

## HNILOBA VČELÍHO PLODU

### (European foulbrood, evropská hniloba plodu, EFB)

Jedná se o nákazu, která se po mnoha letech opět dostává do podvědomí českých včelařů. V roce 2015 byla u nás po více než 35 letech zaznamenána v Peci pod Sněžkou.<sup>8</sup> V letošním roce byla potvrzena také na území Moravskoslezského kraje v okrese Frýdek Místek.

Za hlavního původce onemocnění se považuje bakterie **Melissococcus plutonius**, dříve označovaná jako *Streptococcus pluton*. Jedná se o grampozitivní, nesporogenní, anaerobní kokobakterii.<sup>14</sup> Na rozdíl od původce moru včelího plodu nevytváří spóry. Dle starší literatury<sup>1</sup> je tento původce snadno zničen teplem, ve vodě hyne při 63°C, je málo rezistentní proti chemickým prostředkům, nicméně v suchém materiálu odolává asi rok. Klinický obraz průběhu onemocnění je ovlivněn dalšími mikroorganismy, zejména sporulující bakterií *Paenibacillus alvei*, kdy spory odolávají varu okolo 10 min a v medu si uchovávají virulenci déle než 1,5 roku<sup>1</sup> a dalšími sekundárními patogeny (*Achromobacter eurydice*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus dendritiformis*)<sup>6</sup>.

Přestože se jedná o nákazu rozšířenou po celém světě, komplexní informace o kmenech *M. plutonius* a jejich rozšíření nejsou zcela objasněny. Epidemiologie EFB je ovlivněna virulencí kmene *M. plutonius*, což je pravděpodobně důvodem rozdílného vývoje choroby mezi zeměmi. V posledních letech velké problémy zaznamenává zejména Švýcarsko a Velká Británie. Původce byl vědci rozdělen do geneticky odlišných skupin lišících se biochemickými charakteristikami, virulencí a prevalencí. Dalším studiem virulence<sup>5</sup> *M. plutonius* bylo např. zjištěno, že kmen CC12 je extrémně virulentní a zabil všechny testované jedince, zatímco kmen CC3 byl méně virulentní než kmen CC12, a část infikovaných larev přežila. Naproti tomu testovaný kmen CC13 byl avirulentní a většina infikovaných larev se vyvinula v dospělé včely.

#### PLOD – klinické příznaky

S potravou (kontaminovaná mateří kašička může mít změněnou barvu, kontaminovaný pyl a med) se *M. plutonius* dostává do trávicího traktu larev. Rozvoj onemocnění závisí zejména na množství přijatých bakterií larvou, virulenci kmene a stáří larvy. K vyvolání infekce stačí často sto bakterií. Stejně jako u moru včelího plodu jsou nejvímavější jednodenní larvy. Odolnost se zvyšuje se stářím larvy, kdy starší larvy by musely dostat velkou infekční dávku, aby onemocněly.<sup>8</sup> Bakterie *M. plutonius* se v žaludku larvy namnoží, produkují toxiny a poškodí stěnu trávicího aparátu. Žaludek nemocných larev je naplněn žlutohnědým kalným obsahem s křídovitě zbarvené bílými shluky mikrobů (mikroskopicky - v žaludku jsou matné křídově zbarvené bílé shluky). Postižené larvy hynou ještě před zavíčováním (nejčastěji 1-2 dny před zavíčováním) a rychle se rozkládají. Některé larvy infekci nepodlehnu a vyloučí zárodky původce EFB v hrdkovitých výkalech. Ty zůstávají na stěnách buněk a stávají se dalším zdrojem infekce, kdy mohou být virulentní až 3 roky. Z infikovaných larev, které přežijí, se vyvinou kukly, které jsou menší a také vylíhlé včely jsou menší než včely zdravé. Tyto včely mají na povrchu těla patogenní zárodky a infekci šíří dále.<sup>8</sup>

Vlastní příčina úhynu larev není 100% objasněna. Je pravděpodobně způsoben poškozením peritrofické membrány (McKee, 2004), nutričním stresem larvy (Baylei, 1981) či produkcí toxinů jako tyramin (Kanbar, 2004). Na rozdíl od moru včelího plodu je množení původce *M. plutonius* omezeno na oblast trávicího aparátu, kdy vědci pozorovali u těžce postižených larev CC12 degeneraci epiteliálních buněk peritrofické membrány a žaludku, bakterie *M. plutonius* byly detekovány také mimo žaludek, avšak zde aktivně neproliferovaly.<sup>4</sup>

Postižená larva nápadně mění kroužkování a lesk, napjatost pokožky mizí a tělo změkne. Barva se mění na žlutou, hnědou až tmavohnědou. Uhynulé larvy nacházíme v buňkách v různé poloze. Jak již bylo více zmíněno, na nemoci se může podílet kromě *M. plutonius* více patogenů a nemoc může mít proto určitou variabilitu klinických příznaků.<sup>8</sup> Sekundární patogeny se podílejí na destrukci uhynulé larvy a jejich metabolity způsobují hnilobný až kyselý zápach, podle kterého se někdy (zejména ve Švýcarsku) používá označení „zkysání plodu“.<sup>8</sup> Převládá-li *P. alvei*, mění se larva v kašovitou, mazlavou, odporně páchnoucí hmotu (po shnilých jablkách, zkaženém klišu<sup>14</sup>), vysychá v snadno oddělitelný příškvár ležící na dně nebo boční stěně buňky. Převládá-li *Enterococcus faecalis*, páchne uhynulá larva kysele.<sup>1</sup> Často jsou zachovalé vzdušnice (šedavě hnědé larvy s bílými průdušnicemi).

## VČELSTVO – klinické příznaky

Klinické příznaky se vyvíjí v závislosti na mnoha faktorech: infekční tlak, virulence původce, genetika včelstva - schopnosti včelstva odstraňovat uhynulý plod, síle včelstva a množství včel ošetřující plod, výživě včelstva, zdravotní stav včelstva, roční období, tepelný stres, *Nosema* a další. Někdy je nemoc označována také jako „stresová nemoc“. Klinické příznaky se objevují zejména v období rychlého růstu (květen, červen). V rané fázi infekce, kdy je včelstvo silné a aktivně odstraňuje uhynulý zavíčkovaný plod, pozorujeme ve včelstvu pouze vyšší mezerovitost plodu. Po rozvinutí onemocnění, kdy včely nestačí odstraňovat uhynulý plod, pozorujeme ve včelstvu také změny na plodu. Průběh onemocnění může být u včelstev rozdílný, u některých příznaky zmizí, naopak v závažných případech může dojít k smrti včelstva. Také může docházet ke každoročnímu opětovnému výskytu EFB z kontaminovaných plástů a vybavení.

## VÝŽIVA, STRES

Rozvoj onemocnění je ovlivněn také krajinou a přísunem pylu, kdy se různé druhy pylu vyznačují rozdílným stimulačním nebo inhibičním účinkem vůči zárodkům *M. plutonius* (Rousseau, 1957). Průběh EFB závisí také na poměru včel ošetřujících plod, který se v období snůšky ve včelstvu mění. To může vysvětlovat, proč se projevy onemocnění mohou měnit rok od roku a sezónu od sezóny. S dostatečným množstvím potravy se zvyšuje pravděpodobnost přežití larev (Baily 1983).

Pozn. Úvahy o použití probiotik: *Lactobacillus kunkeei* je významnou bakterií mléčného kvašení dospělých včel (Vasquez et al., 2012) a larev (Endo a Salminen, 2013). Bylo zjištěno, že některé kmeny *L. kunkeei* mohou vykazovat antibakteriální účinnost proti *M. plutonius* (Endo-Salminen, 2013; Vasquez et al, 2012). Také *Lactobacillus plantarum* snižuje vzplanutí případů EFB.<sup>10</sup>

Protože EFB je nemoc související se stresem, měli by se včelaři vždy snažit minimalizovat stres kladený na včelstvo. Pouze silné a zdravé včelstvo (*Varroa*, *Nosema*, viry....) je schopné čelit nákaze. Jelikož mohou být na stanovišti subklinicky nemocná včelstva, je nutné se vyvarovat spojování slabých a silných včelstev. Včelař by měl do svých praktik zařadit důkladnou kontrolu včelstev včetně prohlídky plodu, sledovat stav medných a pylových zásob, předcházet jiným onemocněním. Úly by měly být umístěny v dobře větraném suchém prostoru, aby se omezily podmínky příznivé pro rozvoj onemocnění (chladné a vlhké počasí). Změny teploty plodu napomocí propuknutí EFB, typicky prvními postiženými larvami jsou kolem okrajů plodiště, kde teploty kolísají. Včelaři by se proto měli vyvarovat praktikám, které mohou vést ke ztrátě tepla z úlu.

## PŘENOS A ŠÍŘENÍ

Původce onemocnění byl prokázán v mnoha materiálech souvisejících se včelařskou činností. Jediným místem, kde se dokáže *M. plutonius* množit, je střevo larvy. Některé infikované larvy jsou schopny přežít a zanechávají v plástech (výkaly) zárodky schopné přežít několik měsíců, nově vylíhlé včely nesou bakterie na svém povrchu. Také včely podílející se na odstraňování uhynulých larev ze včelstva rozšiřují nákazu na ostatní jedince včelstva. Včely jsou rezervoárem onemocnění. Patogen se nachází také v medu, který je významným zdrojem šíření mezi včelstvy v období loupeží. *M. plutonius* byl detekován také na včelařském zařízení.<sup>9</sup>

Pozn. Pokusy ukázaly, že vosy jsou k umělé infekci citlivější než včely. Nákazy u nich probíhala rychle a prudce.<sup>1</sup>

Šíření:

- Loupež (kontaminované zásoby)
- Přesuny asymptomatických včelstev
- Roje neznámého původu
- Včelařská zařízení, souše

## VYŠETŘENÍ

Bakterii *M. plutonius* lze prokázat v mnoha materiálech. Metody jsou založeny na předchozí kultivaci nebo na průkazu přímo ve vzorcích. Mikroskopicky lze *M. plutonius* odhalit nejlépe v uhynulých larvách. Stejná situace je v případě vzorků určených ke kultivaci. V dnešní době jsou stále častěji využívány metody polymerázové řetězové reakce PCR. Dle studie<sup>3</sup> byly vyšetřovány vzorky včel, medu a měli. Nejvyšší záchyt byl u vzorků včel, nicméně také vzorky měli vykazovaly vysokou průkaznost původce.

## LÉČBA

Použití antibiotik k léčbě včel je u nás a v EU zakázáno. V zemích mimo EU jsou k tlumení hniloby včelího plodu často používána antibiotika např. oxytetracyklin, kdy u nich zatím nebyla zjištěna rezistence<sup>11</sup>. Např. ve Velké Británii se osvědčila v boji s nákazou metoda úplné obměny díla s následnou léčbou oxytetracyklinem<sup>15</sup>.

## OPATŘENÍ

Hniloba patří mezi nebezpečné nákazy, které podléhají povinnosti hlášení. V ČR se při výskytu hniloby včelího plodu postupuje stejně jako v případě výskytu moru včelího plodu tzn. v ohnisku s potvrzeným výskytem nákazy na stanovišti včelstev u 15 % a více včelstev neprodlené utracení všech včelstev na stanovišti včetně likvidace úlů i likvidaci veškerého včelařského příslušenství a v případě potvrzení nákazy u méně než 15 % včelstev neprodlené utracení všech včelstev s potvrzeným výskytem nákazy včetně likvidace úlů.

Jak již bylo zmíněno, u klinicky nemocných včelstev se bakterie *M. plutonius* nachází v celém včelstvu (larvách, včelím díle, dospělých včelách), proto se ke klinicky nemocným včelstvům i ve spoustě zemí přistupuje radikálně tzn. likvidaci ohněm. Vzhledem tomu, že včelstva na stanovišti vzájemně komunikují (zalétávání, loupeže, včelařská činnost ...), je logické, že

původce byl na stanovištích s výskytem včelstva s klinickými příznaky nalezen ve vzorcích odebraných i z ostatních včelstev (bez klinických příznaků) na stanovišti. Proto je nezbytné v případě potvrzení nákazy na stanovišti kromě likvidace klinicky nemocného včelstva (v případě částečné likvidace – do 15%) maximálně napomoci ozdravení všech zbývajících včelstev na stanovišti např. 100% obměnou díla na mezistěny spojenou s likvidační včelího díla tzv. očistu přemetením.

## REINFEKCE

Studii bylo zjištěno, že na stanovištích s výskytem klinicky pozitivního včelstva byly u zbývajících 90 % včelstev (bez klinických příznaků) pozitivní vzorky včel. Na okolních stanovištích bez příznaků, ale v blízkosti pozitivních včelínů, přenášelo bakterie *M. plutonius* 30 % včelstev.<sup>13</sup> Zde je nutno zmínit specifickou situaci včelařství v ČR. U nás je tato činnost založena zejména na zájmovém chovu včel, který je v současné době velmi populární. Máme nejen velmi vysokou hustotu zavčelení, ale také jednoznačnou několikanásobnou hustotu včelařů. Mezi stanovišti je krátká doletová vzdálenost, která zapříčiňuje snadný přenos a šíření nákaz. Proto jsme my včelaři v boji s nákazami „na jedné lodi“. Zdravotní stav mých včelstev ovlivňuje zdravotní stav okolních stanovišť a opačně. Je proto vysoce pravděpodobné, že i když chovatel zajistí ozdravení chovu a nebude nákaza řešena na okolních stanovištích, dojde brzy k reinfekci z okolí. Z tohoto důvodu je důležitá vzájemná spolupráce mezi včelaři a ochota řešit problém společně.

*zpracovala MVDr. Jana Cihlářová, Opava*

### Shrnutí klinických příznaků

1. Mezerovitý plod
2. Nerovnoměrné stáří plodu
3. Odstraňování uhynulého plodu včelami (kontrola prostoru před úly, pozorování včel vynášejících uhynulé larvy, odstraňování larev včelami na plástech)
4. Uhynulý nezavíčkovaný plod (změna barvy larvy, viditelné vzdušnice, změna polohy larvy v buňce, larvy lze z buňky vyjmout, změna konzistence, odstranitelné příškvary ....)
5. Slábnutí včelstva

Odkaz na fotografie klinických příznaků

<https://www.beedol.cz/wp-content/uploads/2020/06/P%C5%99%C3%ADznaky-hniloby-v%C4%8Del%C3%ADho-plodu.pdf>

Níže uvedené fotografie jsou uveřejněny se souhlasem chovatele.





















1. Nemoci a škůdci včely medonosné (Svoboda, Haragsimová, Hanko, Haragsim; 1968)
2. OIE; Chapter 3.2.3.; European foulbrood of honey bees
3. *Melissococcus plutonius* Can Be Effectively and Economically Detected Using Hive Debris and Conventional PCR; Jana Biová, Jean-Daniel Charrière , Silvie Dostálková , Mária Škrabišová , Marek Petřivalský, Jaroslav Bzdil and Jiří Danihlák
4. Infection of *Melissococcus plutonius* clonal complex 12 strain in European honeybee larvae is essentially confined to the digestive tract; Daisuke Takamatsu, Masumi Sato, Mikio Yoshiyama
5. Virulence Differences among *Melissococcus plutonius* Strains with Different Genetic Backgrounds in *Apis mellifera* Larvae under an Improved Experimental Condition; Keiko Nakamura, Yuko Yamazaki, Akiyo Shiraishi, Sota Kobayashi, Mariko Harada, Mikio Yoshiyama, Makoto Osaki, Masatoshi Okura, Daisuke Takamatsu
6. The Curious Case of *Achromobacter eurydice*, a Gram-Variable Pleomorphic Bacterium Associated with European Foulbrood Disease in Honeybees; Silvio Erler, Oleg Lewkowski, Anja Poehlein, Eva Forsgren
7. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology; Ingemar FRIESA, Scott CAMAZINEb
8. Včely zdravé a nemocné; Dalibor Titěra, 2017
9. Epidemiology and Genomics of European Foulbrood (*Melissococcus plutonius*) of Honey Bees; Edward George Haynes, 2013; University of York
10. Use of *Lactobacillus plantarum* in Preventing Clinical Cases of American and European Foulbrood in Central Italy; by Marco Pietropaoli, Emanuele Carpana, Marcella Milito, Massimo Palazzetti, Marcella Guarducci, Sofia Croppi and Giovanni Formato
11. Evaluating approved and alternative treatments against an oxytetracycline-resistant bacterium responsible for European foulbrood disease in honey bees; Scientific Reports volume 12, Article number: 5906 (2022)
12. Eva Forsgren; Journal of Invertebrate Pathology 103 (2010) S5-S9
13. Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood; Luc Belloya, Anton Imdorfb, Ingemar Friesc, Eva Forsgrenc, Hélène Berthoudb, Rolf Kuhn and Jean-Daniel Charri  re
14. V  elařstv  ; svazek I.; kolektiv autor  ; PSNV 2016
15. Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK Ruth Waite, Michael Brown, Helen Thompson, Medwin Bew