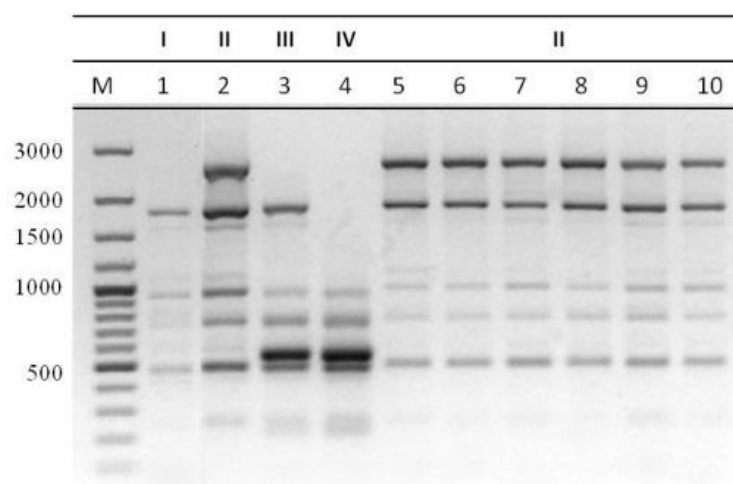


***P. larvae* – pôvodca MVP: genotypy, epidemiológia, virulencia (2)**

V Dymáku č. 7+8/2022 sme otvorili cyklus článkov venujúci sa tematike moru včelieho plodu (MVP). Na úvod sme sa zoznámili zo všeobecnými charakteristikami pôvodcu ochorenia, ktorým je baktéria *Paenibacillus larvae* a načrtli vznik infekcie a priebeh ochorenia. V druhom článku postúpime ďalej a pozrieme sa bližšie na niektoré dôležité aspekty týkajúce sa biologických vlastností rôznych kmeňov patogénu, ktoré boli odhalené za posledné 2 dekády. Pre včelárov bude možno novým poznatkom, že identifikované kmene baktérie je možné rozdeliť do niekoľkých tried, ktorých zástupcovia sa odlišujú nielen geneticky, či fenotypicky, ale aj z hľadiska účinku na jednotlivé larvy a včelstvo ako celok. Ľudovo povedané, pôvodcovia MVP vonkoncom nie sú rovnakí. Predpokladom pre získanie takýchto poznatkov boli a sú epidemiologické štúdie plniace niekoľko účelov - (i) mapujú výskyt patogénu vo včelích populáciách, (ii) sledujú časové a priestorové rozšírenie MVP vo včelích populáciách, (iii) hľadajú zdroj/-e infekcie, (iv) odhaľujú vzťahy medzi rôznymi prepuknutiami ochorenia, (v) identifikujú faktory ovplyvňujúce tieto prepuknutia a iné. V rámci realizácie týchto štúdií prebieha aj zber prírodných izolátov patogénu (najmä z meliva a plástov obsahujúcich chorý plod), ktoré sú následne kategorizované a triedené. Tieto kmene sa potom ďalej využívajú pri pokročilejšom a detailnejšom mikrobiologickom, genetickom a molekulárno-biologickom štúdiu, z ktorého vzišli aj zistenia, ktorými sa zaoberá tento článok.

ERIC genotypové triedy baktérie *P. larvae*

Ako veľmi efektívna molekulárna metóda pre genotypizáciu *P. larvae* sa ukázala rep-PCR (*repetitive element* PCR) za použitia ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) primerov (Genersch, 2010). Pri tejto metóde sa sledujú unikátne vysoko konzervované repetitívne sekvencie v mimogénových oblastiach bakteriálnej DNA. Tieto je možné pomocou PCR efektívne „namnožiť“, a analyzovať elektroforeticky na agarózovom géli. Týmto spôsobom boli najprv definované a odlišené 4 ERIC genotypové triedy *P. larvae* (obr. 1). Ako posledný bol iba nedávno objavený genotyp ERIC V (Beims a kol., 2020), ktorý sa zatiaľ podarilo identifikovať iba u 1 kmeňa vyizolovaného zo vzorky polyflorálneho medu pochádzajúceho z provincie Badajoz v Španielsku. Pre zaujímavosť je ešte možné spomenúť, že podľa starej nomenklatúry genotypy ERIC I a ERIC II náležali poddruhu *P. l. larvae* a genotypy ERIC III a ERIC IV poddruhu *P. l. pulvificiens* (Genersch a kol., 2006).



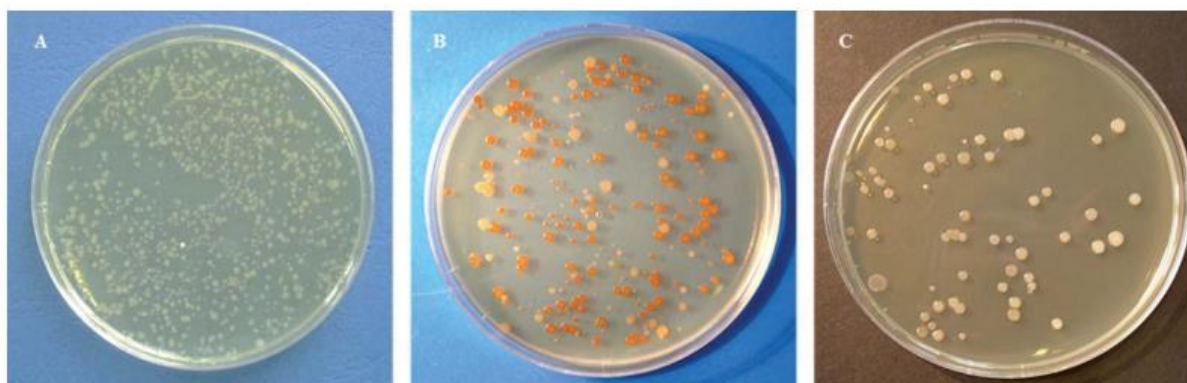
Obr. 1: ERIC-PCR genotypizácia vybraných kmeňov *P. larvae*. Dráha M – 100 bp marker, dráhy 1-4 – ERIC I-ERIC IV elektroforetické vzory referenčných kmeňov CCUG 28515, CCM 4486, CCM 39 and CCM 38b, dráhy 5-10 – ERIC II vzory niekoľkých slovenských izolátov. PCR produkty boli analyzované na 1% agarovom géle obsahujúcom farbičku GelRed (Šedivá a kol., 2018).

Zástupcovia jednotlivých ERIC genotypov sa líšia mnohými vlastnosťami (niektoré z nich zachytáva tab. 1) a morfológiou. Kolónie kmeňov ERIC I sú šedé až šedobiele, často veľmi bledé až transparentné. Pri kolóniách kmeňov ERIC II je častá oranžová pigmentácia, avšak nie je pravidlom (obr. 2). Kolónie kmeňov ERIC III zvyknú byť tmavooranžové a kmeňov ERIC IV biele. Teda už mikrobiologické vyšetrenie naznačuje príslušnosť k určitému genotypu. Nestačí však, lebo sa vyskytuje aj pomerne veľa výnimiek. Morfologické rozdiely boli odhalené aj v štruktúre spór, ktoré boli skúmané pomocou elektrónových mikrofotografií (obr. 3). Najväčší dosah na praktické včelárenie majú však v konečnom dôsledku hodnoty časovej úmrtnosti lariev - LT_{100} (tab.1), ktoré sú odlišné pre jednotlivé genotypy. Hodnota LT_{100} vyjadruje počet dní, za ktorý dôjde k úhynu tých lariev, ktoré po infekcii ochoreli. Táto hodnota poskytuje konkrétny obraz o virulencii danej genotypovej triedy.

Tab. 1: Základné fenotypové charakteristiky jednotlivých ERIC genotypových tried *P. larvae* (podľa Genersch, 2005; 2006; 2010; a Beims a kol., 2020).

Druh (Genersch a kol., 2006) Bývalé poddruhy (Heyndricks a kol., 1996)	<i>P. larvae</i>				
	<i>P. l. larvae</i>		<i>P. l. pulvificiens</i>		-
ERIC genotypy	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV	ERIC V*
Povrch spór	hladký	hladký	ryhovaný	ryhovaný	ryhovaný
LT_{100} (dní)	10 - 13	6 - 10	3 - 7	3 - 7	3
Hydrolyza želatíny	-	+	+	-	+
Hemolýza CSA agaru	-(+)	-	+	+	+
Fermentácia manitolu	-	+	+	+	?
Fermentácia salicínu	+	-	-	-	?

*kmeň DSM 106052



Obr. 2: Kolónie vegetatívnych buniek *P. larvae* genotypov ERIC I (a) a ERIC II (b) a (c) (Foto: Dr. G. Rugna, Bassi a kol., 2015).



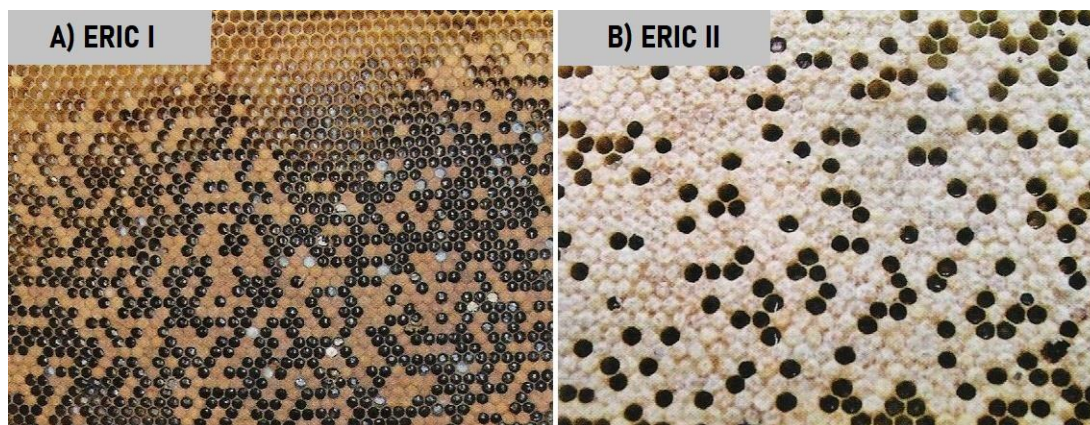
Obr. 3. Elektrónové mikrofotografie spór rôznych kmeňov *P. larvae* genotypových tried ERIC I – V. A) kmeň DSM 7030 (ERIC I); B) kmeň DSM 25430^a (ERIC II); C) kmeň LMG 16252 (ERIC III); D) LMG 16247 (ERIC IV); E) prírodný izolát 138b (DSM 106052; ERIC V). Zatiaľ čo spóry kmeňov ERIC I a ERIC II majú hladký povrch, spóry kmeňov ERIC III-V vykazujú pozdĺžne ryhovanie. Biela čiarka má veľkosť 0,2 μm (Beims a kol., 2020).

Epidemiológia MVP

Genotypy ERIC I a ERIC II sú globálne rozšírené na všetkých kontinentoch. Majoritné zastúpenie vo svete majú kmene ERIC I, kmene ERIC II sú vo väčšej miere zastúpené hlavne v Európe. Aj tu však ERIC I kmene obyčajne dominujú, napr. v Litve majú zastúpenie 100%, v Taliansku 79%, Rakúsku 58% a pod. (Amšiejute a kol., 2022; Bassi a kol., 2015; Loncaric a kol., 2009). ERIC II kmene prevládajú iba v Česku (80,4%; Biova a kol., 2021), Slovinsku (70,2%; Žugelj a kol., 2021) a pravdepodobne aj na Slovensku, nakoľko všetkých 33 prírodných izolátov zozbieraných z rôznych lokalít Slovenska a charakterizovaných na Chemickom ústave SAV (Šedivá a kol., 2018) prislúchalo práve tomuto genotypu. Čo sa týka ostatných genotypov, tie majú z praktického hľadiska len minimálny význam. Ako sme už zmienili, bol objavený iba 1 izolát s genotypom ERIC V a kmene ERIC III a IV neboli v posledných rokoch medzi prírodnými izolátmi vôbec zaznamenané. Praktický význam tak majú iba pre výskumné účely a dostupné sú iba ako historické izoláty uchovávané v zbierkach mikroorganizmov (Genersch a kol., 2006; Genersch a kol., 2010; Beims a kol., 2020).

Virulencia kmeňov *P. larvae* na úrovni lariev a včelstiev

Rozdiely vo virulencii rôznych kmeňov *P. larvae* sa vo vzťahu k individuálnym larvám prejavujú jednak a) rôznym počtom usmrtených jedincov pri rovnakej infekčnej dávke spór, a tiež aj b) rýchlosťou ich zabíjania. V prvom prípade virulencia nemá súvislosť s ERIC genotypmi a jednotlivé kmene v nej môžu vykazovať značné rozdiely (Genersch a kol., 2005). Moliné a kol. (2020) popísali, že pre dosiahnutie 50% úmrtnosti lariev (laboratórny chov) s ich najmenej virulentným kmeňom potrebovali 7,4 – 479x vyššiu dávku spór ako pri iných kmeňoch. V druhom prípade je však situácia iná. Z hľadiska rýchlosti usmrcovania lariev sú kmene ERIC II virulentnejšie ($LT_{100} = 6 - 10$ dní) ako kmene ERIC I ($LT_{100} = 10 - 13$ dní) (Genersch a kol., 2006; Genersch a kol., 2005). Rozdielna virulentnosť v zabíjaní jednotlivých lariev sa prejavuje na úrovni včelstiev úplne opačne, ako by sa logicky očakávalo. ERIC II kmene, ktoré zabíjajú larvy rýchlejšie sú menej virulentné voči včelstvám; odborné povedané, virulencia na úrovni larvy v tomto prípade negatívne koreluje s virulenciou na úrovni včelstva (Rauch a kol., 2009). Tento paradoxný jav súvisí s efektivitou hygienického správania včiel, ktorá po zaviečkovaní plodu klesá. V rámci tohto správania dokážu robotnice odstraňovať larvy usmrtené ERIC II kmeňmi oveľa efektívnejšie (> 90% účinnosť), keďže k takmer všetkým úhynom dochádza ešte pred zaviečkovaním buniek. Naproti tomu pri infekcii kmeňmi ERIC I hynú larvy prevažne až po zaviečkovaní, kedy včely dokážu detegovať a odstrániť mŕtve larvy s nižšou len ~ 60% účinnosťou. Odstránenie uhynutých lariev z buniek plástu/z úľa ešte pred ich degradáciou je kľúčové, lebo sa tým limituje produkcia infekčných spór a účinne sa potláča rozvoj ochorenia vo včelstve. V kolóniách, ktoré majú dobre vyvinuté hygienické správanie sa preto infekcia kmeňmi ERIC II nemusí klinicky prejavovať (Spivak a Reuter, 2001; Evans a Spivak, 2010) príp. sú klinické symptómy v takom rozsahu, že výrazne nenarúšajú generačnú výmenu a včelstvo dokáže s patogénom koexistovať aj viac sezón. V praxi to znamená, že pri infekcii s ERIC II kmeňmi môže prebiehajúca infekcia vo včelstve zostať dlho neodhalená, keďže patologické zmeny sú ľahšie prehliadateľné (obr. 4). Ostatné „raritné“ kmene reprezentujúce genotypy ERIC III-V sa vyznačujú hypervirulenciou ($LT_{100} = 3 - 7$ dni) (Beims a kol., 2020, Genersch, 2010), ktorá je pravdepodobne dôvodom, prečo sa im nepodarilo ustáliť vo všelej populácii. Ďalej sa tejto problematike budeme venovať nabudúce...



Obr. 4: Plodové pláсты s klinickými prejavmi MVP. A) Typické symptómy vyvolané kmeňom *P. larvae* s genotypom ERIC I. Väčšina lariev hynie obyčajne až po zaviečkovaní, v kadáveroch lariev dochádza k masívnej produkcii spór, v bunkách je možné nájsť polotekuté zvyšky degradovaných lariev a príškvary, ochorenie má obyčajne rýchly spád. B) Typické symptómy vyvolané kmeňom *P. larvae* s genotypom ERIC II. Väčšina lariev hynie ešte pred zaviečkovaním, včely odstraňujú kadávery lariev v dôsledku čoho plásty vykazujú väčšiu medzerovitosť plodu ako v zdravých včelstvách, bunky s degradovanými larvami sa vyskytujú oveľa sporadickejšie ako pri infekcii ERIC I kmeňmi, ochorenie má obyčajne pomalý priebeh, pričom choré včelstvo môže niekedy prežívať aj viac sezón (Rauch a kol., 2009).

Zoznam použitej literatúry:

- Amšiejute P, Jurgelevičius V, Mačiulskis P, Butrimaite-Ambrozevičiene C, Pilevičiene S, Janeliunas Z, Kutyrjova T, Jacevičiene I, Paulauskas A. (2022) *Front. Vet. Sci.*; 9:959636.
- Bassi, S., Formato, G., Milito, M., Trevisiol, K., Salogni, C., & Carra, E. (2015) *Vet. Quart.*, 35(1), 27–32.
- Beims, H., Bunk, B., Erler, S., Mohr, K. I., Spröer, C., Pradella, S., Günthera, G., Rohdee, M., von der Oheb, W., Steinert, M. (2020) *Int. J. Med. Microb.*, 151394.
- Biová J, Bzdil J, Dostálková S, Petřivalský M, Brus J, Carra E and Danihlík J (2021) *Front. Vet. Sci.* 8:698976.
- Evans, J.D., & Spivak, M. (2010). *J. Invertebr. Pathol.* 83, 62-72.
- 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.
- Genersch E. (2010). *Invertebr. Pathol.* 103, S10-S19.
- 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.
- Loncaric, I.; Derakhshifar, I.; Oberlerchner, J.T.; Köglberger, H.; Moosbeckhofer, R. (2009) *J. Invertebr. Pathol.* 100, 44–46.
- Moliné, M. de la P., Fernández, N. J., Damiani, N., Churio, M. S., Gende, L. B. (2020) *J. Apic. Res.*, 1–8.
- Rauch, S., Ashiralieva, A., Hedtke, K., Genersch, E. (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3344–3347.
- Spivak, M.S., Reuter, G.S. (2001) *Apidologie* 32, 555–565.
- Šedivá, M.; Laho, M.; Kohútová, L.; Mojžišová, A.; Majtán, J.; Klaudiny, J. (2018) *Molecules* 23, 3236.
- Žugelj, A.; Papić, B.; Zdovc, I.; Zajc, U.; Golob, M.; Avberšek, J.; Kušar, D. (2021) *Insects* 12, 362.

Maroš Laho a Jaroslav Klaudiny, Chemický ústav SAV.

Príspevok vznikol za finančnej podpory grantu VEGA 2/0164/19.