based on accelerated and stabilized hydrogen peroxide: Evidence for broad-spectrum germicidal activity. *Can. J. Infect. Control* 13, 123-130.

SETLOW, B., E. MELLY, P. SETLOW (2001): Properties of spores of *Bacillus subtilis* blocked at an intermediate stage of spore germination. *J. Bacteriol.* 183, 4894-4899.

SETLOW, P. (2003): Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 550-556.

SETLOW, P. (2006): Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514-525.

SETLOW, P. (2013): Summer meeting 2013 – when the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *J. App. Microbiol.* 115, 1251-1268.

SETLOW, P. (2014): Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *J. Bacteriol.* 196, 1297-1305.

SHIMANUKI, H. (1997): *Bacteria. U: Honey bee pests, predators and diseases* (Morse, R. A., K. Flottum, ur.). 3<sup>rd</sup> edition. A. I. Root Company. Medina, Ohio, USA, 715-718.

SHIMANUKI, H., D. A. KNOX (1994): Susceptibility of *Bacillus larvae* to Terramycin. *Am. Bee. J.* 134, 125-126.

SLEYTR, U. B., B. SCHUSTER, E. M. EGELSEER, D. PUM (2014): S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 823-864.

SLEYTR, U. B., E. M. EGELSEER, N. ILK, D. PUM, B. SCHUSTER (2007): S-layers as a basic building block in a molecular construction kit. *FEBS J.* 274, 323-334.

SOOD, S., H. STEINMETZ, B. BEIMS, K. I. MOHR, M. STADLER, M. DJUKIC, W. DER OHE, M. STEINERT, R. DANIEL, R. MÜLLER (2014): Paenilarvins: iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Chem. BioChem.* 15, 1947-1955.

SONG,H., K. JAEGOO, S. YU-KYONG, K. KI-YOUNG (2020): Antibacterial activity of pimarinic acid against the causative agent of American foulbrood, *Paenibacillus larvae*. *J. Apicul. Res.*

SPIVAK, M., G. S. REUTER (2001): Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behaviour. *Apidologie* 32, 555-565.

STEINKRAUS, K. H., R. R. GRANADOS, K. A. McKENNA, M. G. VILLANI, P. S. ROBBINS, R. P. MORTLOCK (1998): Growth of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of american foulbrood in honey bees and *Bacillus papilliae*, the causative agent of Milky disease in beetle larvae in lepidoteran cell cultures. *Acta Biotehnl.* 18, 123-133.

STURTEVANT, A. P. (1932): Relation of commercial honey to spread of American foulbrood. *J. Agricul. Res.* 45, 257-285.

STURTEVANT, A. P., I. L. REVELL (1953): Reduction of *Bacillus larvae* spores in liquid food of honey bees by action of the honey stopper, and its relation to the development of American foulbrood. *J. Econ. Entomol.* 46, 855-860.

SUDHAUS, N., M. C. PINA-PÉREZ, A. MARTÍNEZ, G. KLEIN (2012): Inactivation kinetics of spores of *Bacillus cereus* strains treated by a peracetic acid-based disinfectant at different concentrations and temperatures. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 5, 442-452.



SULIMANOVIĆ, Đ., LJ. ZEBA, J. MARKOVIĆ (1995): Prepoznavanje i suzbijanje pčelinjih bolesti. PIP. Zagreb.

SUNDE, E. P., P. SETLOW, L. HEDERSTEDT, B. HALLE (2009): The physical state of water in bacterial spores. PNAS. 106, 19334-19339.

ŠULJAGIĆ, V. (2008): A pragmatic approach to judicious selection and proper use of disinfectant and antiseptic agent sin healthcare settings. U: Disinfection and decontamination: Principles, applications and related issues. (Manivannan, G., ur.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 125-154.

THOMPSON, S. A. (2002): *Campylobacter* surface-layers (S-layers) and immune evasion. Ann. Periodontol. 7, 43-53.

TITERA, D., M. HAKLOVA (2003): Detection method of *Paenibacillus larvae larvae* from beehive winter debris. Apiacta 38, 131-133.

TLAK GAJGER, I., A. M. MAÑES, G. FORMATO, M. MORTARINO, J. TOPORCAK (2021): Veterinarians and beekeeping: What roles, expectations and future perspectives? - a review paper. Vet. arhiv 91, 4, 437-443.

TLAK GAJGER, I., J. VLAINIĆ, P. ŠOŠTARIĆ, J. PREŠERN, J. BUBNIČ, M. I. SMODIŠ ŠKERL (2020): Effects on some therapeutical, biochemical, and immunological parameters of honey bee (*Apis mellifera*) exposed to probiotic treatments, in field and laboratory conditions. Insects 11, 638.

TLAK GAJGER, I., Z. TOMLJANOVIĆ, Z. PETRINEC (2010): Monitoring health status of Croatian honey bee colonies and possible reasons for winter losses. J. Apicul. Res. 49, 1, 107 - 108.

TOMLJANOVIĆ, Z., I. TLAK GAJGER, V. SANTRAČ (2012): Dobra veterinarska praksa u pčelinjaku. Bayer Animal Health, Zagreb.

TRAYNOR, K. (2008): American foulbrood. How to discover AFB before clinical symptoms. *Am. Bee. J.* 148, 10, 913-916.

TREMBLAY, N. (2010): L'utilisation d'une chambre d'irradiation pour la désinfection du matériel apicole.

TSOURKAS, P. K. (2020): *Paenibacillus larvae* bacteriophages: obscure past, promising future. *Microb. Genom.* 6, 2.

TYL, J., H. VINŠOVÁ, O. MESTEK, A. KAŇA, K. TITTL, D. TITĚRA, M. KAMLER (2015): Use of iodophor desinfection in honeybee practice. *Veterinářství* 65, 458-462.

UENO, Y., E. YOSHIDA, W. MISUMI, E. WATANDO, K. SUZUKI, Y. HIRAI, M. OKURA, M. OSAKI, K. KATSUDA, D. TAKAMATSU (2018): Population structure and antimicrobial susceptibility of *Paenibacillus larvae* isolates from American foulbrood cases in *Apis mellifera* in Japan. *Environ. Microbiol. Rep.* 10, 2, 210-216.

VAN IMMERSEEL, F., K. LUYCKX, K. DE REU, J. DEWULF (2018): Cleaning and disinfection. U: Biosecurity in animal production and veterinary medicine (Dewulf, J., F. Van Immerseel ur.). Uitgeverij Acco, The Netherlands, 134-157.

VAUCHER, R. A., J. L. GIONGO, L. P. BOLZAN, M. S. CÔRREA, V. P. FAUSTO, C. F. S. ALVES, L. Q. S. LOPES, A. A. BOLIGON, M. L. ATHAYDE, A. P. MOREIRA, A. BRANDELLI, R. P. RAFFIN, R. C. V. SANTOS (2015): Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. *J. Asia-Pac. Entomol.* 18, 205 – 210.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J., & LUPSKI, J. R. (1994); Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.*, 5, 1, 25-40.

VERSTRAETEN, N., K. BRAEKEN, B. DEBKUMARI, M. FAUVART, J. FRANSAER, J. VERMANT, J. MICHIELS (2008): Living on a surface: swarming and biofilm formation. Trends Microbiol. 16, 496-506.

VETTER, D. L., J. W. D. BULCKE, D. W. IMKE, A. M. STEVENS, J. V. ACKER (2009): Preventive action of organosilicon treatments against disfigurement of wood under laboratory and outdoor conditions. Int. Biodeterior. Biodegradation, 63, 1093-1101.

VIDAL-NAQUET, N. (2015): Honeybee Veterinary Medicine: *Apis mellifera* L. 5m Publishing, UK.

VON DER OHE, W., K. SCHÜTZE, F. W. LIENAU (1996): Arealuntersuchungen auf *Bacillus larvae* Sporen im Honig als prophylaktikum. Apidologie 17, 123.

ZAKARIA, Z., S. GAIROLA, N. MOHD SHARIFF (2010): Effective microorganisms (EM) technology for water quality restoration and potential for sustainable water resources and management. Proceedings of the 5th International Congress on Environmental Modelling and Software, 5-8 July, Ottawa, Ontario, Canada, 1-8.

ZHAO, X., K. CHENG, J. HAO, D. LIU (2008): Preparation of peracetic acid from hydrogen peroxide, part II: Kinetics for spontaneous decomposition of peracetic acid in the liquid phase. J. Mol. Catal. A Chem. 284, 1-2, 58-68.

ZHAVNENKO, V. M. (1971): Indirect method of immunofluorescence in the diagnosis of fowlbrood (American and European). Veterinaria 8, 109.

ŽUGELJ, A., B. PAPIĆ, I. ZDOVC, U. ZAJC, M. GOLOB, J. AVBERŠEK, D. KUŠAR (2021): ERIC and WGS typing of *Paenibacillus larvae* in Slovenia: Investigation of ERIC I outbreaks. Insects, 12, 362.

WANG, S., P. SETLOW P, Y. - Q. LI (2015): Slow leakage of Ca-dipicolinic acid from individual *Bacillus* spores during initiation of spore germination. J. Bacteriol. 197, 1095-1103.

WARDLE, M.D., G. M. RENNINGER (1975): Bactericidal effect of hydrogen peroxide on spacecraft isolates. *Appl. Microbiol.* 30, 710-711.

WHITE, G. F. (1906): The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. USDA, Bur. Entomol., Technical Series 14, 1-50.

WILSON, W. T. (1971): Survival of *Bacillus larvae* spores in honeybee faeces exposed to sunlight. *J. Apicul. Res.* 10, 3, 149 – 151.

WINSTON, M. L. (1987) *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.

YOON, C., C. S. NA, J. H. PARK, S. K. HAN, Y. M. NAM, J. T. KWON(2004): Effect of feeding multiple probiotics on performance and fecal noxious gas emission in broiler chicks. *Kor. J. Poult. Sci.* 3, 229-235.

YOUNG, S.B., P. SETLOW (2003): Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 95, 54-67.

YUE, D., M. NORDHOFF, L. H. WIELER, E. GENERSCH (2008a): 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.

YUE, D., M. NORDHOFF, L. H. WIELER, E. GENERSCH (2008b): How does *Paenibacillus larvae* breach the midgut epithelium? Report of th 55th seminar in Hohen Neuendorf, 11 – 13 March, 2008. *Apidologie* 39, 600-601.

YUN-HEE, M., L. KWANG-BAE, K. YOUNG-JUN, K. YOON-MO (2011): Current status of EM (Effective Microorganisms) utilization. *KSBBJ.* 26, 365-373.

## 9. PRILOZI

### POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz strukture spore iz roda *Paenibacillus* (prilagođeno prema SETLOW, 2014.).

Slika 2. Promjene izgleda poklopaca stanica saća karakteristične za bolesti pčelinjeg legla.

Slika 3. Uginula i raspala pčelinja ličinka.

Slika 4. Udubljeni poklopci nad stanicama saća koje sadrže uginule pčelinje ličinke.

Slika 5. Spaljivanje košnica je učinkovit način sanacije AGMP.

Slika 6. Pretresanje pčelinjih zajednica.

Slika 7. Mehaničko čišćenje drvenih dijelova košnice struganjem površinskog sloja.

Slika 8. Primjena kuhanja drvenih okvira u vodenoj otopini kaustične sode.

Slika 9. Pakovanja dezinficijensa korištenih u pokusu - 1. Ecocid S 2. Sekusept aktiv 3. Incidin Oxyfoam S 4. Despadac proizvodi 5. Bee protect proizvodi 6. Genox i Genoll 7. EM® PROBIOTIK ZA PČELE.

Slika 10. Prikaz karte s lokacijama pčelinjaka s kojih potječu terenski izolati bakterije *P. larvae*.

Slika 11. Prikaz traka na gelu koji nastaju umnažanjem DNK uz specifične početnice primjenom REP-PCR metode, za pojedine genotipove (ERIC I do ERIC IV) bakterije *P. larvae*.

Slika 12. Prikaz procjene broja bakterija primjenom membranske filtracije (prilagođeno prema GRIFFITH, 2016.).

Slika 13. Izrasle kolonije bakterije *P. larvae* na krutoj hranjivoj podlozi.

Slika 14. Shematski prikaz bioluminiscencijske reakcije ATP-a (prilagođeno prema GRIFFITH, 2016.).

Slika 15. Prikaz rezultata genotipizacije pojedinih terenskih izolata bakterije *P. larvae* prikupljenih i izdvojenih 2010. do 2016. godine, na agaroznom gelu nakon elektroforeze PCR produkta. NTC - kontrola umnažanja, trake 2 do 5 pozitivna kontrola poznate DNK za ERIC I, ERIC II i ERIC IV genotip, traka 5 - DNK marker, traka 6 do 13 - terenski izolati.

Slika 16. Prikaz rezultata genotipizacije pojedinih terenskih izolata bakterije *P. larvae* prikupljenih i izdvojenih 2013. do 2018. godine, na agaroznom gelu nakon elektroforeze PCR produkta. NTC - kontrola umnažanja, trake 2 do 5 pozitivna kontrola poznate DNK za ERIC I, ERIC II i ERIC IV genotip, traka 6 - DNK marker, traka 7 do 15 - terenski izolati.

Slika 17. Prikaz rezultata genotipizacije pojedinih terenskih izolata bakterije *P. larvae* prikupljenih i izdvojenih 2016. do 2019. godine, na agaroznom gelu nakon elektroforeze PCR produkta. Trake 4 do 7 pozitivna kontrola poznate DNK za ERIC I, ERIC II i ERIC IV genotip, traka 9- DNK marker, traka 2 do 4 i 10 do 15 - terenski izolati.

Slika 18. Prikaz vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Despadac i Despadac secure, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 19. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Despadac i Despadac secure, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; # $p < 0,0001$ .

Slika 20. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Despadac i Despadac secure, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; # $p < 0,0001$ .

Slika 21. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Despadac i Despadac secure, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

Slika 22. Prikaz vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Ecocid i Sekusept aktiv, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

Slika 23. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Ecocid S i Sekusept aktiv, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 24. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Ecocid S i Sekusept aktiv, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 25. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Ecocid S i Sekusept aktiv, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

Slika 26. Prikaz rezultata vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvoda Incidin OxyFoam S, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

Slika 27. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodom Incidin OxyFoam S, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 28. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodom Incidin OxyFoam S, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 29. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodom Incidin OxyFoam S, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

Slika 30. Prikaz vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Genox i Genoll, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 31. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Genox i Genoll, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 32. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Genox i Genoll, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 33. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Genox i Genoll, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

Slika 34. Prikaz vrijednosti promjera zone inhibicije uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Bee Protect F i Bee Protect H Forte, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 35. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Bee Protect F i Bee Protect H Forte, na rast bakterije *P. larvae*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja; \* $p < 0,0001$ .

Slika 36. Prikaz vrijednosti relativnih jedinica ATP-a uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Bee Protect F i Bee Protect H Forte, na rast bakterije *P. larvae*, na površinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.

Slika 37. Prikaz rezultata smanjenja broja spora bakterije *P. larvae* uzrokovane dezinfekcijskim proizvodima Bee Protect F i Bee Protect H Forte, utvrđenih suspenzijskim testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška iz najmanje tri ponavljanja.



## POPIS TABLICA

Tablica 1. Prikaz mjesta i pripadajućih GPS koordinata lokacija s kojih potječu terenski izolati bakterije *P. larvae*.

Tablica 2. Prikaz rezultata genotipizacije terenskih izolata bakterije *P. larvae* porijeklom s područja RH (2010.-2020.).

Tablica 3. Prikaz rezultata djelovanja dezinficijskih proizvoda na terenske izolate bakterije *P. larvae*.

## 10. ŽIVOTOPIS

Zlatko Tomljanović, dr. med. vet. rođen je 11. lipnja 1969. u Zagrebu. Osnovnu školu završio je u Zagrebu 1984. godine, a Poljoprivredno-prehrambeno obrazovni centar, smjer veterinarski tehničar u Zagrebu 1988. godine, kada i upisuje Veterinarski fakultet u Zagrebu. Tijekom studija boravio je na stručnim usavršavanjima na pčelinjacima „Preston“ u Australiji i u tvrtki „Honey Land Farms“ u Sjedinjenim Američkim Državama. Tijekom IV. godine studiranja dobio je rektorovu stipendiju Sveučilišta u Zagrebu. Pred kraj studija pokrenuo je vlastiti pčelarski posao u okviru OPG Tomljanović. Godine 2000. diplomirao je na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu i počinje se profesionalno baviti uzgojem pčela, proizvodnjom meda i ostalih pčelinjih proizvoda u okviru OPG Tomljanović. U svibnju 2005. osniva „Tomljanović“ obrt za uzgoj pčela, proizvodnju meda i pčelinjih proizvoda te obrazovanje odraslih osoba. Krajem svibnja 2009. odlazi iz „Tomljanović“ obrta i zapošljava se na mjestu stručnog savjetnika za pčelarstvo u Hrvatskom zavodu za poljoprivredno savjetodavnu službi u Sv. Nedelji. Godine 2011. prelazi u Hrvatsku poljoprivrednu komoru (HPK) kao stručni savjetnik za pčelarstvo i tajnik je Odbora za pčelarstvo pri HPK. Od 2012. do 2014. godine obnaša dužnost višeg stručnog savjetnika za pčelarstvo u Poljoprivredno savjetodavnoj službi, a poslije u Savjetodavnoj službi od 2014. do 2018. godine. Tijekom 2018. prelazi na mjesto višeg stručnog savjetnika za pčelarstvo u Hrvatsku poljoprivrednu-šumarsku savjetodavnu službu gdje ostaje do 2019. godine kada odlazi u Upravu za stručnu podršku razvoju poljoprivrede i ribarstva u Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske na mjesto voditelja odjela za savjetovanje u pčelarstvu gdje je i danas zaposlen. Godine 2011. upisuje poslijediplomski doktorski studij Veterinarske znanosti te prijavljuje temu doktorskog rada pod naslovom „Učinak dezinficijensa na bakteriju *Paenibacillus larvae* u laboratorijskim uvjetima“. Polje interesa mu je zdravstvena zaštita pčela i tehnologija pčelarenja. Od studenog 2004. povremeni je predavač u pčelarskim školama pri Pučkim otvorenim učilištima u Hrvatskoj.

### STRUČNO USAVRŠAVANJE I EDUKACIJE:

1. Veterinarska znanost i struka, 1993, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska
2. Annual beekeeping meeting 1995, Sheboygan, Wisconsin, SAD
3. Prvi susreti hrvatskih pčelara“, 1997 - 2000, Hlebina, Hrvatska
4. 38<sup>th</sup> Apimondia International Apicultural Congress“, 2003, Ljubljana, Slovenija,

5. Pčelinje bolesti danas i sutra - okrugli stol , 2004, HVD, Zagreb, Hrvatska
6. Međunarodni pčelarski sajam , 2005 - 2020, Gudovac, Hrvatska
7. Dani meda - okrugli stol , 2005 - 2008, Zagreb, Hrvatska
8. 4. apiterapijski kongres“, 2006, Passau, Njemačka
9. 2. Europska konferencija iz Apidologije“, 2006, Prag, Češka
10. 1. međunarodni forum apiterapije“, 2006, Atena, Grčka
11. 40<sup>th</sup> Apimondia International Apicultural Congress“, 2007, Melbourne, Australija
12. 2. OIE simpozij iz bolesti pčela, 2008, Freiburg, Njemačka
13. 3. Europska konferencija iz Apidologije“, 2008, Belfast, Sj.Irska
14. Sastanci radne skupine COLOSS: Atena/Belfast/Bruxelles, 2008
15. Sastanak radne skupine COLOSS, 2009, Zagreb
16. 41<sup>st</sup> Apimondia International Apicultural Congress, 2009, Montpellier, France
17. Međunarodni pčelarski sajam „Dalmatina“, 2010 – 2017, Split, Hrvatska
18. Drugi i treći „Dani mediteranske hrane „, 2010 – 2011, Dubrovnik, Hrvatska
19. Global Conference of Entomology, 2011, Chiang Mai, Thailand
20. Nacionalna konferencija o kvaliteti meda , 2011 - 2014, Opatija, Hrvatska
21. 42<sup>nd</sup> Apimondia International Apicultural Congress, 2011, Buenos Aires, Argentina
22. 5. Europska konferencija iz Apidologije, 2012, Halle, Njemačka
23. 43<sup>rd</sup> Apimondia International Apicultural Congress, 2013, Kijev, Ukrajina
24. 6. Europska konferencija iz Apidologije, 2014, Murcia, Španjolska
25. 44<sup>th</sup> Apimondia International Apicultural Congress, 2015, Daejeon, Južna Koreja
26. Cross-visits u okviru Nefertiti projekta, 2021, Cork, Irska

## POPIS RADOVA

### **Autorske knjige**

**TOMLJANOVIĆ Z., I.TLAK GAJGER, V. SANTRAČ (2012):** Dobra veterinarska praksa.  
Bayer d.o.o., Zagreb

### **Znanstveni i pregledni radovi:**

**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

**TLAK GAJGER, I., Z. TOMLJANOVIĆ, O. VUGREK** (2015): Osobitosti pojedinih genotipova bakterije *Paenibacillus larvae*. *Vet. Stanica*, 46, 2, 109 - 119.

**TLAK GAJGER, I., O. VUGREK, Z. PETRINEC, D. GRILEC, Z. TOMLJANOVIĆ** (2010): Detection of *Nosema ceranae* in honey bees from Croatia. *J. Apicul. Res.* 49, 3, 340 – 341.  
doi:10.3896/IBRA.1.49.4.08

**TLAK GAJGER, I., Z. TOMLJANOVIĆ, Z. PETRINEC** (2010): Monitoring health status of Croatian honey bee colonies and possible reasons for winter losses. *J. Apicul. Res.* 49, 1, 107 – 108. doi:10.3896/IBRA.1.49.1.19

### **Znanstveni radovi u zbornicima skupova:**

**TLAK GAJGER, I., M. TOPLEK, Z. TOMLJANOVIĆ** (2014): Influence of additional feeding of honeybee colonies with EkoZeo Pet mineral supplement on numbers of *Nosema ceranae*. Zbornik prispjevka 1. znanstveno posvetovanje o čebelah in čebelarstvu, Kmetijski Inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija, 13 - 16.

**TLAK GAJGER, I., Z. TOMLJANOVIĆ** (2013): Veterinarsko sanitarne mjere pri suzbijanju američke gnjiloće medonosne pčele. Zbornik radova 25. znanstveno-stručno-edukativnog seminara DDD i ZUPP, Split, Hrvatska, 157 - 162.

### **Stručni radovi u zbornicima skupova**

**TLAK GAJGER, I., L. SVEČNJAK, Z. TOMLJANOVIĆ** (2014): Utjecaj epidemiologije značajnih bolesti na biološko-uzgojno stanje pčelinjih zajednica. Zbornik radova 5. međunarodnog pčelarskog sajma "Dalmatina". Savez pčelarskih udruga Splitsko-dalmatinske županije, Split, 29 – 31.

## Sažeci u zbornicima i časopisima

BENKO, V., **Z. TOMLJANOVIĆ**, I. TLAK GAJGER (2021): Summer brood interruption as effective and sustainable varroosis control. Book of abstracts: 9th international congress "Veterinary science and profession", Faculty of Veterinary medicine, Zagreb, 79 – 79.

TLAK GAJGER, I., **Z. TOMLJANOVIĆ**, J. VLAINIĆ (2019): Efficacy of disinfection of apiary fittings contaminated with *Paenibacillus larvae* spores. 15<sup>th</sup> COLOSS Conference. Condensed Proceedings book, Montreal, Kanada, 29 – 29.

ŠOŠTARIĆ, P., J. VLAINIĆ, **Z. TOMLJANOVIĆ**, I. TLAK GAJGER (2019): Immunomodulation role of EM®Probiotic on *Nosema* spp. spores number and concentrations of vitellogenin in haemolymph of honeybee (*Apis mellifera*). Book of abstracts: 8th International Congress „Veterinary science and profession“. Faculty of Veterinary medicine, Zagreb, 134 – 134.

**TOMLJANOVIĆ, Z.**, I. TLAK GAJGER, I. BUKOVAC, S. STANIC-GLUHINIC, D. FRANGEN (2015): Beekeeping schools – a great chance for rural and sustainable development. Book of abstracts: 44<sup>th</sup> Apimondia International Apicultural Congress, Daejeon, Korea, 324 - 324.

TLAK GAJGER, I., J. RIBARIĆ, J. VLAINIĆ, A. M. KOVAČ, **Z. TOMLJANOVIĆ** (2015): Concentrations of total proteins and glucose in brood of honeybee colonies fed with food additives. Proceedings of the 11<sup>th</sup> Coloss Conference, Lukovica, Slovenia, 41 – 41.

TLAK GAJGER, I., S. NEJEDLI, L. SVEČNJAK, J. RIBARIĆ, **Z. TOMLJANOVIĆ** (2014): Food additives as alternative treatments for *Nosema ceranae* disease. Book of abstracts: 6<sup>th</sup> European conference of Apidology, Murcia, Spain, 140 -141.

SANTRAČ V., **Z. TOMLJANOVIĆ**, I. TLAK GAJGER (2013): Good veterinary practice and epidemiology of bee decline. Book of abstracts: 43<sup>rd</sup> International Apicultural Congress Apimondia, Kyiv, Ukraine, 178 - 178.

LUŠIĆ, D., **Z. TOMLJANOVIĆ**, I. TLAK GAJGER, D. VUKIĆ LUŠIĆ, D. FRANGEN, V. MIĆOVIĆ (2013): Toward institucional approach in Croatian apitherapy. Book of abstracts: 43<sup>rd</sup> International Apicultural Congress Apimondia, Kyiv, Ukraine, 91 – 92.

**TOMLJANOVIĆ, Z.**, I. TLAK GAJGER, V. SANTRAČ (2012): Good veterinary practice in apiary – directions for better health protection of the bee communities. Book of abstracts: Apimondia Symposium Apiecotech, Beograd, Serbia, 35 - 37.

**TOMLJANOVIĆ, Z.**, I. TLAK GAJGER, V. SANTRAČ (2012): Good veterinary practice in apiary – guidelines for the better protection of honeybee health. Book of abstracts: 1<sup>st</sup> International Symposium on the Carniolan honeybee and 2<sup>nd</sup> International Conference of beekeeping organizations, Celje, Slovenija, 51 – 52.

**TOMLJANOVIĆ Z.**, I. TLAK GAJGER, V. SANTRAČ (2011): Good veterinary practice in apiary – guidelines for future. Book of abstracts: 42<sup>nd</sup> International Apicultural Congress Apimondia, Buenos Aires, Argentina, 159 -159.

TLAK GAJGER, I., D. CVITKOVIĆ, **Z. TOMLJANOVIĆ** (2011): Survey about American foulbrood diagnostic and eradication procedures in Croatia. Proceedings of COLOSS Workshop WG 2+4 „Diagnostic Surveys“, Beograd, Srbija, 12 - 12.

TLAK GAJGER, I., **Z. TOMLJANOVIĆ**, D. CVITKOVIĆ (2010): Monitoring honeybee colony losses in Croatian apiaries. Book of abstracts: 6<sup>th</sup> Conference - „Prevention of honeybee Colony losses“, Ankara, Turkey, 40 - 40.

**TOMLJANOVIĆ, Z.**, I. TLAK GAJGER (2009): Possible reasons for colony losses in Croatia. Book of abstracts: 5<sup>th</sup> Conference - „Prevention of honeybee Colony losses“, Montpellier, France, 25 – 25.