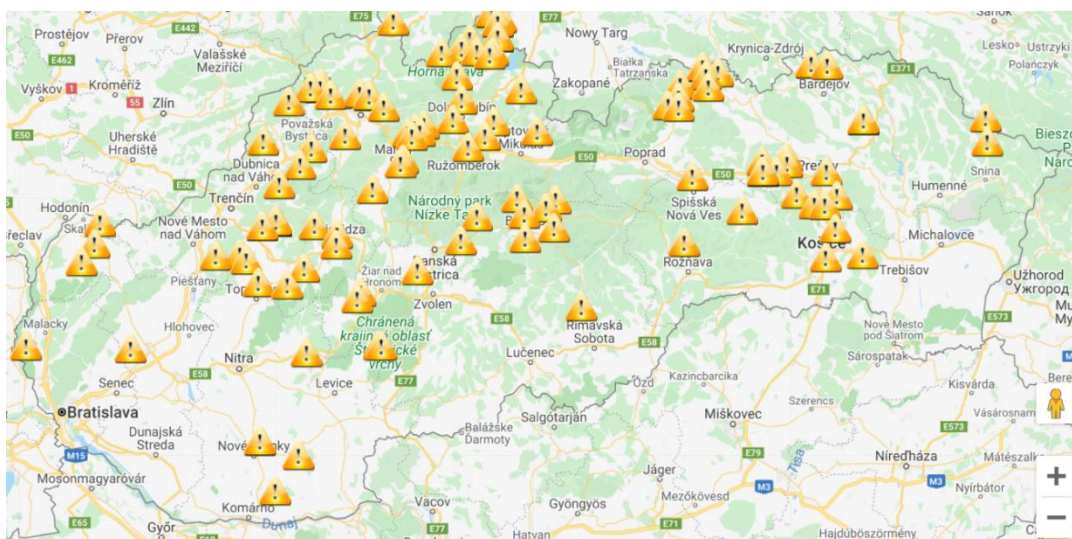


***Paenibacillus larvae* – pôvodca moru včelieho plodu: Úvod (1)**

Mor včelieho plodu (MVP) je najzávažnejším celosvetovo rozšíreným bakteriálnym ochorením včely medonosnej postihujúcim jej ranné vývinové štádiá. Keď sa spomenie táto tematika medzi včelármi, mnohí zvažujú, niektorí azda pre svoju zlú skúsenosť, iní zasa dúfajúc, že sa s týmto problémom pri vlastných včelách nikdy nestretnú. Veru, bezpochyby existujú aj veselšie včelárske témy. Tak či onak, pre úspešný boj je nevyhnutné čo najlepšie poznať svojho protivníka. Preto sa v nasledujúcich článkoch pokúsime priblížiť niektoré známe i menej známe poznatky, či zaujímavosti týkajúce sa MVP. Začneme tými najzákladnejšími. Pôvodcom tejto choroby je baktéria *Paenibacillus larvae* (Genersch, 2010). Larvy, ktoré sa infikujú spórami patogénu v takej miere, že ochorejú, prakticky bez výnimky uhynú. V prípade klinického prepuknutia infekcia vo väčšine prípadov vo včelstve postupne napreduje, rastúce úhyny narúšajú generačnú výmenu včiel, počet jedincov klesá, a toto oslabovanie v kratšom či dlhšom časovom horizonte vedie ku kolapsu kolónie. V najhoršom prípade je takáto kolónia vyrabovaná iným včelstvom, čo vedie k ďalšiemu šíreniu ochorenia. Na Slovensku bol MVP po prvý raz diagnostikovaný v roku 1939 a patrí medzi choroby podliehajúce povinnému hláseniu podľa zákona č.39/2007 Z.z. o veterinárnej starostlivosti (Toporčák a kol., 2014). Na našom území sa každoročne objavujú nové prípady tohto ochorenia (obr. 1 a 2).



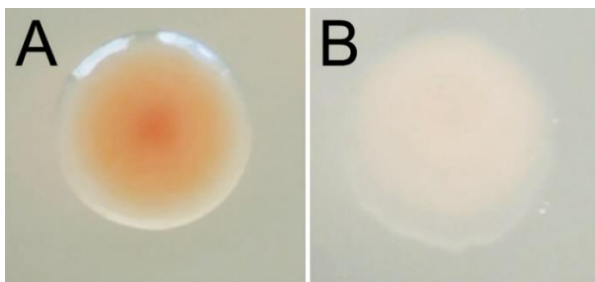
Obr. 1: Ohniská moru včelieho plodu - máj 2021 (ŠVSSR, 2021).



Obr. 2: Ohniská moru včelieho plodu - jún 2022 (ŠVSSR, 2022).

História a taxonomické zaradenie pôvodcu moru včelieho plodu

Hoci prvé odborné zmienky o MVP pochádzajú z 18. storočia, kedy sa preň podľa zápachu vychádzajúceho z postihnutých včelstiev ustálil názov „*Foulbrood*“ (tzn. zápachajúci/hnilý plod) (Schirach, 1769), pôvodcu ochorenia odhalil až v r. 1906 americký mikrobiológ White, ktorý opakovane izoloval baktériu, ktorá bola pomenovaná najprv ako *Bacillus larvae*. Neskôr v r. 1950 sa podarilo vyizolovať aj ďalšiu baktériu, ktorú klasifikovali ako *Bacillus pulvifaciens*. Táto sa ako pôvodca moru vyskytovala iba raritne a niekedy bola dokonca považovaná za nepatogénnu, čo bolo ale vyvrátené až o viac ako 50 rokov neskôr (Genersch a kol., 2006). Po zavedení komparatívnej sekvenčnej analýzy 16S rRNA do bakteriálnej taxonómie bolo nutné spraviť rozsiahle nomenklatúrne revízie. *B. larvae* a *B. pulvifaciens* boli pridelené do nového rodu *Paenibacillus* a reklasifikované na *Paenibacillus larvae* resp. *Paenibacillus pulvifaciens* (Ash a kol., 1993). To ale netrvalo dlho a po vykonaní pokročilejších biochemických a genetických analýz boli druhy zlúčené. *P. larvae* bol reklasifikovaný na *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* a *P. pulvifaciens* na *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens*. Toto rozdelenie malo odrážať genotypické, fenotypické a patologické vlastnosti rôznych kmeňov (Hendrickx a kol., 1996). Ako už čitateľ tuší, ani táto klasifikácia nebola konečná. Ako postupne rástol počet zozbieraných prírodných izolátov, podarilo sa objaviť aj také kmene, ktoré svojimi vlastnosťami odporovali dovtedy popísaným charakteristikám uvedených poddruhov. Takými to boli napr. kmene, vytvárajúce oranžovo pigmentované kolónie (vlastnosť pripisovaná „nepatogénnemu“ *P. l. pulvifaciens*), ktoré patrili podľa všetkých znakov okrem sfarbenia k *P. l. larvae* (Hendrickx a kol., 1996; Drobnikova a kol., 1994). Napokon bola pomocou klasických metód (morfológia kolónií, elektrónová mikroskopia spór) i moderných molekulárnych metód (pulzná elektroforéza, SDS PAGE analýza proteínového profilu, rep-PCR využívajúca ERIC primery) vykonaná rozsiahla analýza zbierkových i prírodných kmeňov, ktorá preukázala ich veľmi vysokú podobnosť, podľa autorov neoprávňujúcu poddruhové členenie. Navyše sa experimentálne podarilo i kmeňmi „nepatogénneho typu“ infikovať larvy a vyvolať typické príznaky moru včelieho plodu, čím zanikol hlavný dôvod predošlého rozdelenia. Posledná taxonomická revízia v roku 2006 preto reklasifikovala oba typy na *Paenibacillus larvae* bez poddruhovej klasifikácie (Genersch a kol., 2006), čo platí až dodnes.

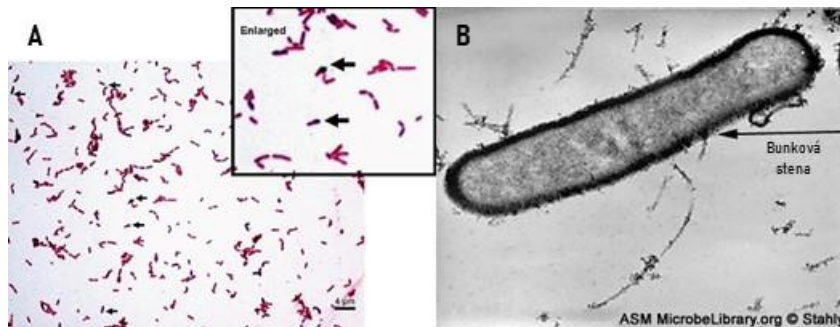


Obr. 3: Pigmentované (A) a nepigmentované (B) kolónie rôznych kmeňov *P. larvae* vyrastené na J-agare (Hirai a kol., 2016).

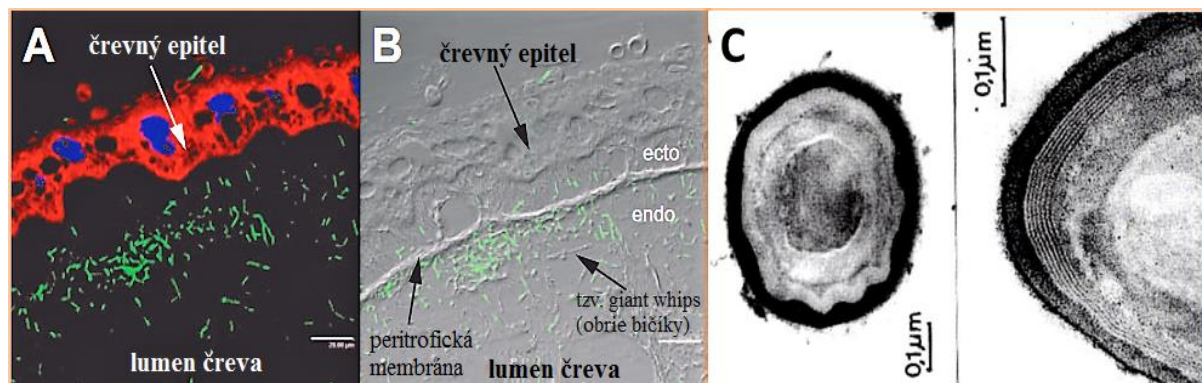
Mikrobiologická charakteristika druhu *Paenibacillus larvae*

Paenibacillus larvae (Kmeň: *Firmicutes*, Trieda: *Bacilli*, Rad: *Bacillales*, Čeľaď: *Paenibacillaceae*, Rod: *Paenibacillus*) je grampozitívna, fakultatívne anaeróbna, sporulujúca baktéria (Genersch a kol., 2006). Väčšina jej kmeňov je pohyblivá a disponuje peritrichnými vo zväzkoch usporiadanými bičkami (dlhými 0,2 - 30 μm). Ide o vysoko špecializovaného entomopatogéna, ktorého jediným hostiteľom sú včelie larvy, pričom nie je známy žiadny iný prirodzený habitat podporujúci klíčenie spór a bunkové delenie *P. larvae* (Ebeling a kol., 2016). Dospelé včely sú voči bakteriálnej infekcii imúnne. Rozlišujú sa 2 životné štádiá baktérie: (i) vegetatívne tyčinkovité bunky (0,5 – 1 x 2,5

– 5 μm) a (ii) oválne spóry (0,6 – 1,3 μm), ktoré predstavujú infekčný agens (obr. 3 a 4) (Gordon a kol., 1973; Shimanuki a Knox, 2000). Najväčšie na infekciu sú včelie larvy v ranných vývinových štádiách (staré 12 - 36 h), pričom niektorí autori uvádzajú, že už 10 spór prijatých s potravou môže u niektorých lariev vyvolať fatálnu intestinálnu infekciu (Bambrick a Rothenbuler, 1961; Genersch a kol., 2005). K úhynu dochádza akonáhle sa baktériám podarí invadovať telovú dutinu (lat. *haemocoel*) (Yue a kol., 2008). Larvy staršie ako 2 dni sa považujú za viac-menej imúnne, nakoľko sú už schopné odolať infekcii až 10^5 spór (Sturtevant, 1932). Pozn. vzhľadom na isté experimentálne skúsenosti a získané poznatky však považujeme uvedený minimálny počet spór, pri ktorom je šanca, že larva ochorie za podhodnotený a vyžadujúci opätovné preverenie.



Obr. 4: A) Kultúra *P. larvae* zafarbená Gramovým farbením. Šípky označujú spóry (tmavšie), ktoré sa vytvárajú v subterminálnej oblasti vegetatívnych buniek (Guzman a kol., 2011). B) elektrónová mikroskopia vegetatívnej bunky *P. larvae* (Stahly, 1985).

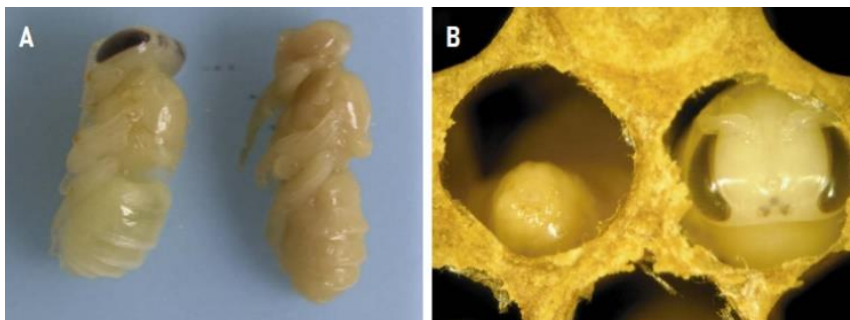


Obr. 5: Životné štádiá *P. larvae*: a) detailný pohľad na distribúciu vegetatívnych buniek pozdĺž črevného epitelu 4. deň po infekcii (fluorescenčná *in situ* hybridizácia), b) rovnaká fotka, kontrastné zobrazenie, tzv. *giant whips* – agregované bičiky, pozostatky z vysporulovaných vegetatívnych buniek, čiarka reprezentuje 20 μm c) rez endospórou, obal 7 vrstiev (elektrónová mikroskopia) (Foto: J. Ludvík) (upravené podľa Yue a kol., 2008; Titěra, 2009).

Patogenéza moru včelieho plodu

Výskyt ochorenia závisí od mnohých faktorov, najmä od virulencie patogénu a genetických vlastností danej kolónie, avšak významnú úlohu zohrávajú aj environmentálne podmienky či stresové vplyvy (Evans a Spivak, 2010). Pre infekciu je nevyhnutné, aby bola včelcia larva vystavená kontaminovanej potravine počas prvých 36 hodín od vyliahnutia z vajíčka (Hoage a Rothenbuler, 1966). Po skončení konzumovania sa spóry dostanú do tráviaceho traktu larvy a prechádzajú do lumenu čreva, kde približne 12 hodín po požití vyklíčia (Yue a kol., 2008). Pôvodne sa predpokladalo, že po vyklíčení vegetatívne formy *P. larvae* ihneď prenikajú cez epitel čreva pomocou fagocytózy a delia sa až po prieniku do telovej dutiny, ktorá bola považovaná za primárne miesto pomnoženia patogénu (Bailey

a Ball, 1991). Toto tvrdenie vyvrátili pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie Yue a kol. (2008). Tí preukázali, že vegetatívne formy sa najskôr masívne pomnožujú v čreve, ktoré kolonizujú bez viditeľného narušenia tkanivovej integrity epitelu. Počas tohto štádia infekcie žije *P. larvae* v čreve ako komenzál, pričom využíva stravu prijatú larvou. Toto podporujú aj zistenia, že bakteriálna bunka *P. larvae* obsahuje aktívne enzýmy metabolických dráh, ktoré sa uplatňujú v metabolizme sacharidov. Je teda schopný metabolizovať rozličné cukry vrátane glukózy a fruktózy, a tie využívať pre svoj rast (Neuendorf a kol., 2004, Genersch, 2010). Vnútro čreva larvy pokrýva tzv. peritrofická membrána (obr. 4B), ktorá udržiava bakteriálnu masu v lumene čreva a zamedzuje jej kontaktu s črevným epitelom. Avšak, v neskoršom štádiu infekcie, keď je už črevo naplnené veľkým množstvom baktérií, dochádza k narušeniu tejto ochrannej vrstvy. Vtedy začína *P. larvae* svoj invazívny spôsob života, preniká cez medzibunkové priestory epitelom čreva, a následne migruje naprieč telovou dutinou, kde pokračuje v bunkovom delení (Yue a kol., 2008). Počas svojho vegetatívneho rastu secernuje vysoko aktívne extracelulárne proteázy, ktoré napomáhajú infekcii (Hrabák a Martinek, 2007) tým, že prostredníctvom degradácie spojivových štruktúr bunka-bunka a bunka-matrix narušajú integritu črevného epitelu, čím uľahčujú prienik baktérií do hemocelu. Nastáva sepsa, larva hynie, vegetatívne bunky sa ďalej delia a produkované proteázy postupne rozkladajú kadáver na polotekutú lepkavú hmotu (angl. *ropy mass*). Tieto procesy sú pre *P. larvae* esenciálne, nakoľko ešte kým je vo vegetatívnom štádiu, musí zabezpečiť rozrušenie larválneho integumentu aby sa zaistilo, že po sporulácii budú spóry voľne dostupné (Genersch, 2010; Antúnez a kol., 2009). K sporulácii dochádza po vyčerpaní organických nutrientov. Polotekutá hmotu postupne schne a formuje sa z nej tzv. príškvar (angl. *scale*), ktorý je vysoko infekčný (môže obsahovať aj viac ako 2×10^9 spór *P. larvae*). Robotnice čističky sa kontaminujú pri snahe o jeho odstránenie. Následne trofalaktickými kontaktmi spôsobia intrakoloniálne rozšírenie spór, ktoré sa dostanú do medu a larválnej potravy. Včely opatrovatelky potom podávaním kontaminovanej potravy nakazia ďalšie larvy. Od momentu rozloženia prvej larvy má ochorenie často rýchly spád, hynie stále viac lariev, kolónia slabne a postupne kolabuje. Vtedy býva vyrabovaná včelami z iných včelstiev, ktoré si spolu s ulúpeným medom zanesú infekciu do vlastnej kolónie (Bailey a Ball, 1991; Lindström a kol., 2008a). Efektívny boj voči *P. larvae* je pomerne komplikovaný, nakoľko vytvára veľmi veľké množstvo spór. Ide o extrémne rezistentné endospóry odolávajúce teplu, chladu, suchu, vlhkosť i dezinfekčným činidlám, ktoré si môžu uchovať infekčnosť aj po dobu viac ako 35 rokov. Bližšie poznatky o procese tvorby spór a ich biologických charakteristikách sú limitované malým počtom vedeckých prác (Genersch, 2010). Z mikroskopických štúdií vieme iba to, že *P. larvae* produkuje spóry podobne ako iné baktérie (Bakhiet a Stahly, 1985), a že k diferenciacii vegetatívnych buniek na dormantné spóry dochádza v dôsledku vyčerpania nutrientov (Poppinga a Genersch, 2015). Toľko teda na úvod. Ďalej sa budeme tejto problematike venovať niekedy nabadúce...



Obr. 5: Niektoré z klinických príznakov MVP. A) zdravá (vľavo) a chorá kukla rovnakého veku. Väčšina lariev však hynie ešte pred dosiahnutím pupálneho štádia. B) uhynutá rozkladajúca sa larva, z ktorej neskôr vznikne príškvar. Bunky boli kontrolne otvorené na 13. deň po experimentálnej infekcii (Genersch, 2010).

Zoznam použitej literatúry:

- Antúnez, K., Anido, M., Schlapp, G., Evans, J.D., & Zunino, P. (2009). *J. Intervertebr. Pathol.* 102, 129-232.
- Ash, C., Priest, F.G., & Collins, M.D. (1993). *Antonie Van Leeuwenhoek* 64, 253-260.
- Bailey, L., & Ball, B.V. (1991). Academic Press, London, UK, pp. 193.
- Bakhiet, N., & Stahly, D. P., (1985). *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(3), 690-692.
- Bamrick, J. F., & Rothenbuhler, W.C. (1961). *J. Insect Pathol.* 3, 381-390.
- Drobnikova, V., Richter, V., Häusler, J., & Pytelova, I. (1994). *J. Apic. Res.* 33, 69-74.
- Ebeling, J., Knispell, H., Hertlein, G., Fünfhaus, A., & Genersch, E. (2016) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 7387-7395.
- Evans, J.D., & Spivak, M. (2010). *J. Intervertebr. Pathol.* 83, 62-72.
- Genersch E. (2010). *Intervertebr. Pathol.* 103, S10-S19.
- Genersch, E., Ashiralieva, & A., Fries, I. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7551-7555.
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., & Fries, I. (2006). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 501-5.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C., & Pang, C.H. (1973) *Agriculture Handbook*, US Department of Agriculture No. 427, 283pp.
- De Guzman, Z. M., Cervancia, C. R., Dimasuay, K. G. B., Tolentino, M. M., Abrera, G. B., Cobar, M. L. C., ... & Feliciano, C. P. (2011). *Appl. Radiat. Isot.*, 69(10), 1374-1379.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., de Vos, P., & Berkeley, R.C.W. (1996). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 270-279.
- Hirai, Y., Suzuki, T., Inaba, N., Minoguchi, N., & Takamatsu, D. (2016). *J. Vet. Med. Sci.* 78(7), 1195-1199.
- Hrabak, J., & Martinek, K. (2007). *J. Apic. Res.* 46, 160-164.
- Hoage T.R., & Rothenbuhler W.C. (1966). *J. Econ. Entomol.* 59, 42-45.
- Lindström, A., Korpela, S., & Fries, I. (2008). *J. Invertebr. Pathol.* 99, 82-86.
- Neuendorf, S., Hedtke, K., Tangen, G., & Genersch, E. (2004). *Microbiology* 150, 2381-2390.
- Poppinga, L., & Genersch, E. (2015). *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 29-36.
- Schirach, G. A. (1769) *Histoire des Abeilles*. p. 56 (Chapter 3).
- Shimanuki H., & Knox D.A. (2000) U.S. Department of Agriculture, *Agriculture Handbook* No. AH-690, 61pp.
- Titěra, D. (2009). *VÚVč Dol*, 1. vyd., pp. 44.
- Toporčák, J., Kuzyšinová, K., Mudroňová, D., & Velčická, G. (2014). *Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach*, Košice, pp. 90.
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L.H., & Genersch, E. (2008) *Environ. Microbiol.* 10, 1612-1620.