

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE**

Elmin S. Tarić

**KOMPARATIVNO ISPITIVANJE PRISUSTVA
UZROČNIKA I BOLESTI PČELINJEG LEGLA
TRADICIONALNO I SAVREMENO GAJENIH
PČELINJIH DRUŠTAVA UZ ANALIZU UTICAJA
NEKIH BIOLOŠKIH I ANTROPOGENIH
FAKTORA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Elmin S. Taric

**THE PRESENCE OF CAUSATIVE AGENTS
AND DISEASES OF BEE BROOD IN
TRADITIONAL AND MODERN
BEEKEEPING, AND THE EXAMINATION OF
VARIOUS BIOLOGICAL AND
ATHROPOGENIC FACTORS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTOR 1

Dr Jevrosima Stevanović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

MENTOR 2

Dr Aleksandar Stanojković, viši naučni saradnik

Institut za stočarstvo, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

2. Dr Vladimir Dimitrijević, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

3. Dr Uroš Glavinić, docent

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____ 2022. god. u Beogradu

Ova doktorska disertacija je deo projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, **ev. br. III46002** pod nazivom
„Molekularno - genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane”
rukovodica **prof. dr Zorana Stanimirovića**

*Ovaj rad, posvećujem „bebi“ Sari i mojoj dragoj porodici na pomoći
i podršci.*

Zahvalnica

*Veliku i posebnu zahvalnost dugujem **prof. dr Zoranu Stanimiroviću**, na svim prijateljskim savetima, razumevanju, stručnim, pedagoškim sugestijama, kao i na profesionalnim zalaganjem tokom naučno - istraživačkog rada i ličnomprofesionalnom razvoju. Hvala na velikom strpljenju i neizmernoj podršci.*

*Ovom prilikom zahvaljujem mentorki **prof. dr Jevrosimi Stevanović** na uloženom vremenu, sugestijama, smernicama, strpljenju i nesebičnoj stručnoj pomoći koje su doprinele da ovaj rad bude još kvalitetniji i praktičnom radu u laboratoriji i mentoru **dr Aleksandru Stanojkoviću**. Veliko hvala na kosrisnim sugestijama.*

Zahvaljujem se svim kolegama i članovima komisije koji su učestvovali i pomogli u izradi doktorske disertacije kao i pčelarskim udruženjima Republike Srbije.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	6
2.1. Pčelarstvo u Srbiji i njen udeo u stočarskoj proizvodnji	6
2.2. Bolesti pčelinjeg legla	8
2.2.1. Američka kuga pčelinjeg legla	8
2.2.2. Evropska kuga pčelinjeg legla.....	15
2.2.3. Bolest krečnog legla	19
2.2.4. Virus mešinastog legla.....	24
2.3. BOLESTI ODRASLIH PČELA.....	25
2.3.1. Virus akutne paralize pčela.....	26
2.3.2. Virus hronične paralize pčela	27
2.3.3. Virus deformisanih krila.....	30
2.3.4. Nozemoza.....	31
2.3.5. Infekcije izazvane tripanozomama	35
2.4. OKSIDATIVNI STRES	38
2.5. SOCIJALNI IMUNITET PČELA	42
3. CILJ I ZADACI RADA	46
4. MATERIJAL I METODE	47
4.1. Uzorkovanje materijala	47
4.2. Detekcija i determinacija vrste mikrospodidija roda <i>Nosema</i>	49
4.2.1. Priprema uzoraka za ekstrakciju RNK i DNK.....	49
4.3. Real time PCR amplifikacija pčelinjih virusa	50
4.4. Real time PCR amplifikacija evropske kuge pčelinjeg legla	52
4.5. Kultivacija bakterija <i>Paenibacillus larvae</i>	52

4.6. Liza spora bakterija <i>Paenibacillus larvae</i>	52
4.7. Kultivacija bakterija <i>Melissococcus plutonius</i>	53
4.8. Kultivacija gljivice <i>Ascospaera apis</i>	53
4.9. PCR amplifikacija DNK <i>Paenibacillus larvae</i>	53
4.10. PCR amplifikacija DNK <i>Ascospaera apis</i>	54
4.11. PCR amplifikacija DNK <i>Lotmaria passim</i> i <i>Crithidia mellificae</i>	54
4.12. Priprema uzorka za spektrofotometriju	55
4.13. Parametri oksidativnog stresa.....	55
4.14. Određivanje iRNK za ekspresiju gena enzima glokoko oksidaze	56
4.15. Statistička obrada podataka.....	56
5. REZULTATI	57
5.1. Rezultati ankete	57
5.2. Rezultati kliničkog pregleda.....	60
5.3. Komparativni prikaz zastupljenosti pčelinjih patogena u leglu i na odraslim pčela kod tradicionalno i komercijalno gajenim pčelinjim zajednicama	62
5.4. Parametri oksidativnog stresa.....	69
5.5. Relativna ekspresija GOX gena za socijalni imunitet pčela.....	71
6. DISKUSIJA	73
7. ZAKLJUČCI	81
8. LITERATURA	83
9. BIOGRAFIJA AUTORA	114
10. PRILOZI DOKTORSKE DISERTACIJE.....	115

**KOMPARATIVNO ISPITIVANJE PRISUSTVA UZROČNIKA I BOLESTI
PČELINJEG LEGLA TRADICIONALNO I SAVREMENO GAJENIH
PČELINJIH DRUŠTAVA UZ ANALIZU UTICAJA NEKIH
BIOLOŠKIH I ANTROPOGENIH FAKTORA**

REZIME

Štetočine i patogeni predstavljaju najčešće uzroke gubitaka pčelinjih društva. Američka trulež (AFB) je bolest pčelinjeg legla, uzrokovana bakterijom *Paenibacillus larvae*, White (1906), može se smatrati glavnom pretnjom po zdravlje pčela, s obzirom da je reč o panzootskoj bolesti koja se vrlo brzo širi, ne samo iz košnice u košnicu, sa pčelinjaka na pčelinjak iz regije u regiju, već i iz države u državu i šire. Evropska trulež je bakterijska bolest pčelinjeg legla uzrokovana sa više bakterijskih vrsta gde dominira *Melissococcus plutonius*. Ova bolest je jako raširena i predstavlja veliki problem u pčelarstvu smanjujući proizvodne rezultate pčelinjih zajednica. Krečno leglo (CHB) je infekcija izazvana gljivicom *Ascosphaera apis* izazivajući gubitke komercijalno gajenih pčelinjih zajednica, naročito u kombinaciji sa vrstama mikrosporidija roda *Nosema* i virusom mešinastog legla. Nozemoza je najčešća bolest među odraslim pčelama uzrokovana mikrosporidijama *Nosema apis* i *N. ceranae* i često dovodi do ekonomskih gubitaka u pčelarstvu. Virusne infekcije pčela, koje su već odavno dostigle razmere panzootije, ugrožavaju zdravlje pčela i predstavljaju konačne egzekutore pčelinjih zajednica. Pčelinji krpelj *Varroa destructor* je glavni vektor skoro svih, a naročito virusnih infekcija pčela, koje su postale ozbiljan problem ne samo za komercijalno gajene, već i za pčelinje zajednice u divljini, zahvaljujući upravo krpelju *V. destructor* kao fizičkom i biološkom vektoru. Na osnovu svega navedenog jasno je da je zdravstveno stanje društava u komercijalnom pčelarstvu izloženo velikim rizicima, a njihovo ispitivanje i tretman predstavljaju veliki izazov kako za istraživače tako i za pčelare.

Bolesti odraslih pčela i pčelinjeg legla u komercijalnom pčelarstvu najčešće su posledica energetskog stresa, nastalog zbog neadekvatne prihrane pčelinjih zajednica, prvenstveno prevelikom upotrebom sećernog sirupa. U osnovi energetskog stresa je oksidativni stres pčelinjih zajednica koji se može definisati kao disbalans između

proizvodnje reaktivnih oblika kiseonika i antioksidativne odbrane. Reaktivni oblici kiseonika (ROS) negativno utiču na ćelijske funkcije i stvaraju se tokom oksidoredukcionih metaboličkih procesa u ćeliji. Oni su uključeni u regulaciju različitih mehanizama, intercelularne signalizacije, a imaju i baktericidno dejstvo.

Medonosne pčele, kao i ostale životinje, razvile su niz enzimskih mehanizama kojima se odupiru oksidativnom stresu, uklanjajući slobodne radikale. U ovim procesima važnu ulogu imaju: superoksid dismutaza (SOD), enzim prisutan u citosolu i mitohondrijama; katalaza (CAT) prisutna u peroksizomima glutation S-transferaza (GST), glutation S transferaza (GST), peroksidaza i tireodoksin/tireoreduktazni sistem. Imunitet pčela, kao i imunitet u opšte, obuhvata kompleksan sistem koji ima cilj da obezbedi očuvanje zdravlja kao i opstanak organizma na osnovu mnogih mehanizama odbrane od patogena i drugih štetnih noksi (fizičkih i hemijskih). Medonosna pčela svoj socijalni imunitet ostvaruje uz pomoć bihevioralnih mehanizama koji pomažu zajednici u odbrani od patogena. Ulaganje u individualni imunitet ima visoku materijalno-energetsku cenu za društvo, pa su udruživanjem pčela (razvoj socijalnog ustrojstva) uspostavljeni zajednički socijalni mehanizmi odbrane koji omogućavaju pčelinjem društvu efikasniju i ekonomičniju borbu protiv agenasa spoljašnje sredine. Za socijalni imunitet pčela od značaja je enzim glukoza oksidazi (GOX). Ovaj enzim je produkt pčelinjih egzokrinih žlezda, a uloga mu je u „konzervaciji“ pčelinjih proizvoda, meda i perge, tako sprečavajući njihovo kvarenje. GOX učestvuje u procesu katalize β -D glukoze do glukonske kiseline i vodonik-peroksida. Vodonik-peroksid ima antiseptička svojstva, tako doprinoseći dodatnoj zaštiti i socijalnom imunitetu pčela.

Cilj istraživanja je bio da se utvrdi: da li između tradicionalno i savremeno gajenih pčelinjih društava postoje razlike u pogledu prisustva patogena i pojave bolesti pčelinjeg legla, uz analizu bioloških (ekspresija GOX gena i faktora oksidativnog stresa) i antropogenih faktora (menadžment u pčelarstvu) na pojavu praćenih bolesti pčelinjeg legla i odraslih pčela.

Terenski deo istraživanja je obavljen na prostoru Pešterske visoravni (opština Sjenica, Srbija) na 144 asimptomatske pčelinje zajednice. Uzorci odraslih pčela i pčelinjeg legla su uzeti iz savremenih (DB) košnica i tradicionalnih košnica „trmki“, kako bi se utvrdila zastupljenost patogena legla (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Ascospheera apis*, virus mešinastog legla, tripanozoma *Lotmaria passim* i

Crithidia mellificae) i odraslih pčela (virus akutne paralize pčela, virus hronične paralize pčela, virus deformisanih krila pčela, tripanozoma *Lotmaria passim* i *Crithidia mellificae*, mikrosporidija *Nosema apis* i *Nosema ceranae*) kao i za utvrđivanje nivoa oksidativnog stresa analizom aktivnosti enzima: SOD, CAT, GST i koncentracije malondialdehida (MDA). Takođe, iz istih košnica uzeti su uzorci za procenu ekspresije GOX gena kao parametra socijalnog imuniteta.

Detekcija patogena je obavljena izolacijom bakterija kao i upotrebom PCR i real-time PCR, u skladu sa standardima OIE. Rezultati istraživanja su pokazali da je među komercijalno gajenim društvima *P. larvae* bio zastupljen u 16,67% uzoraka, *A. apis* bio prisutan u 15,83% uzorka, dok je SBV detektovan u 96,67% uzoraka. Međutim u leglu pčela gajenih u tradicionalnim trmka košnicama nađen je samo SBV u 33,33% uzoraka. Dalja istraživanja su utvrdila da su kod odraslih pčela u komercijalno gajnim društvima bili signifikantno ($p < 0,001$) više zastupljeni virusi: ABPV, CBPV i DWV (83,33%, 100,00%, 100,00%, istim redom) u odnosu na društva iz trmki gde je procenat ovih virusa iznosio 33,33% za svaki virus. Takođe, sva komercijalno gajena društva bila su inficirana makar jednim od praćenih patogena, za razliku od tradicionalno gajenih pčela u trmkama među kojima je 66,66% bilo bez patogena.

Rezultati su otkrili značajne razlike u aktivnosti CAT, GST i SOD ($p < 0,01$) i koncentracije MDA ($p < 0,002$) između komercijalnih i tradicionalnih društava što vodi zaključku da u društvima gajenim u trmkama postoji manji oksidativni stres što je rezultiralo i manjom zastupljenošću svih praćenih patogena. U uzorcima komercijalno gajenih pčela zastupljenost parazita *L. passim* i *N. ceranae* bila je značajno veća ($p < 0,05$; $p < 0,01$, respektivno) u odnosu na uzorke iz tradicionalnih košnica, dok *C. mellificae* i *N. apis* nisu detektovane ni u jednom uzorku. Treba istaći, da je prvi put detektovana tripanozoma *L. passim* u leglu iz obe grupe ispitivanih košnica, komercijalnih i tradicionalnih, pri čemu je njena zastupljenost u leglu značajno manja ($p < 0,01$) nego u odraslim pčelama u komercijalnim društvima, dok se kod tradicionalno gajenih pčela zastupljenost ove tripanozome između odraslih pčela i legla nije značajno razlikovala. Kod komercijalno gajenih pčela utvrđen je značajno veći nivo iRNK za gen GOX ($p < 0,01$) u odnosu na tradicionalno gajena društva, što je verovatno posledica pojačane potrebe prvopomenutih da ojačaju socijalni imunitet.

Komercijalna društva su u odnosu na tradicionalno gajena bila pod većim oksidativnim stresom, a imala su i veću opterećenost pčelinjim patogenima, kao i veći nivo transkripcije GOX gena, što je verovatno posledica čestih pčelarskih manipulacija i uznemiravanja komercijalnim društvima, kao i njihovo forsirano ekonomsko iskorišćavanje. Sve to vodi zaključku da populacija pčela koja se uzgaja na tradicionalan ima veći kapacitet samoodržanja i otpornija na pčelinje patogene, energetske (i oksidativni) stres, a da antropogeni faktori, odnosno pčelarski postupci, imaju negativan uticaj na zdravlje komercijalno gajenih pčela.

Ključne reči: *Apis mellifera*, bolesti legla medonosne pčele, bolesti odraslih pčela, parametri oksidativnog stresa (SOD, CAT, GST, MDA), komercijalno pčelarenje, tradicionalno pčelarenje, trmke, Pešterska visoravan, PCR, real-time RT-PCR, ekspresija GOX gena, socijalni imunitet.

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Stočarstvo, Veterinarska genetika, Biotehnologija, Bolesti pčela, Molekularno – genetička dijagnostika, Parazitske bolesti.

UDK broj: 636.09:576.8:638.153

THE PRESENCE OF CAUSATIVE AGENTS AND DISEASES OF BEE BROOD IN TRADITIONAL AND MODERN BEEKEEPING, AND THE EXAMINATION OF VARIOUS BIOLOGICAL AND ATHROPOGENIC FACTORS

Summary

Pests and pathogens are the most common causes of honey bee colony losses. American foulbrood (AFB) is a disease of honey bee brood, caused by the bacterium *Paenibacillus larvae*, White (1906), can be considered a major threat to bee health, as it is a panzootic disease that spreads very quickly, not only from hive to hive, from apiary to apiary, from region to region, but also from the state to the state and beyond. European foulbrood is a bacterial disease of honey bee brood caused by several bacterial species dominated by *Melissococcus plutonius*. This disease is widespread and poses a major problem in beekeeping by reducing the production results of honey bee colonies. Chalkbrood disease (CHB) is an infection caused by the fungus *Ascosphaera apis* causing losses of commercially reared bee colonies, especially in combination with microsporidia species of the genus *Nosema* sp. and a Sacbrood virus (SBV). Nosemosis is the most common disease among adult bees caused by *Nosema apis* and *N. ceranae*, and often leads to economic losses in beekeeping. Viral infections of bees, which have long since reached panzootic proportions, endanger the health of bees and present ultimate executors of bee colonies. *Varroa destructor* mite is the main vector of almost all, especially viral infections, which have become a serious problem not only for commercially reared, but also for honey bees in the wild, thanks to the mite *V. destructor* as a physical and biological vector. It is clear that the health status of colonies in commercial beekeeping is exposed to great risks, and their examination and treatment represent a great challenge for both researchers and beekeepers.

Diseases of adult bees and bee brood in commercial beekeeping are most often a consequence of energetic stress, caused by inadequate feeding of bee colonies, primarily by excessive use of sugar syrup. The basis of energetic stress is oxidative stress of bee colonies, which can be defined as an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the former. Reactive oxygen species (ROS) negatively affect cellular functions and are generated during oxido-reduction metabolic processes in the cell. They are

involved in the regulation of various mechanisms, intercellular signaling, and exert bactericidal activity.

Honey bees, like other animals, have developed a number of enzymatic mechanisms that resist oxidative stress, removing free radicals. An important role in these processes is played by: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) in peroxisomes, ascorbate peroxidase, glutathione S transferase (GST) peroxidase, and the thyroxine / thyroreductase system. Immunity of bees, as well as immunity in general, includes a complex system that aims to ensure the preservation of health and survival of the organism based on many defense mechanisms against pathogens and other harmful noxa (physical and chemical). The honey bee achieves its social immunity with the help of behavioral mechanisms that help the community defend itself against pathogens. Investing in individual immunity has a high material and energy price for society, so the association of bees (development of social structure) established joint social defense mechanisms that enable bee society to fight more efficiently and economically against environmental agents. The enzyme glucose oxidase (GOX) is important for the social immunity of bees. This enzyme is a product of bee exocrine glands, and its role is in the "conservation" of bee products, honey and bee bread, thus preventing their spoilage. GOX participates in the process of catalysis of β -D glucose to gluconic acid and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide has antiseptic properties, thus contributing to additional protection and social immunity of bees.

The aim of the research was to determine: whether there are differences between traditional and modern bee colonies in terms of the presence of pathogens and the occurrence of bee brood diseases, with the analysis of biological (expression level of the GOX gene and oxidative stress factors) and anthropogenic factors (beekeeping management) on monitored bee brood and adult bee diseases. The field part of the research was performed in the area of the Peshterska plateau (Sjenica municipality, Serbia) on 144 asymptomatic bee communities. Samples of adult bees and bee brood were taken from modern (DB) hives and traditional "trmka" hives to determine the presence of brood pathogens (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Ascosphaera apis*, Sacbrood virus, trypanosomatids *Lotmaria passim* and *Crithidia mellifica*) and adult bees (acute bee paralysis virus, chronic bee paralysis virus, deformed bee wings

virus, trypanosomatids *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae*, microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae*) as well as for determination of oxidative stress levels by analysis of activity of enzymes: SOD, CAT, GST and concentration of malondialdehyde (MDA). From the same hives, samples were taken to estimate the expression the GOX gene as a parameter of social immunity. Pathogen detection was performed by bacterial isolation as well as using PCR and real-time PCR, in accordance with the OIE standards. The results showed that among commercially reared colonies, *P. larvae*, was represented in 16.67% of samples, *A. apis* in 15.83%, while SBV was detected in 96.67% of samples. However, in the brood from colonies raised in traditional hives, only SBV in the percentage of 33.33% of samples was found. Further research found that in adult bees from commercially reared colonies, viruses ABPV, CBPV and DWV (83.33%, 100.00%, 100.00%, respectively), were significantly ($p < 0.001$) more represented compared to adult bees from „trmka“ hives, where the percentage of these viruses was 33.33% for each. Also, all commercially reared colonies were infected with at least one of the monitored pathogens, in contrast to traditionally reared bees, of which 66.66% were pathogen-free.

The results revealed significant differences of activities of CAT, GST and SOD ($p < 0.01$) and MDA concentration ($p < 0.002$) between commercial and traditional colonies, which leads to the conclusion that colonies grown in „trmka“ hives had less oxidative stress level, which resulted in lower presence of all monitored pathogens.

In samples of bees from commercially bred colonies, the prevalence of parasites *L. passim* and *N. ceranae* was significantly higher ($p < 0.05$; $p < 0.01$, respectively) compared to samples from traditional hives, while *C. mellificae* and *N. apis* were not detected in any sample. It should be noted that *L. passim* was detected for the first time in a brood from both groups of examined hives, commercial and traditional, with its presence in the brood significantly lower ($p < 0.01$) than in adult bees in commercial colonies, while in traditionally reared bees, the presence of this trypanosome did not differ significantly between adult bees and brood. In commercially bred bees, a significantly higher level of mRNA for the GOX gene was found ($p < 0.01$) compared to traditionally bred colonies, which is probably a consequence of the increased need of the former to strengthen social immunity. Compared to traditional beekeeping,

commercial colonies were under greater oxidative stress, and had a higher load of bee pathogens as well as a higher level of transcription for the GOX gene, which is probably due to frequent beekeeping and harassment of commercial colonies, as well as their forced economic exploitation. All this leads to the conclusion that the population of bees raised in the traditional way is more self-sustaining and resistant to bee pathogens, energetic (and oxidative) stress, and that the anthropogenic factors (beekeeping practices) have a negative impact on the health of commercially reared bees.

Key words: *Apis mellifera*, honey bee brood diseases, adult bee diseases, oxidative stress parameters (SOD, CAT, GST, MDA), commercial beekeeping, traditional beekeeping, „trmka“ hive, Peshter Plateau, real-time RT-PCR, PCR, GOX gene expression, social immunity.

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Animal Breeding, Veterinary Genetics, Biotechnology, Honey Bee Diseases, Molecular Genetic Diagnostics, Parasitic Diseases.

UDC Number: 636.09:576.8:638.153

1. UVOD

Medonosna pčela predstavlja veoma važan segment u globalnom mehanizmu života na planeti Zemlji. Pored toga što proizvodi med, zauzima veoma važno mesto u ekosistemu, pre svega zbog uloge u oprašivanju mnogih useva, plodova i cveća. Pčele imaju veoma visok procenat učešća u oprašivanju biljaka koji se kreće oko 90% u komercijalnoj biljnoj proizvodnji. Prema tome, zdravlje pčela je od suštinskog značaja ne samo za pčelarstvo, već i za poljoprivredu i proizvodnju bezbedne hrane za ljude.

Medonosna pčela je rasprostranjena u svim delovima sveta, sa izuzetkom polarnih predela. Do 16. (šesnaestog)veka pčele su se nalazile na prostoru Starog sveta (prostor koji obuhvata od Mediterana, preko Bliskog istoka i Indije sve do istočne Azije i obala današnje Kine), gde su postojale pre nastanka modernog čoveka na planeti Zemlji. U početku je čovek dobijao med tako što je „pljačkao“ pčelinja gnezda u šupljinama drveća. Iz perioda mezolita postoji zapis u planinama istočne Španije koji govori o ranom sakupljanju meda. Čovek i medonosna pčela kroz istoriju imaju dugogodišnje „poznanstvo“. Hemijskom analizom keramičke posude stare oko 9000 godina u Anadoliji (Mala Azija, Turska) utvrđeno je prisustvo pčelinjeg voska. Ovaj neolitski dokaz ne potvrđuje da su u ovom periodu ljudi započeli pčelarenje, jer se pčelinji vosak sakupljao tokom „lova“ na med i to pre upotrebe keramike. Iz antičkog doba (od 3000. p.n.e do 51. godine n.e) postoje najstariji dokazi o boravku pčela u šupljinama, kao i razvoj pčelarstva. Saznanja o načinima drevnog pčelarenja poznato je na osnovu zapisa Aristotela i drugih drevnih filozofa. Knjige o pčelarstvu su pisane tokom 19. (devetnastog) veka, ali je sadržaj bio fokusiran na zapadnjačko pčelarenje, sa opisom košnica od slame kao najprimitivnijih „košnica“ za pčelarenje. Virgil's Georgics oko 1460. godine opisuje smeštaj za pčele u slamnim košnicama, sa niskim postoljem i kosim krovom kako bi se zaštitile od kiše i snega. Ovako izgrađene košnice bile su osetljive na vremenske uslove pa su oblepljivane blatom, a potom se sušile (Slika 1).



Slika 1. Plutarijusov opis košnice

<http://visualiseur.bnf.fr/ConsulterElementNum?O=IFN-08101685&E=JPEG&Deb=208&Fin=208&Param=C>

Mnoge religije i kulture u svojim svetim spisima pominju pčelu i njene proizvode korisnim i neizostavnim za ljudsko biće. U judaizmu, med je bio simbol Nove godine. Pri tradicionalnom obroku za doček se kriške jabuke umoče u med i to predstavlja sladak početak Nove godine. Mnogi insekti i njihovi proizvodi se smatraju nečistim, ali pčela i med su za njih košer (heb. Kashrus- odgovarajući, ispravan) čisti, božanski, sveti. Stari zavet u više navrata pominje med kao simbol zadovoljstva i uživanja. U Bibliji, pčela je čuvar znanja o Tvorcu i živa poruka upućena čoveku. Za razliku od biblijskih jevanđelja koja su pisana ljudskom rukom, a vođena Božjim Duhom, pčela je jevanđelje koje je lično Bog u praiskonu izgovorio (1. Mojsijeva 1,24.25) i upisao u materiju genetičkim pismom. Reč med se u Bibliji pojavljuje 61 put! U Kur'anu objavljena je mekkanska sura En-Nahl (Pčela) koja nabroja blagodeti ... "Pravi sebi kuće u brdima i u dubovima i u onome što naprave ljudi, zatim, hrani se svakovrsnim plodovima, pa onda idi stazama Gospodara svoga, poslušno!" Iz utroba njihovih izlazi piće različitih boja koje je lek ljudima. To je, uistinu, dokaz za ljude koji razmišljaju.“ En-Nahl, 68-69. U budizmu (Indija i Bangladeš) prilikom slavlja koriste med u svojim tradicionalnim ceremonijama. U danima kad se slavi Buda, njegovi sledbenici odlaze u prirodu gde su, po predanju, majmuni hranili Budu medom. U Rimskom carstvu je med bio korišćen kao sredstvo za plaćanje poreza i bio je zamena za zlato. Slično je bilo i u Starom Egiptu gde je stotinu ćupova meda bilo ekvivalent jednom volu ili magarcu. Reč med i varijecije na nju su u savremenoj civilizaciji postali uobičajeni za tepanje i kao reči kojim se obraća voljenim bićima.

Pčelarstvo je započeto kada je čovek naučio da štiti pčelinja društva koja je pronašao u šupljinama drveća ili na nekim drugim mestima. Postepeno, počeo je da pravi košnice koje su se koristile kao zamena prirodnom staništu, jer su postale sigurnije i lakše za manipulaciju. Današnje savremene košnice nisu imale zajedničko poreklo. Razvoj košnica zavisio je od okruženja tj. dostupnog materijala. U Evropi najstarije košnice su nastale odrezivanjem ostatka stabla drveta. Na prostoru Bliskog Istoka, koji je bio sa oskudnim biljnim pokrivačem, bez šuma i mnogo drveća, prve košnice su formirane u pukotinama zemlje, a kasnije, u neolitu, počela je da se koristi keramika. U drevnom Egiptu u tu svrhu korišćene su duge cevi napravljene od gline i drugog materijala.

Pletene košnice, pletare, nastale su kasnije i pravljene su od različitog materijala, međutim, nisu se razlikovale mnogo od prvobitnih pletara pravljenih između 3000 i 2000 p.n.e., koje su pronađene na prostoru Egipta. Kod starih Južnih Slovena u 16. veku postojale su primitivne košnice - trmke koje su pletene od pruća, loze i šiblja, oblepljivane malterom od ilovače i pepela, a neki su toj mešavini dodavali govedu balegu i plevu od slame. Za to vreme može se reći da čovek nije ometao rad pčele, već je na „prirodan“ način koristio. Postepeno je uticao na pčele iz prirode i privukao ih bliže sebi formirajući objekte slične prirodnom staništu i na taj način omogućio njihov normalan rad. Vremenom, pčele su komercijalizovane i “forsirane” na intenzivan rad u cilju dobijanja većih količina pčelinjih proizvoda, pri čemu se manje više vodilo računa o posledicama. Divlje pčele čine ključnu komponentu ekosistema i igraju važnu funkcionalnu ulogu polinatora. Gubitak staništa i intenzivna poljoprivredna proizvodnja predstavljaju dva glavna faktora koji utiču na brojnost divljih pčela. Globalno opadanje brojnosti pčela, kako komercijalno gajanih tako i divljih, dovodi se u vezu sa patogenima, klimatskim promenama, promenom staništa kao i upotrebom pesticida. Divlje pčele imaju važnu ulogu u polinaciji, jer komercijalno gajena pčelinja društava ne mogu u potpunosti zameniti doprinos divljih pčela u oprašivanju useva. Medonosna pčela je vrlo ekonomičan i važan insekt u ekosistemu. Svetska proizvodnja meda u 2016. godini iznosila je 1,78 miliona tona, a Sjedinjenim Američkim Državama 2016. godine obezbedila je prihod od 343,03 miliona dolara. Današnja intenzivna poljoprivreda zasniva se na 115 glavnih prehrambenih proizvoda od kojih su 52 direktno zavisna od oprašivanja koje vrše pčele. Pored oplodjenja biljaka pčele utiču i na

kvalitet, veličinu i količinu ploda. Iako oprašivanje biljaka ne zavisi samo od polinatora, niti je medonosna pčela najefikasniji oprašivač za većinu useva, ona spada u najvažnije polinatore monokultura širom sveta. Ukupan broj pčelinjih zajednica u svetu znatno je povećan, ali nisu svi regioni doživeli istu sudbinu. Na primer, zabeležen je pad pčelinjih društava u Evropi za 26,5% i Severnoj Americi za 49,5%, dok je broj društava znatno povećan na prostoru Azije, za čak, 426%, Afrike, 130% i Okeanije, 39%, (FAO, 2009). Populacija medonosne pčele izložena je značajnim gubicima u Evropi i Severnoj Americi. Formiranjem savremenih košnica pčelari su se rešili nekih problema i olakšali sakupljanje meda i drugih pčelinjih proizvoda, ali su savremenim apitehničkim postupcima, ipak, uzrokovali dodatni stres koji ozbiljno ugrožava zdravlje pčela. U proteklih nekoliko decenija „prirodni“ otvoreni prostor brzo nestaje, zamenjuje ga zemljište za upotrebu u poljoprivredi i građevinarstvu. Ovaj pad otvorenog prostora u kombinaciji sa drugim procesima negativno utiču na ekosistem i životnu sredinu. Zbog kompeticije za hranom (nektarom i polenom) i smanjenim prostorom u prirodi neminovno dolazi do bliskog kontakta između divljih pčela i onih koje uzgaja čovek. Na taj način se divlja društva izlažu riziku da u svoju zajednicu unesu „nove“ uzročnike koji se već nalaze u društvima koja su pod kontrolom čoveka.

Mnogi faktori (patogeni, klima, ishrana, apitehnika i menadžment) utiču na brojnost i zdravstveno stanje pčela u svetu, ali nijedan pojedinačan faktor ne može biti odgovoran za sve gubitke. Istovremeno, može se pojaviti veći broj faktora koji mogu simultano uticati jedni na druge, ali i na pčele. Inficirana društva različitim patogenima i postojanje različitih interakcija između košnica i pčelinjaka uz prisustvo još dodatnih ekoloških stresora, mnogi stručnjaci iz oblasti pčelarstva smatraju bitnim razlozima velikih gubitaka pčelinjih zajednica i nestajanja pčela. Pčelar i apitehničke mere koje primenjuje, odnosno celokupni pčelarski menadžment, mogu se smatrati značajnim faktorom koji utiče na život pčela, njihovu kondiciju i zdravstveno stanje, kao i na kontrolu i širenju patogena. Štetočine i patogeni predstavljaju važane uzroke gubitaka društva. Američka trulež (AFB) je bolest pčelinjeg legla, uzrokovana bakterijom *P. larvae*, White (1906), može se smatrati glavnom pretnjom po zdravlje pčela, s obzirom da je reč o panzootskoj bolesti koja se vrlo brzo širi, ne samo iz košnice u košnicu, sa pčelinjaka na pčelinjak iz regije u regiju, već i iz države u državu i šire. Evropska trulež je bakterijska bolest pčelinjeg legla uzrokovana sa više bakterijskih vrsta gde dominira

M. plutonius. Ova bolest je jako raširena i predstavlja veliki problem u pčelarstvu smanjujući proizvodne rezultate pčelinjih zajednica. Krečno leglo (CHB) je infekcija izazvana gljivicom *A. apis* izazivajući gubitke komercijalno gajenih pčelinjih zajednica, naročito u kombinaciji sa vrstama mikrosporidija roda *Nosema sp.* i virusom mešinastog legla. Nozemoza je najčešća bolest među odraslim pčelama uzrokovana mikrosporidijima vrsta *N. apis* i *N. ceranae*, koja dovodi do ekonomskih gubitaka u pčelarstvu, s obzirom da inficirane pčele imaju smanjen životni vek, povećanu smrtnost i redukovane proizvodne i reproduktivne performanse društva. Virusne infekcije pčela, koje su već odavno dostigle razmere panzootije, ugrožavaju zdravlje pčela i nanose ekonomske štete koje se ogledaju u smanjenom broju pčelinjih zajednica, padu njihove jačine i smanjenju njihovih proizvodnih sposobnosti. Pčelinji krpelj *Varroa destructor* je glavni vektor skoro svih, a naročito virusnih infekcija pčela, koje su postale ozbiljan problem ne samo za komercijalno gajene, već i za pčelinje zajednice u divljini, zahvaljujući upravo krpelju *V. destructor* kao fizičkom i biološkom vektoru. Na osnovu svega navedenog jasno je da je zdravstveno stanje društava u komercijalnom pčelarstvu izloženo velikim rizicima, a njihovo ispitivanje i tretman predstavljaju veliki izazov kako za istraživače tako i za pčelare praktičare. Postoje oskudni literaturni podaci o prisustvu bolesti legla i odraslih pčela u društvima sa tradicionalnim načinom pčelarenja. Populacije divljih pčela imaju uravnotežen odnos sa uzročnicima bolesti, samim tim i povećan potencijal opstanka u odnosu na odbegle komercijalne rojeve. Možemo pretpostaviti da pojava bolesti kod tradicionalno gajenih pčela u trnkama je mala ili nije dovoljno istražena u odnosu na komercijalno gajena društva.

2. PREGLED LITERATURE

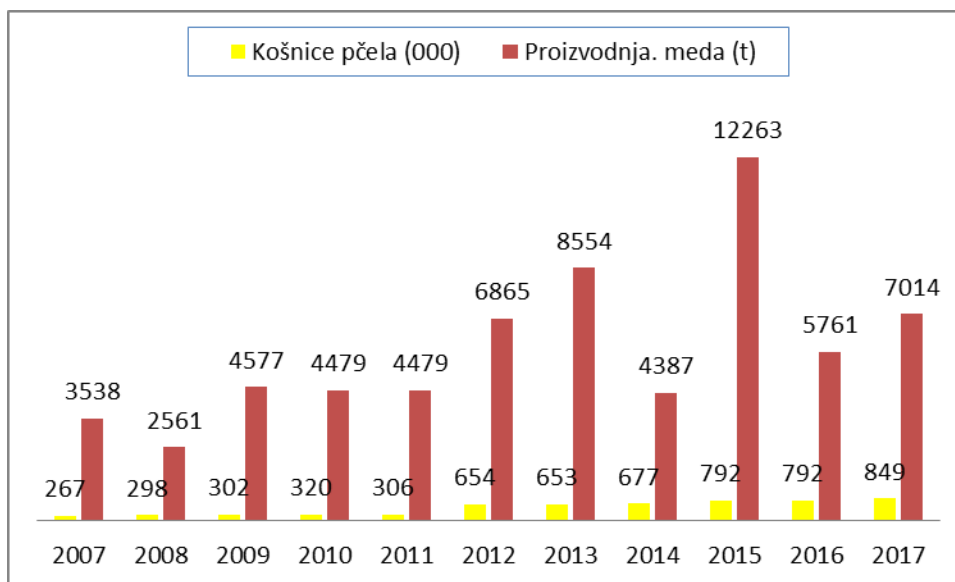
2.1. Pčelarstvo u Srbiji i njen udeo u stočarskoj proizvodnji

Republika Srbija je 2004. godine usvojila mere podsticaja razvoja u oblasti pčelarstva kao dela stočarske proizvodnje i po prvi put se pčelarstvo izjednačava sa drugim granama stočarstva. Ovo potvrđuje i Zakon o stočarstvu (Sl. glasnik RS, br. 41/2009, 93/2012 i 14/2016) čije se odredbe odnose na: *bivole; ovce; koze; konje; magarce; svinje; živinu; krznašice; kuniće; pčele; gajenu divljač; ribe* i druge vodene organizme, kao i druge životinje koje mogu da se gaje. Zakon o stočarstvu takođe uređuje i *gajenje pčela*.

Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku u Srbiji ima oko milion pčelinjih zajednica koje se nalazeu posedu oko 31 hiljade poljoprivrednih gazdinstava - pčelara. Oko 9.000 pčelara organizovano je u 218 lokalnih udruženja, koja su registrovana u jedinstveni Savez pčelarskih organizacija Srbije (SPOS) (Statistički godišnjak, 2019). Food and Agriculture Organization (FAO, 2009) navodi da je broj košnica tokom poslednjih 50 godina u svetu porastao za oko 45%, što se može dovesti u vezu sa razvojem ekonomske globalizacije (Aizen i sar, 2009). Međutim došlo je do pada broja pčelinjih društava u Evropi i to za 26,5% i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) 49,5% (National Research Council, 2006) dok se nasuprot tome u Aziji broj košnica povećao za čak 426%, Africi za 130% i u Okeaniji za 39% (FAO, 2009). Broj košnica u Evropi i SAD bi trebalo da se poveća za oko 45%, da bi dostigao proizvodnju pčelinjih proizvoda iz drugih delova sveta. Treba naglasiti da FAO daje procenu trenutnog broja košnica, često bez evidencije o gubicima pčelinjih društava, pa treba biti veoma obazriv u tumačenju njihovih podataka (Potts i sar., 2010).

Glavni pčelarski proizvod u Srbiji je med, dok je proizvodnja polena, propolisa i perge minimalna. Uzimajući u obzir agroekološke uslove, postoje izuzeci kao što je područje Srema, gde su pčelari zbog široko rasprostranjene distribucije pelina (*Artemisia absinthium*) orijentisani na sakupljanje cvetnog praha. Ukupna godišnja proizvodnja polena iznosi 10 tona (t) gde se veći deo iskorišćava za proizvodnju polenskih pogača ili za mešanje sa medom, matičnim mlečom i propolisom za

spravljanje raznih smeša. Godišnja proizvodnja meda u Srbiji je u porastu, tako je 2001. godine je iznosila 2667 t, a 2017. godine 7014 t. Povećana proizvodnja meda (**Grafikon 1**), takođe, je bila proporcionalna broju košnica (Statistički godišnjak, 2002, 2018)



Grafikon 1. Broj košnica i proizvodnja meda u Srbiji u periodu od 2007. do 2017. godine

Prosečna proizvodnja meda u Srbiji po košnici u periodu od 2004. do 2014. godine bila je od 12, 8 kg. Treba imati u vidu da postoji veliki broj pčelara koji nisu registrovani, tako da je proizvodnja meda kao i broj košnica zapravo veći (Ivanović i sar., 2015). Prema mogućnostima korišćenja važnih paša, u Srbiji se razlikuju dva područja: područje Vojvodine, gde se koriste paše uljane repice, lipe i suncokreta i područje Srbije južno od Dunava, gde je izražena bagremova i livadska paša.

Centralna Srbija u ukupnoj proizvodnji meda učestvuje sa udelom od 89%, a Vojvodina sa 11%. Potrošnja meda u Srbiji je i dalje mala, tako da po glavi stanovnika u 2004. godini (FAO, 2004) iznosi prosečno 0,37 kilograma (kg) godišnje, dok u Centralnoafričkoj Reublici potrošnja meda iznosi 3,3 kg, Novi Zeland 2,5 kg, Angola, Austrija i Grčka 1,6 kg (Munčan i Božić, 2007).

S obzirom da su prirodni uslovi za pčelarenje povoljni, moguć je razvoj pčelarske industrije uz povećanje broja pčelinjih drustava do 800.000, a to znači da je trenutna iskorišćenost kapaciteta prirodnih resursa oko 33,4% (Marinković i Nedić,

2010). Zbog mera koje Vlada Republike Srbije sprovodi od 2004. godine i povećanja tržišta sve veći broj ljudi je zainteresovan da se bavi pčelarstvom, tako da se očekuje pozitivan trend rasta broja košnica u Srbiji. Med je u perspektivi velika izvozna šansa Srbije, jer je cela zemlja pogodna za razvoj pčelarstva. Glavna dobrobit u ovoj privrednoj grani nije samo proizvodnja meda, već i oprašivanje biljnih kultura gde sa pravilnom manipulacijom pčelinjih društava u oprašivanju, uz ostale mere, prinos u biljnoj proizvodnji može povećavati od 60 % do čak 100 %.

2.2. Bolesti pčelinjeg legla

Zdravo i kvalitetno pčelinje leglo je glavni preduslov za formiranje zdravih pčelinjih društava. Leglo treba da omogući dovoljan broj mladih i zdravih radilica koje će obavljati različite poslove unutar, ali i van košnice. Međutim, u leglu pored hrane nalazi se i reproduktivni materijal matice (jaja, larve, lutke) koji je potreban za razvoj novih matice, trutova i radilica, a koji je podložan različitim bolestima uzrokovanim od strane različitih etioloških agenasa kao što su: virusi, bakterije, gljivice i paraziti (Genersch, 2010a; Forsgren, 2010). Dve ekonomski najznačajnij bakterijske bolesti koje napadaju pčelinje leglo jesu: američka i evropska kuga pčelinjeg legla (Forsgren, 2010a). Osim bakterijskih bolesti često je u našim krajevima prisutna i invazivno - destruktivna gljiva *Ascosphaera apis* koja izaziva bolest krečnog legla , odnosno lokalizovane promene na pčelinjem leglu (Spiltoir, 1955; Spiltoir i Olive, 1955), kao i manje virulentna kosmopolitska filamentozna gljiva iz roda *Aspergillus spp.*(Gilliam i sar., 1983; Lopes i sar., 2015). Priustvo pčelinje grinje, *Varroa destructor* čiji je razvoj vezan za pčelinje leglo, omogućuje transmisiju kako bakterijskih i gljivičnih, tako i virusnih infekcija, koje varoa kao aktivni biološki vektor, prenosi sa bolesne na zdrave pčelinje jedinke. Jedan od virusa koji napada pčelinje leglo jeste i virus mešinastog legla (SBV) (Tencheva i sar., 2004; Chen i sar., 2006b).

2.2.1. Američka kuga pčelinjeg legla

Američka kuga pčelinjeg legla (AFB) je vrlo kontagiozna zarazna bolest enzootskog ili epizootskog karaktera izazvana bakterijom *Paenibacillus larvae*. Bolest je smrtonosna za inficirane larve medonosne pčele *Apis mellifera* kao i za druge larve

vrste iz roda *Apis* i može biti fatalna po društvo, ako mere kontrole i preventive nisu pravilno sprovedene. Raširena je po celom svetu gde se uzgajaju pčele. Bolest je vrlo kontagiozna, a ljudskom aktivnošću dodatno se još brže širi i može dostići razmere panzootije (Morrissey i sar., 2015).

Etiologija. Uzročnik AFB je *Paenibacillus larvae*, gram pozitivna bakterija koja u zaraženim larvama može da proizvede više od milijardu spora . Bakterija je okruglog oblika, ali može biti i oblika pravog ili zakrivljenog štapića dužine od 1,5 do 6 μm i širine od 0,5 do 0,8 μm , dužine). U laboratorijskim uslovima na hranljivim podlogama formira pojedinačne kolonije, a ponekada se može naći i u filamentoznoj formi. Većina sojeva je pokretna. Pojava spora u in vitro uslovima je vrlo retka. Spore su elipsoidnog oblika sa centralnim do subterminalnim položajem što olakšava njihovo klijanje (Heyndrickx i sar., 1996). Spore su izuzetno otporne na hemijske agense. Radilice, trutovi i matice su takođe podložni infekciji, ali se to retko dešava u prirodnim uslovima. Osetljivost larvi na AFB se smanjuje sa povećanjem starosti (Woodrow, 1941). Srednja infektivna doza (LD_{50} = doza spora koja ubije 50% larvi) za pčelu starosti 24-28 h iznosi $8,49 \pm 1,49$ spora (Hansen i Brødsgaard, 1999). Inficirana larva obično uginu u roku od 3-12 dana (Genersch i sar., 2005; Rauch i sar., 2009). Razmena, odnosno trgovina saćem u kome je boravilo uginulo društvo predstavlja najčešći način širenja ove bolesti na pčelinja društva. Vosak kontaminiran sporama američke truleži, koji nije pravilno termički obrađen (120°C tokom 30 minuta pri pritisku od 1 bar), a koristi se za proizvodnju satnih osnova, može doprineti širenju bolesti. Pored toga, širenju bolesti pomaže i grabež, kao i uvođenje novih matice iz zaraženih društava. Rana detekcija AFB pomaže u sprečavanju daljeg širenja bolesti (OIE, 2016). Postoji rizik za infekciju AFB uzročnikom kod imunokompromitovane humane populacije (Rieg i sar., 2010). Bakterijski podtipovi su pokazali značajnu raznolikost unutar same vrste, tako da su opisana četiri različita genotipa (Ashiralieva i Genersch, 2006).

Klasifikacija *P. larvae*. Tokom 18. veka bolest pčelinjeg legla je opisana uz karakterističan neprijatan miris koji je poticao iz obolelih društava, a sam naziv „kuga“ predložio je Schirach 1769. godine. Više od jednog veka kasnije, naziv „kuga“ u literaturi je obuhvatila dve različite bolesti. Termin „kuga“ obuhvatao je dva različita etiopatološka entiteta (Dzierzon, 1882): (1) blaga, izlečiva bolest otvoreng legla-

verovatno današnja Evropska kuga, i (2) teška, neizlečiva bolest zatvorenog legla-zasigurno današnja američka kuga.

Bacillus alvei je izolovan 1885. godine iz obolelih larvi i identifikovan kao uzročnik američke truleži legla, još u vreme kada naziv „kuga“ nije bio poznat (Cheshire i Cheyne, 1885). Američki mikrobiolog, White uspeo je 1906. god. da izoluje i uzgaja nepoznatu bakteriju iz kašaste mase larvi. Na osnovu morfologije i štapićastog oblika, mogućnosti stvaranja endospore, tada nepoznati mikroorganizam je klasifikovan kao bakterija koja je prisutna kod obolelih i uginulih larvi pčela kao *Bacillus larvae* (White, 1906). Na interspecijskom nivou, *P. larvae* je klasifikovan na dve podvrste; *P. larvae subsp. larvae* i *P. larvae subsp. pulvifaciens* na osnovu fenotipskih i genotipskih razlika kao i na osnovu izazivanja različite kliničke slike i patoloških promena na inficiranim larvama. Analizom nekoliko tipova i referentnih sojeva obe vrste, otkriven je visok nivo molekularne sličnosti koji ne opravdavaju klasifikaciju u dve vrste (Genersch, 2010b). Ove dve opisane podvrste razlikuju se po sposobnosti da u bateriji biohemijskih testova proizvedu kiselinu iz salicina i manitola (Heyndrickx i sar., 1996) iako fermentacija salicina i manitola nije uvek konstantna karakteristika za sve sojeve *P. larvae* (Dobbelaere i sar., 2001). Konačno, na osnovu genske sekvence 16S rRNK dokazana je identičnost za oba tipa soja *P. l. larvae* i *P. l. pulvifaciens* (Kilwinski i sar., 2004). Najnovijom revizijom došlo je do prekvalifikacije podvrsta *P. l. larvae* i *P. l. pulvifaciens* u jednu vrstu *P. larvae* bez razlikovanja podvrsta (Genersch i sar., 2006).

Genotip i virulenca *P. larvae*. Zbog prilično česte reklasifikacije etiološkog agensa AFB, ovaj patogen se može naći u literaturi kao *Bacillus larvae* (White, 1906) sa bliskim rodnom *B. pulvifaciens* (Katznelson, 1950), kao dve odvojene vrste *P. larvae* i *P. pulvifaciens* (Ash i sar., 1993), kao dve podvrste *P. l. larvae* i *P. l. pulvifaciens* Heyndrickx i sar., 1996) i na kraju kao jedna vrsta *P. larvae* (Genersch i sar., 2006).

Korišćenjem ERIC-prajmera identifikovana su četiri genotipa ERIC I - IV. Prema staroj nomenklaturi nekadašnje podvrste *P. l. larvae* obuhvataju genotip ERIC I i ERIC II, a *P.l.pulvifaciens* su okarakterisane kao *P. larvae* genotipova ERIC III i ERIC IV. Epidemiološke studije su pokazale da ERIC I može biti često izolovan iz legla obolelog društva u Evropi i na Američkom kontinentu, dok je ERIC II prisutan samo u Evropi. Genotipovi ERIC III i IV nisu identifikovani na terenu u poslednjih nekoliko

godina, a za sada postoji nekoliko sojeva u kolekciji (Genersch i sar., 2006; Antúnez i sar., 2007; Lončarić i sar., 2009). Prema tome *P. larvae* ERIC I i ERIC II su dva praktično najznačajnija genotipa. Genotipovi se razlikuju i na osnovu fenotipa uključujući i virulenciju različitih stadijuma larve. Otkriveno je da genotipovi ERIC III i ERIC IV su visoko virulentni za larve, a manje virulentni na nivou društva i ne dovode do izbijanja bolesti. Nasuprot njima, genotipovi ERIC I i ERIC II dovode do klasičnog izbijanja bolesti i kliničke slike američke truleži. Ovo znači da samo mali deo larvi uginu posle pokrivanja ćelija što predstavlja karakterističnu kliničku sliku AFB (ropiness test - pojava duge rastegljive niti boje čokolade) kada je reč o genotipu ERIC I i II; dok kod genotipa ERIC III i IV većina larvi uginu pre zatvaranja satne ćelije, čime je omogućeno pčelama higijeničarkama da to lako osete i očiste uginulo leglo. Virulentnost u stadijumu larve je u negativnoj korelaciji sa virulentsnošću na nivou kolonije zbog higijenskog ponašanja kućnih pčela. Genotipovi ERIC III - IV predstavljaju takozvane „brze ubice“. Ukoliko se larve zaraze ERIC III - IV genotipovima za 6-7 dana uginu sve inficirane larve, dok je za genotip ERIC I potrebno 10-12 dana (Genersch i sar., 2005; Genersch i sar., 2006). To pokazuje da stopa uklanjanja inficiranih larvi od strane pčela radilica zavisi od progresije bolesti. Genotip ERIC II brže ubija inficirane larve (efikasnost uklanjanja oko 90%), dok larve koje su inficirane sa genotipom ERIC I uginjavaju sporije (efikasnost uklanjanja oko 60%). Inficirane larve uginjavaju pre nego što ćelije budu pokrivene od strane pčela koje borave u košnici (kućne pčele), smanjuje se prenos i razvoj bolesti u društvu, što predstavlja deo odbrane društva - socijalni imunitet. Prevalencija pojavljivanja genotipa ERIC II nije tačno utvrđena, jer je pogrešno dijagnostikovano kao *P. l. pulvifaciens* zbog pigmentisane kolonije i otežane rutinske dijagnostike, a prisustvo genotipova ERIC III i IV *P. larvae* (nekada *P. l. pulvifaciens*) je veoma retko i zabeležena su dva izveštaja koja potvrđuju njegovu izolaciju (Katznelson, 1950; Gilliam i Dunham, 1978).

Patogeneza. Larve su najpodložnije infekciji u periodu larvenog razvića od 12 do 36 h posle poleganja jaja. Infekcija nastaje tako što larve preko kontaminirane hrane unesu desetak spora koja predstavlja infektivnu dozu za razvoj AFB (Genersch i sar., 2005). Životni ciklus *P. larvae* u larvi može se podeliti u dve faze: na neinvazivnu i invazivnu (destruktivnu) fazu. Nakon što spore dospeju do creva larve one proklijavaju za oko 12 h od ingestije (Yue i sar., 2008). Vegetativni oblici *P. larvae* ulaze u epitel creva

pomoću fagocita, a primarno mesto klijanja spora jeste hemocel, tj. telesna duplja (Ball i Bailey, 1997). Međutim, upotreba fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) i analize specifične 16s rRNK *P. larvae*, pokazala je da vegetativni oblici prvo kolonizuju crevo i razmnožavaju se bez vidnog oštećenja integriteta epitela creva (Yue i sar., 2008). Tokom ove infektivne faze u ćeliji *P. larvae* aktiviraju se enzimi i postaje aktivan pentozno-fosfatni put, u koji je uključen metabolizam raznih ugljenih hidrata, a posebno monosaharida glukoze i fruktoze koji su važni za vegetativni rast bakterija (Neuendorf i sar., 2004). Peritrofička membrana, koja se nalazi u inficiranoj larvi ima ulogu da zadrži bakterije u lumenu creva, ali *P. larvae* ima sposobnost da perforira ovaj zaštitni omotač i da kolonizuje epitel u kasnoj fazi infekcije kada je abdomen larve ispunjen uzročnikom. Infekcija nastaje paracelularnim putem. Uzročnik prolazi kroz međućelijski prostor i dolazi do hemocela gde i boravi, a potom migrira i razmnožava se u paracelularni prostor. Jedna od karakteristika *P. larvae* jeste da luči veoma aktivne ekstracelularne proteaze za vreme infekcije, tokom *vegetativnog rasta bakterije* (Hrabák i Martínek, 2007). Sintetisane proteaze su odgovorne za nepravilno funkcionisanje epitelne barijere kao i za formiranje pukotina između ćelija - ćelija, ćelija – matriks (*-tight junction*). Ovakva oštećenja omogućavaju neometan prodor bakterije do hemocela i do razvoja karakteristične kliničke slike za američku trulež, a koja se ogleda u karakterističnom oštećenju larvi koja postaje braonkasta, polutečna i lepljiva. Oba procesa su od vitalnog značaja za *P. larvae*. U toku vegetacione faze uzročnik izbegava integumentum larve i na taj način omogućava da spore nakon sporulacije budu slobodne i dostupne za novog domaćina. Spore su veoma otporne u spoljnoj sredini podjednako na uticaj visokih i niskih temperatura i kao takve mogu biti infektivne i više od 35 godina. Spore ostaju infektivne i više od 35 godina, koje su veoma otporne i mogu da izdrže kako visoke tako i niske temperature (Haseman, 1961). U nepovoljnim, pre svega pri niskim koncentracijama okolnih hranljivih materija *P. larvae* stvara spore.. Velika otpornost spora u spoljnoj sredini kao i brojnost spora u obolelom društvu dodatno otežava kontrolu AFB.

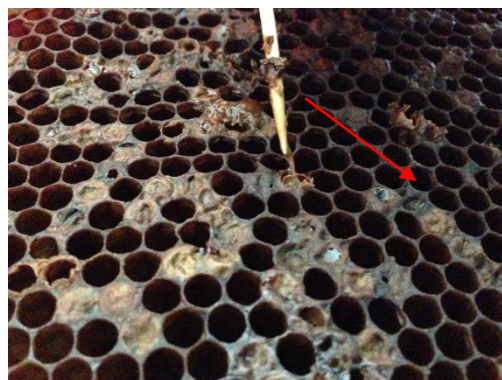
Klinička slika. Klinički znaci AFB su veoma raznovrsni i zavise od genotipa bakterije, stadijuma bolesti, snage pčelinjeg društva a verovatno i otpornosti samih pčelinjih društava prema uzročniku AFB (Genersch i sar., 2005). Klinička slika američke truleži podrazumeva isključivo promene na leglu. Prvi znaci bolesti se mogu primetiti pri

otvaranju košnice, kada se može osetiti neprijatan, oštar miris koji se širi iz ramova sa leglom. Posmatranjem saća sa leglom, mogu se uočiti promene boje, konfiguracije i integriteta poklopca na ćelijama saća, pri čemu leglo postaje raštrkano (**Slika 2**).

Vreme uginuća larvi je različito. Povezano je sa genotipom uzročnika koji izaziva AFB. Larve inficirane virulentnim genotipom (ERIC III - IV) uginjavaju još u ranom periodu kada su larve uvijene na dnu ćelije otvorenog legla (Brødsgaard i sar., 2000). Larve inficirane manje virulentnim genotipom (ERIC I - II) popunjavaju cele ćelije saća i uginjavaju u fazi larve ili lutke u uspravnom položaju nakon zatvaranja legla. Oko treće 3. nedelje posle inficiranja vidljivi su prvi znaci u vidu promene boje, konzistencije i integriteta poklopca. Tamne mrlje na sredini voštanih poklopca nastaju zbog polutečne mase uginule larve koja se nalazi unutar ćelije saća, gde se pored promene u boji na poklopcima zapaža i promena integriteta, tako da postaju blago ulegnuti, meki i lako se skidaju. Na poklopcima satnih ćelija legla uočavaju se rupice nepravilnih ivica, poređane obično po obodu poklopca (**Slika 3**). Nakon uginuća u ćeliji, larva menja boju i konzistenciju, od biserno bele, preko svetlo braon do rastegljivog macerata boje čokolade. Perforacije na voštanim poklopcima su posledice rada pčela, čišćenja ćelija i izbacivanja patološkog materijala što praktično pčele teško uspevaju da urade, jer su larve pretvorene u lepljivu amorfnu masu – rastegljivu. Vremenom poklopci ulegnu usled isušivanja larvi. Nakon dužeg vremena (nekada i 2 meseca) larva se suši i ostaje na dnu ćelije u vidu sasušene kraste. Promene na poklopcima legla daju povod ispitivanju primenom *Ropiness testa* (**Slika 3**), koji se sastoji u uvlačenju palidrvca šibice ili čačkalice u unutrašnjost zatvorene ćelije. Izvlačenjem dugih rastegljivih niti boje čokolade (*patognomoničan znak*), može se osnovano sumnjati na prisustvo američke truleži.



Slika 2. Raštrkano leglo (slikao E. Tarić)



Slika 3. Ropiness test (slikao E. Tarić)

Posle skidanja poklopaca mogu se videti larve koje su izgubile boju i sedefasti sjaj i poprimile sivožučkastu boju, boju bele kafe ili tamnosmeđu boju. Formirana amorfn masa je elastična i može se razvlačiti 10 - 40 cm prilikom izvlačenja iz ćelija. Vremenom usled isparavanja i isušivanja masa postaje gušća i manje rastegljiva, tamnosmeđe boje. Zatim, isušena masa vrlo dobro prijanja uz zid ćelije pri dnu, pretvara se u crnosmeđu krastu velične čiodine glave i veoma teško se uočava. Sam proces razlaganja larve traje više od 60 dana.

Diferencijalna dijagnoza. Zbog slično ispoljenih kliničkih simptoma diferencijalno dijagnostički treba isključiti evropsku kugu pčelinjeg legla, bolest legla izazvanu od strane virusa mešinastog legla (SBV) kao i varozu.

Dijagnoza. Dijagnoza AFB se zasniva na mikrobiološkoj i molekularno genetičkoj dijagnostici uz analizu i posmatranje kliničkih simptoma u zaraženim društvima. Od mikrobiološko kulturelnih pretraga mogu se koristi hranljive podloge koje su dale najbolje rezultate: PLA (*Paenibacillus larvae* agar) (Schuch i sar., 2001), MYPGP agar (Dingmann i Stahly, 1983), BHIT agar (brain–heart infusion thiamine) (Gochnauer, 1973), J - agar (Gordon i sar., 1973) i CSA (Columbia sheep-blood agar) (Hornitzky i Karlovskis, 1989).

U cilju dobijanja pouzdanijih rezultata, pored klasičnih metoda, danas se koriste i savremene molekularno genetičke metode PCR tehnologije, masene spektrofotometrije, biohemisjki testovi (Katalaza test, produkcija kiseline iz ugljenih hidrata i hidroliza kazeina), imunološke tehnike bazirane na antitelima kao i mikroskopska pretraga. Kombinacijom gore navedenih tehnika može se postaviti sigurna dijagnoza. Međutim, PCR tehnika predstavlja zlatni standard u dijagnostici uzročnika AFB pogotovo kada je reč o asimptomatskim pčelinjim društvima (Forsgren i sar., 2008; Taric i sar., 2019). Infektivni materijal koji se može poslati na analizu može biti: parče zatvorenog legla površine 20 cm² kao i ostaci promenjenih larvi ili lutki uzeti sterilnim brisom (OIE, 2016).

Terapija. Terapijska i kontrolna mera u cilju eradikacije uzročnika jeste spaljivanje obolelih društava i kontaminiranog materijala koji je bio u kontaktu sa obolelim društvom bez upotrebe antibiotika (Ashiralieva i Genersch., 2006; Reybroeck i sar., 2012). Međutim, u nekim zemljama kao što su Sjedinjene Američke Države (SAD),

Kanada, Argentina, Indija lečenje ove bolesti je dozvoljeno upotrebom antibiotika i hemoterapeutika (oksitetraciklin, tilozin, bicikloheksilamonium). Korišćenje ovih preparata je ograničeno i mora se prekinuti upotreba pre medobranja kako ne bi došlo do stvaranja rezidua u medu (Reybroeck i sar., 2012).

Kontrola. Američka kuga legla predstavlja oboljenje pčela koje se u Republici Srbiji po zakonu mora prijaviti nadzornom organu, odnosno veterinarskoj republičkoj inspekciji. Uvrštena je u *Program mera* u cilju sprečavanja pojave, ranog otkrivanja, širenja, praćenja i iskorenjivanja ove bolesti (Sl. gl., 2018, RS). Efikasna kontrola se sprovodi spaljivanjem pčelinjih zajednice. Spaljivanje pčelinje zajednice je prvi put predloženo četrdesetih godina prošlog veka kada je u Velikoj Britaniji bilo na hiljade zaraženih društava u toku jedne godine. Ova mera je smanjila broj obolelih društava na manje od 100 društava obolelih u toku jedne godine. Sporadične pojave bolesti kao i velika izbijanja mogu se držati pod kontrolom samo u saradnji pčelara sa nadzornim inspektorima. Upotreba antibiotika u kontroli AFB nije efikasna, jer antibiotici mogu samo zamaskirati znakove bolesti, a česta upotreba antibiotika dovodi do razvoja rezistencije uzročnika (Oldroyd i sar., 1989).

2.2.2. Evropska kuga pčelinjeg legla

Evropska kuga pčelinjeg legla (EFB) predstavlja bakterijsku infekciju. U odnosu na AFB predstavlja blaže oboljenje otvorenog i zatvorenog legla. Sezonskog je karaktera i raširena širom sveta predstavljajući sve veći problem u pčelarstvu. Javlja se u svim delovima sveta u kojima se praktikuje moderno pčelarstvo, s tim da još uvek nije prijavljena na Novom Zelandu (Ellis i sar., 2005). Međutim ova bolest pčelinjeg legla je najrasprostranjenija u Velikoj Britaniji (Wilkins i sar., 2007), a sve više zastupljena u Švajcarskoj, gde se broj košnica zaraženih sa EFB stalno povećava iz godine u godinu, uz eradicaciju klinički obolelih društva (Roetschi i sar., 2008).

Etiologija. Uzročnik EFB je gram pozitivna bakterija *Melissococcus plutonius*. Prvi slučaj EFB opisan je pre skoro jednog veka, a osnovni aspekti patogeneze još uvek nisu poznati (Forsgren, 2010). EFB pogađa pretežno otvoreno leglo pri čemu dovodi do uginjavanja larvi obično između 4-5 dana starosti. Inficirana larva se pokreće i zauzima opružen položaj umesto normalnog kružnog na dnu ćelije. Kopljastog je oblika, a po

nekada i u formi pleomorfnog štapića. Bakterijske ćelije se javljaju pojedinačno u parovima ili u lancima različitih dužina. *M. plutonius* je mikroaerofilni anaerob i za rast mu je potreban ugljen dioksid – CO₂ (Forsgren, 2010).

Poređenjem i analizom sekvenci utvrđeno je da je *M. plutonius* filogenetski sličan sa bakterijama iz roda *Enterococcus*. Osim toga, utvrđeno je da izolati bakterije *M. plutonius* su homogeni na osnovu morfoloških, fizioloških i imunoloških parametara (Allen i Ball, 1993).

Sekundarne bakterije. Dugi niz godina se smatralo da su druge bakterije primarni patogeni. Pored bakterije *M. plutonius* postoji nekoliko drugih bakterija koje su povezane sa izbijanjem EFB u pčelinjim društvima *Achromobacter eurydice*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis* i *Paenibacillus alvei* čija je uloga u razvoju bolesti još nejasna (Alipi, 1991). *A. eurydice* se obično javlja kod zdravih larvi, ali je mnogo češće prisutna kod već inficiranih bakterijom *M. plutonius* (Bailey, 1959). Bakterije iz roda *Enterococcus*, široko su rasprostranjene na mestima kao što je tlo, biljke, gastrintestinalni sistem ljudi i životinja (Franz i sar., 1999), tako da bakterija *E. faecalis* između ostalog povoljno raste u digestivnom sistemu larvi koje su inficirane bakterijom *M. plutonius*. Saprofitne aerobne bakterije *B. laterosporus*, *P. alvei* ne mogu da rastu u crevima zdravih larvi, ali su prisutne kod hronično obolelih društava i ostacima uginulih larvi (Bailey, 1963a).

Patogeneza. Infekcija počinje asimptomatski tako što preko kontaminirane hrane *M. plutonius* dospeva do creva gde se intezivno umnožava. Pored hrane postoje dokazi da prenos infekcije može proisteći iz uboda parazitske grinje *Varroa destructor* (Kanbar i Engels, 2003). Larve su osetljive u bilo kojoj fazi razvoja, ali starije larve su manje pogođene infekcijom (Bailey i Ball, 1991). Infektivna doza koja može da izazove infekciju u larvi iznosi oko 100 bakterijskih ćelija (Bailey, 1960). Mehanizmi patogeneze i uloga sekundarnih bakterija nije sasvim razjašnjena (Forsgren i sar., 2005). Sekundarne bakterije se normalno nalaze u gastrointestinalnom sistemu sisara i najvećim delom su komensali sa crevnom florom, međutim upotrebom antibiotika, padom imuniteta, ove bakterije prelaze granicu odbrane domaćina i kolonizuju novu nišu i mogu postati patogene za domaćina (Tendolkar i sar., 2003).

Sa dovoljnom količinom hrane koje radilice donose leglu, larve imaju veće šanse da prežive. Ovo objašnjava zašto se bolest sporadično javlja iz godine u godinu i iz

sezona u sezonu, a sve zavisi od odnosa pčela hraniteljica koje neguju leglo i količine legla kao i od količine hrane koja je na raspolaganju larvama. Preživjele larve koje postaju odrasle pčele imaju manje telo i težinu u odnosu na zdrave odrasle pčele, a kod bolesnih pčela infekcija povećava energetske potrebe (McKee i sar., 2004).

Transmisija. U pčelinjim društvima transmisija patogena i otpornost društva zavisi od stepena zaraženih larvi kao i od broja bakterija koje se nalaze u fecesu. U uginulim larvama i ostacima fecesa, *M. plutonius* može da preživi dug sušni period i da zadrži infektivnu formu i zarazi druge larve. Ukoliko su larve zaražene pre ulutkavanja, one će biti eliminisane iz ćelija saća od strane odraslih pčela. Odrasle pčele radilice koje su uzete iz legla u društvima koja su obolela nose veći broj patogena od pčela uzetih sa leta košnice zbog bliskog kontakta pčela radilica sa zaraženim leglom koje inače sadrži veliki broj bakterija (Roetschi i sar., 2008). Takođe i radilice iz legla zdravih kolonija mogu da budu nosioci velikog broja bakterija *M. plutonius*. Odrasle radilice ne prenose infekciju samo u okviru svoje pčelinje zajednice već i između susednih pčelinjih zajednica i pčelinjaka (McKee i sar., 2003; Belloy i sar., 2007). Slaba obolela društva predstavljaju izvor zaraze za zdrava jaka društva, jer su podložna „pljački meda“ od strane jačih pčela. Prostorna struktura tj. gustina pčelinjaka na jednom lokalitetu je veoma važna karika u prenosu evropske kuge pčelinjeg legla. Pored inficiranih pčela, ulogu u prenosu uzročnika zauzima i med kontaminiran uzročnikom evropske kuge pčelinjeg legla *M. plutonius* (McKee i sar., 2003). Sama pojava izbijanja bolesti je povezana sa stresom zajednice, kao što je nedostatak hrane i vode. Genetički faktori, vremenski uslovi i te kako doprinose u nastanku bolesti (Bailey, 1960). Pčelinje zajednice koje su imale jaku infekciju mogu se spontano oporaviti i naizgled postati zdrava društva (Bailey i Locher, 1968).

Klinička slika. Razvoj bolesti unutar pčelinjeg društava je složen i nije u potpunosti objašnjen. Infekcija se može razviti tokom jednog perioda, zatim u toku jednog meseca ili u toku jedne godine, koja često otežava razvoj društava, ali ne dovodi do njihovog uginuća. Znaci bolesti tokom ovih perioda mogu postati manje ili više ozbiljni ili pak iznenada nestati. Poznat je sezonski šablon sa znacima bolesti i to krajem proleća. Razlog ovoj pojavi jeste što u ovom periodu društva poseduju veliki broj larvi u odnosu na broj pčela radilica koje obavljaju poslove negovanja legla. Kao rezultat lošeg odnosa između broja larvi i radilica, larve dobijaju sve manje hrane, a one koje su pak inficirane

EFB još više pate od izgladnelosti. Kod društava, gde je odnos između legla i radilica povoljan larve ne gladuju tako da obolele larve imaju šansu da prežive i dobiju priliku da se razviju u zdravu pčelu. Međutim, takve larve koje su odrasle, a bile su inficirane prilikom presvlačenja kontaminiraju ćeliju saća sa milionima bakterija što rezultira pojavom bolesti koja će oslabiti društvo i na kraju dovesti do fatalnih posledica po društvo. EFB se uglavnom javlja u otvorenom leglu tj. pre nego što larve budu poklopljene od strane radilica. Inficirana larva unutar svoje ćelije zauzima sklupčan izuvijan položaj koji nije karakterističan za zdravu larvu iste starosne dobi. Uginula larva zauzima neprirodan tortuozno-spiralan položaj (Dobrić i sar., 2000). Zbog velikog broja uginulih larvi, radilice higijeničarke ih uklanjaju i prilikom pregleda košnice u datom periodu može se videti raštrkano leglo. Boja larve se menja od biserno bele do žute, a potom prelazi u braonkastu boju i na kraju, kada dođe do raspadanja prelazi u sivkasto crnu boju. Neke larve takođe uginjavaju i u zatvorenom leglu, sa ulegnutim i perforiranim poklopčićima što često podseća na američku kugu. Ako je prisutan visok procenat uginulih larvi u leglu može se osetiti neprijatan ili kiseo miris (Forsgren, 2010).

Diferencijalna dijagnoza. Zbog slično ispoljenih kliničkih simptoma diferencijalno dijagnostički treba obratiti pažnju na američku kugu pčelinjeg legla, bolest legla izazvana od strane virusa mešinastog legla (SBV) kao i na varozu. Larve uginule od EFB formiraju krastu sa ćelijom saća sa promenljivom bojom, a cela smesa ima gumastu konzistenciju, za razliku od uginulih larvi od AFB koje formiraju crne kraste, čvrsto spojene na zidove ćelije saća.

Dijagnoza. Dijagnoza evropske kuge pčelinjeg legla na terenu se postavlja na osnovu adspekcije legla i otkirvanjem obolelih larvi. Međutim simptomi evropske kuge pčelinjeg legla mogu se lako preklapati sa drugim sličnim bolestima (Forsgren, 2010). Postavljanje dijagnoze adspekcijom predstavlja nepouzdan metod, jer klinički znaci mogu da izostanu. Precizna dijagnoza se postavlja u laboratoriji slanjem materijala za ispitivanje otvorenog i zatvorenog legla sa promenjenim larvama površine 10x10 cm. Dijagnoza se može postaviti na osnovu bakteriološke izolacije na selektivnim hranljivim podlogama, imunološkim metodama - ELISA, molekularno genetičkim metodama putem konvencionalnog PCR i real-time PCR (OIE, 2016).

Terapija i kontrola. U nekim zemljama prijava EFB je zakonski regulisana (npr. Velika Britanija) i podleže službenoj kontroli i ispitivanju društava sa znacima oboljenja uz obavezan tretman ili uništavanje obolelih društava. Slaba i obolela društva se uništavaju, s tim da se društva koja pokazuju slabe znake bolesti mogu pod određenim okolnostima tretirati antibiotikom. Međutim, ovo nije metod izbora za kontrolu EFB. Tretman mora obaviti službeno lice koristeći lekove koji su registrovani za datu zemlju i uz potvrdu o prisustvu nalaza o EFB iz laboratorije kada je reč o Velikoj Britaniji (Waite i sar., 2003). Od preventivnih kontrolnih mera potrebno je da se društva utople, u nedostatku paše društva prihrane kvalitetnom hranom i da pčelinja društva uvek imaju dovoljno hrane, zatim suzi plodište, menja matica, a oprema i košnice propisno dezinfikuju.

2.2.3. Bolest krečnog legla

Bolest krečnog legla je izazvana gljivicom *Ascosphaera apis*. Bolest je fatalnog karaktera na individualnom nivou, ali obično ne uništi celo pčelinje društvo. Međutim, može izazvati značajan pad brojnosti pčela i produktivnost zajednice (Bailey, 1963; Wood, 1998), tako da pad proizvodnje meda može biti od 5 do 37% (Zaghloul i sar., 2005). Bolest je veoma raširena, a istraživanja Aizen i sar. (2009) pokazuju da ljudski faktor direktno i indirektno utiču na širenje bolesti zbog povećane potražnje pčelinjih proizvoda na tržištu.

Rasprostranjenost. Bolest krečnog legla je poznata još početkom XX veka (Maassen, 1913). Do druge polovine XX veka bolest krečnog legla nije bila poznata van Evrope. Duže vremena je poznata u Nemačkoj (Dreher, 1938), Skandinaviji, Rusiji (Betts, 1932) i Velikoj Britaniji (Heath, 1982, 1985). Jedan od prvih izveštaja koji govore o prisustvu uzročnika *A. apis* izvan Evrope jeste sa Novog Zelanda iz 1957. godine (Palmer-Jones, 1964). Do 1987. godine mediteranske zemlje nisu imale podatke o prisustvu uzročnika bolesti krečnog legla (Bradbear, 1988), ali se pretpostavlja da je verovatno bio prisutan i pre dijagnoze bolesti. Od mediteranskih zemalja uzročnik bolesti krečnog legla *A. apis* prvo je zabeležen u Izraelu. Broj obolelih društava u periodu od 1984. do 1990. godine je bio jako nizak, a od 1990. godine dolazi do naglog povećanja obolelih pčelinjih društava (Yacobson i sar., 1991). Istraživanja u proleću 1988. god. pokazuju da je bolest rasprostranjena među pčelama u regionima Turske. Primarni izvor zaraze je bio kontaminirani pčelinji vosak prilikom uvoza iz različitih zemalja u periodu 1986-1988

godine (Tutkun i sar., 1993). U Severnoj Americi bolest krečnog legla je opisana sredinom 60.-ih godina prošlog veka, a od 1971. godine ima sve veći ekonomski uticaj u pčelarstvu (Hitchcock i Christensen, 1972). Najraniji izveštaji o prisustvu krečnog legla u SAD dolaze iz države Jute i to iz 1965. godine (Baker i Torchio, 1968), zatim iz Kalifornije 1968. god. (Hitchcock i Christensen, 1972). U isto vreme bolest se širila centralnim i zapadnim delovima Kanade. Od tada krečno leglo se širi kroz SAD uključujući Aljasku i Havaje. U Australiji, krečno leglo je identifikovano 1993. god., a za samo nekoliko godina se proširila na sve države Australije (Hornitzky, 2001). Migratorno kretanje komercijalnih pčelara predstavlja najvažniji faktor koji doprinosi brzom širenju krečnog legla na ova dva kontinenta (Aronstein i Murray, 2010). Na prostoru Srbije (Pešterska visoravan) zastupljenost CHB u komercijalno gajenim društvima kretao se do 15,83%, dok u tradicionalnim društvima uzročnik CHB nije bio detektovan (Taric i sar., 2019).

Taksonomska klasifikacija. Većina vrsta iz roda *Ascosphaera* su u vezi sa socijalnim i solitarnim pčelama. Neke od njih su saprofiti (Anderson i Gibson, 1998), ali nekoliko je vrsta patogeno. *A. apis* je prvobitno bila poznata kao *Pericystis apis* (Maassen, 1913), ali je reklasifikovana kao *Ascosphaera apis* od strane Spiltoir (1955a). Taksonomska klasifikacija roda *Ascosphaera* je u fokusu mnogih rasprava. Već duže vreme *Ascomycota* su grupisane u šest klasa: *Hemiascomycetes*, *Plectomycetes*, *Pyrenomycetes*, *Discomycetes*, *Laboulbeniomyces* i *Loculoascomycetes*. Vrste *Ascosphaera* su smeštene u klasu *Plectomycetes*, na osnovu tipa plodnog tela – askomata (Skou, 1972). Ovaj tradicionalni sistem klasifikacije gljivica je kritikovan jer su neke fenotipske karakteristike nestabilne i zavise od uslova sredine (Malloch, 1981). Imajući u vidu da u mnogim slučajevima neke karakteristike askoma mogu da konvergiraju, Hawksworth i sar. (1983) su predložili klasifikaciju prema redu i filumu *Ascomycota* bez klasa. Međutim, Skou (1988) ih klasifikuje u klasu *Ascosphaerales*. Primenom novih molekularnih metoda zasnovanih na DNK analizama, sistematika gljivica zahteva reviziju mikološke sistematike (James i sar., 2006). Termin *Plectomycetes* nije široko prihvaćen i napušten je tokom zadnjih godina. Stoga Aronstein i Murray (2010) smatraju da je potrebno izvršiti taksonomsku poddelu.

Epidemiologija. Bolest krečnog legla se javlja tokom proleća, s obzirom da je rast gljivica poboljšan u hladnim i vlažnim (slabo provetrenim) košnicama u ovom periodu

(Flores i sar., 1996; Borum i Ulgen, 2008). Pored uslova životne sredine, interakcija koja se odvija između sojeva gljiva i genetike pčela može i te kako uticati na učestlost i ozbiljnost bolesti. Glinski (1982) smatra da virulentnost gljive zavisi od konkretnog soja. Visoka koncentracija spora gljiva u kolonijama znatno povećava šansu da dođe do razvoja bolesti (Flores i sar., 2005a; 2005b), tako da stopa pojavljivanja bolesti verovatno zavisi od soja gljivica, nivoa proizvodnje askospora, stepena klijavosti spora i efikasnosti širenja spora. Kada je reč o genetici pčela, opšte zdravstveno stanje i stres takođe mogu da budu važni faktori koji utiču na pojavu i stepen bolesti. Tokom preteklih nekoliko decenija, istraživanja su fokusirana na stvaranju linija pčela koje bi bile otporne na zarazne bolesti (Spivak i Reuter, 1998a; 1998b; 2001). Prisutnost stresa koji je neminovan, uticaj biotičkih i abiotičkih faktora može da oslabi urođeni imunski odgovor, što ih dodatno čini podložnim obolevanju (Flores i sar., 1996). Rod *Ascospheera spp.* obuhvata neke saprofitske vrste koje se razvijaju u satnim ćelijama pčelinjeg legla, kao i u ćelijama gde se skladišti hrana, a takođe i u fekalnim ostacima i otpadu iz košnice (Bissett, 1988). Spore ovog patogena se mogu akumulirati u košnici i proizvodima kao što je vosak, med i perga. Spore mogu biti održive unutar košnice i do 15 godina te predstavljaju izvor dugoročne zaraze (Flores i sar., 2005a; 2005b).

Patogeneza. Oboljenje je fatalno za larve, ali ne dovodi do potpunog uništenja cele pčelinje zajednice. Bolest je hroničnog karaktera. Na osnovu prikupljenih podataka tokom 6 godina Hedtke i saradnici (2011) ukazali su da košnice sa visoko inficiranim pčelama grinjom *V. destructor* ili mikrosporidijom *Noseme cerane* tokom proleća, imaju mnogo veću šansu za razvoj bolesti krečnog legla. Infekcija nastaje kada se larva inficira sporama koje dospeju do intestinalnog zida creva gde dolazi do rasta micelijuma u telesnu šupljinu. Posle nekoliko dana, plodonosna tela sa novim askosporama se formiraju na antenama hifa, na spoljašnjoj strani mrtve larve. Pored toksičnih efekata uginuće nastaje kao rezultat mehaničkih i enzimskih oštećenja koje utiču na cirkulaciju. U podmakloj fazi larva je prekrivena debelim slojem micelijuma. Potom postaju smeđe ili crne usled razvoja askoma. Antropologija sa entologijom je navelea neke predisponirajuće uzroke koji utiču na pojavu bolesti. Flores i sar. (1996) su primetili da inokulisane larve koje su ohlađene na temperaturi od 18-20°C satima pre i posle poklapanja, a zatim vraćene na normalnu temperaturu od 25 °C te nakon termičkog stresa 100% larvi se razbolelo. Druga grupa koja nije bila izložena hlađenju nije razvila

bolest. Pored temperaturnog stresa, zabeležen je i još jedan faktor koji utiče, a to je preterana upotreba antibiotika, posebno oksitetraciklina, koji se koristi za suzbijanje i sprečavanje bakterijskih bolesti u pčelarstvu. Upotreba antibiotika remeti ravnotežu crevne mikroflore, gde se favorizuje rast gljivice kao što je *A apis*. Međutim, Flores i sar. (2004) su proučavali efekat ovog antibiotika u različitim situacijama i zaključili da oksitetraciklin ne povećava rizik za nastajanje krečnog legla kod pčela radilica tokom kraće ili srednje upotrebe leka. Higijensko ponašanje pčela je definisana sposobnost otkrivanja i uklanjanja legla iz obolelih košnica ovakvo ponašanje predstavlja glavni faktor otpornosti na krečno leglo (Gilliam i sar., 1983). Pčele higijeničarke su u stanju da detektuju bolesno leglo, uklone larve pre nego što budu u infektivnoj fazi (Wilson-Rich i sar., 2009).

Klinička slika. *Simptomi obolelih larvi* – Bledo-žućkasta boja larvi se javlja na početku infekcije, koje postaju meke i glatke. Larve su promenljivog oblika i u kasnoj fazi razvoja bolesti imaju svetlo - žutu boju. Larve na dodir postaju hrapave, a mogu postati jako krte i lomljive. Oko larvi može se formirati beli micelijumski omotač, koji tesno prijanja na zadnji deo tela larve, dok glava obično ostaje slobodna i suva i ima oblik dugmeta. Stare mumificirane larve u kasnijoj fazi infekcije se smanjuju i mogu imati tamno-zelenu boju. U ovoj fazi infekcije dolazi do dehidracije i dobijaju izgled kao da su pokrivene krečom – “*krečno leglo*”.

Simptomi na ramu saća sa leglom – u ovom periodu može se zapaziti raštrkano leglo., gde poklopci ćelija su uglavnom normalnog izgleda ili mogu biti blago ulegnuti. Micelijum gljivice ima tendenciju da proдре kroz poklopac ćelija i da obuhvati spoljašnju stranu poklopca tako da zatvoreno leglo ima izgled kao da je posuto brašnom, krečom ili sivkastom prašinom (Stanimirović i sar., 2013).

Dijagnoza. Sumnja na bolest krečnog legla se postavlja na osnovu prisustva belih, crnih ili sivih mumificiranih larvi na ulazu košnice, podnjači ili u zatvorenim i otvorenim satnim ćelijama. Mumificirane larve se pregledaju mikroskopski, a ukoliko je reč o mumificiranim belim larvama dijagnoza se zasniva na zasejavanju materijala na agaru. Vrlo često pčelinja društva nemaju vidljive znake o prisustvu uzročnika krečnog legla, s toga je korisno obaviti i ranu detekciju pomoću molekularno genetičkih metoda ili biohemijskih testova (Aronstein i sar., 2010).

Terapija i preventiva. Širok spektar hemoterapeutika je testiran i korišćen u cilju kontrole krečog legla (Liu, 1991; Glinski i Chmielewski, 1996; Davis i Ward, 2003). Hornitzky (2001) u svom radu navodi da hemikalije koje su obećavale moguću kontrolu rasta gljivica kako u kulturi tako i na pčelinjacima nažalost nisu postigli željeni nivo koji je neophodan u borbi protiv kečnog legla. Pored hemijske kontrole rasta gljivica razvijale su se i alternativne metode (Hornitzky, 2001) koje uključuju: formiranje rezistentnih pčelinjih linija na bolest krečnog legla, poboljšanu pčelarsku praksu koja se odnosi na higijenu i apitehničke postupke na pčelinjaku kao i korišćenje bezbednih prirodnih registrovanih proizvoda (Aronstein i sar., 2010). Uzimajući u obzir da preterana upotreba sintetičkih pesticida i antimikrobnih sredstava mogu dovesti do opšteg pogoršanja zdravstvenog stanja pčelinjeg društva, životne sredine i zdravlja pčela u opšte, preporučljivo je da se minimalizuje upotreba pesticida unutar i u okruženju pčelinjih društava (Bogdanov i sar., 1998; 2004; Frazier i sar., 2008).

U cilju održavanja zdravlja pčela kao i prirodnih karakteristika pčelarskih proizvoda potrebno je razviti alternativne metode u cilju kontrole pojave krečnog legla. Potrebno je izbegavati upotrebu fungicida koji mogu kontaminirati proizvode. Važno je da pčelari izbegavaju prenošenje saća iz košnica koje su inficirane sporama (Giangaspero i sar., 2016).

Testirani su mnogi preparati u cilju kontrole bolesti, međutim ni jedan ne poseduje potrebnu efikasnost (Bogdanov i sar., 2004). Trenutno se koristi nekoliko strategija za kontrolu bolesti i to: poboljšanje sanitarnih uslova u košnici i pčelinjaku kao i upotreba ekološki bezbednih prirodnih proizvoda. Upotreba pesticida i antibiotika može pogoršati stanje u košnici kao i zdravlje pčela, tako da Frazier i sar. (2008) preporučuju da se smanji upotreba ovih supstanci. Zagrevanje meda predstavlja strategiju za dekontaminaciju meda koja je dala dobre rezultate, ali sa ograničenjem. Grejanje iznad 90°C razultuje karamelizaciju i takođe dolazi do porasta hemijske materije hidrosimetil furfurala (HMF) kao i smanjenja korisnih enzima u medu. Iz tih razloga brojne studije su fokusirane na dobijanje alternativnih metoda kao što je mikrotalsno zračenje, infracrveno zračenje kao i ultrafiltracija, a sve u cilju očuvanja kvaliteta meda (Mourad i sar., 2005). Korišćenje prirodnih jedinjenja za kontrolu bolesti kao što su proizvodi iz biljaka sa antimikrobnim dejstvom predstavlja

alternativu. Neka esencijalna ulja kao što su: citral, citronella i geraniol su testirani *u in vitro* uslovima i pokazuju dobar inhibitorski efekat na gljive (Bogdanov i sar., 1998).

2.2.4. Virus mešinastog legla

Bolest mešinastog legla je oboljenje pčela koje se najčešće javlja u proleće. Zbog brzog razvoja legla virus mešinastog legla (SBV) najbrže se razvija. Oboljenje je zastupljeno u svim delovima sveta gde se pčele gaje (Dall, 1985; Grabensteiner i sar., 2001; Shen i sar., 2005; Antúnez i sar., 2006; Freiberg i sar., 2012; Mingxiao i sar., 2013). Ovu bolest je opisao White još davne 1913. godine. Uzročnik je prvi put izolovan i identifikovan 1964. godine od strane Bailey i Gibbs (1964).

Etiologija. Biološki ogled koji je napravio White (1917) u Americi, inokulacijom filtratima promenjenog dela larvi sa kliničkim simptomima mešinastog legla dokazuje da je uzročnik infekcije virus. Elektronskom mikroskopijom tehnički nije bilo moguće videti virusne čestice, tako da je virus mešinastog legla (SBV) bio jedan od najranije dokazanih virusa. Virus mešinastog legla inficira pčelinje leglo dovodeći do uginuća larvi. Virus pripada porodici porodici *Iflaviridae*, rodu *Iflavirus*, koji na svojoj površini poseduje omotač od membrane ćelija. Uzročnik mešinastog legla je prvi virus koji čija je utvrđena nukleotidna sekvenca (Ghosh i sar., 1999), gde virusna RNK sadrži 8 832 nukleotida, koji kodira sintezu proteina (Grabensteiner i sar., 2001).

Patogeneza i klinička slika. Viruse se može širiti horizontalno i vertikalno Istraživanja od strane Bailey i Milne (1969) su ukazala na vertikalno širenje virusa kada je identifikovao prisustvo virusa u hipofaringealnim žlezdama radilica. Larve su na virus mešinastog legla najosjetljivije u starosti od dva dana. Virus se umnožava u nekoliko različitih tkiva larve gde one izgledaju sasvim normalno do momenta njihovog poklapanja u leglu. Potom virus dovodi do promene boje larve iz normalno sedefasto sjajne boje u više žutu boju te se onemogućava metamorfozu larve u lutku zbog nemogućnosti zamene čvrste endokutikule, gde posle uginuća dolazi do prebojavanja u tamno braon boju (Bailey i Milne 1969). Pored vertikalnog širenja, postoji i horizontalno širenje virusa (transovarijalno) i pomoću vektorske uloge pčelinjeg krpelja *V. destructor* u širenju infekcije na leglo, ali i na odrasle pčele (Shen i sar., 2005).

Klinička slika bolesti mešinastog legla zavisi od mnogih faktora kao što je: količina virusnih partikula, imuni status društva, doba godine i prisustvo ektoparazita *V. destructor* (Stanimirović i sar., 2007; 2017). Simeunović i sar. (2015) su procenjivali vezu između snage društva i prisustva virusa i istovremeno utvrdili da je SBV bio značajno zastupljen u praćenim pčelinjim zajednicama sa 24% u odnosu na ukupan broj ispitivanih pčelinjih društava. Ove rezultate ispitujući virusne infekcije na većem broju pčelinjih zajednica u Srbiji potvrđuju i nalazi Ćirković i sar. (2018). Infekcije virusom mešinastog legla su najčešće uočljive u proleće i početkom leta, što je normalno s obzirom na razvoj zajednice, koji je tada najintenzivniji.

Dijagnoza. Dijagnoza se može postaviti na osnovu: kliničkog pregleda pčelinjeg društva, seroloških metoda (ELISA testa ili Western-blot) koje identifikaciju virus u predlutkama (Rana i sar., 2011), savremenih molekularnih metoda (RT-PCR i real-time PCR), koje su opisane u istraživanjima od strane Simeunović (2015) i Tarić i sar. (2019).

2.3. BOLESTI ODRASLIH PČELA

Za razliku od bolesti legla pčela, bolesti odraslih pčela je teže otkriti iz razloga što bolest može biti inaparentno prisutna uz izostanak određenih kliničkih znakova bolesti. Socijalna organizacija unutar pčelinje zajednice doprinosi da pčele obavljaju određene aktivnosti u košnici van košnice u zavisnosti od starosti. Prisustvo različitih patogena kao što su: mikrosporidije (*Nosema ceranae* i *Nosema apis*), virusi (npr. virus akutne i hronične paralize, virus deformisanih krila), tripanozome (*Lotmaria passim*, *Crithidia mellificae*) ugrožavaju zdravstveno stanje pčela (Simeunović, 2015; Glavinic i sar., 2017; Ćirković i sar., 2018; Vejnović i sar., 2018, Stanimirovic i sar., 2019). Ovako teško obolele pčele ipak će obavljati svoju funkciju. Takođe, gubitak odraslih pčela u određenom vremenskom periodu, jaka i zdrava matica može nadoknaditi pojačanim nošenjem jaja, ali ako pčelar ne primećuje pojačano slabljenje zajednice, takva zajednica ima slabiju produktivnost, postepeno slabi i nestaje (Plavša, 2017).

2.3.1. Virus akutne paralize pčela

Etiologija. Virus akutne paralize pčela (ABPV) pripada porodici *Dicistroviridae*, rod *Apavirus*, čiji je genom veličine oko 9500 nukleotida. Kao i većina virusa ove porodice, ABPV je najčešće prisutan u niskom infektivnom titru u pčelinjim društvima kao izazivač latentnih infekcija, odnosno društva inficirana ovim virusom ne pokazuju nikakve vidljive simptome na individualnom nivou i nivou pčelinje zajednice (Anderson i Gibbs, 1988; Gauthier i sar., 2007; de Miranda i sar., 2010). Virus akutne paralize pčela se nalazi u naizgled zdravim odraslim pčelama, naročito u toku leta kada je inače povećana pčelinja aktivnost. Postoje najmanje dva različita genetska podstabla u odnosu na postojeće ABPV viruse. Glavnu granu čine uzorci iz Amerike i Engleske, dok drugu granu čine kontinentalnoevropski izolati (Govani sar., 2000).

Patogeneza i klinička slika. Virus akutne paralize pčela kod inficiranih lutaka i odraslih pčela veštačkim putem pokazuje visoku virulentnost (Bailey, 1963; Dall, 1985; Ribiere i sar., 2008). Nalaz virusnih čestica u fecesu (Ribiere i sar., 2008) kod adultnih pčela ukazuje na infekciju peroralnim putem (Chen i Siede, 2007), dok kod vertikalnog širenja ovog virusa utvrđene su virusne čestice u semenu (Yue i sar., 2006), ali ne i u ovarijumimima matice, preko kojih ipak raste infektivni titar virusa u inficiranim društvima, uzrokujući pojavu ozbiljne kliničke slike koja se često manifestuje letalnim ishodom (**Slika 4**).



Slika 4. Ekstenzija ekstremiteta kod pčela uginulih od posledica infekcije sa ABPV

(Foto: E. Tarić - Katedra za Bilogiju, FVM)

Mehanizmi virusne indukcije nisu još sasvim jasni. Odrasla ženka krpelja biva inficirana virusom, hraneći se na inficiranom domaćinu i dovodeći sebe u funkciju vektora koji je u stanju da prenese virus akutne paralize na druge odrasle pčele ili lutke unutar njihovog razvojnog perioda unutar legla. Odrasle pčele inficirane virusom, u kojima se virus aktivno multiplicira, mogu inficirati mlade larve sekrecijom velike količine virusa unutar hrane.

U teško inficiranim pčelinjim društvima, populacija odraslih pčela se rapidno smanjuje, a simptomi na obolelom leglu mogu nalikovati, ili biti pripisani onim koji se javljaju kod američke ili evropske truleži.

Može se zaključiti da je pčelinji krpelj zapravo faktor koji dovodi do multiplikacije virusa (Stanimirović i sar., 2019). Na telu pčela u toku normalnog životnog ciklusa varoe, uzimajući hranu-hemolimfu od naizgled zdravih pčela, ali sa inaparentnom virusnom infekcijom, vodi do brzog širenja virusa unutar pčelinje zajednice uz letalni ishod inficiranih pčela. Visoka koncentracija čestica ABPV nalazi se uvek tamo gde su pčelinje zajednice uginule od varoze. *V. destructor* je vrlo reprezentativan vektor za ABPV. Ispitivanja obavljena u Srbiji pokazala su veliku rasprostranjenost i visoku procentualnu zastupljenost ovog virusa u ispitivanim pčelinjim zajednicama (Simeunović i sar., 2014b; Simeunović, 2015; Ćirković i sar., 2018). Stanimirović i sar. (2019) navode da su sva pčelinja društva inficirana sa ABPV kako sa inaparentnom infekcijom tako i sa klasičnom kliničkom slikom su bila društva sa visokom invadiranošću i slabom kontrolom pčelinjeg krpelja *V. destructor*.

2.3.2. Virus hronične paralize pčela

Jedna od retkih virusnih bolesti kod pčela koja ima jasno izražene simptome (Ball i Bailey, 1991; 1997). Klinička manifestacija ispoljava se delovanjem stresnih faktora (hrana, greške u apitehnicima, klima i dr.) koji podstiču i ubrzavaju replikaciju virusa. CBPV je kontagiozno oboljenje i može postojati u pčelinjim društvima, izazivajući inaparentne infekcije (Tentcheva i sar., 2004).

Etiologija. Virus hronične paralize pčela (CBPV) je prvi izlovovan virus od strane Bailey (1963), a jedan od poslednjih čiji je genom ispitan u potpunosti. CBPV deli osnovne biološke karakteristike sa drugim RNK virusima (jednolančana RNK koja je

pozitivno naelektrisana), ali zbog razlika u genomu ne može se svrstati u velike dve familije Nodaviridae i Tombusviridae iz reda Picornavirales. Poznate su dve varijante genoma ovog virusa različite veličine, RNK1 sa 3674 baznih parova (bp) i RNK2 sa 2305 bp (Olivier i sar., 2008).

Transmisija i patogeneza.

Horizontalna transmisija - Infekcija pčela započinje peroralnim načinom unošenja infektivnih čestica koje se nalaze u hrani i/ili sekretima žlezda. Takođe dokazano je prisutvo virusnih čestica u fecesu pčela (Ribiere i sar., 2007) koji može takođe kontaminirati košnicu i na taj način se dodatno infekcija širi unutar pčelinje zajednice. Pored navedenih načina transmisije postoji još jedan dodatni način prenošenja virusa, a to je neposredni kontakt između zdravih i obolelih pčela (Ball i Bailey, 1997). Ovu činjenicu potvrđuju laboratorijska istraživanja na pčelama kod kojih su uklonjene dlačice i veštački na kutikulu aplikovan infektivni materijal kao i ogled kod koga su bile pomešane zdrave i obolele pčele kako bi se provocirali česti kontakti (Bailey i sar., 1983). CBPV je detektovan i kod dve vrste mrava (*Camponotus vagus* i *Formica rufa*) što otvara nova saznanja o širenju i održavanju virusa u pčelinjim društvima na pčelinjacima sa lošom zoohigijenom. Baily i sar. (1983) u svojim istraživanjima su utvrdili da je 2% košnica u Velikoj Britaniji inficirano CBPV, ali da te pčele ne pokazuju znake bolesti što nam govori da imaju određeni stepen rezistencije na širenje i umnožavanje virusa u normalnim okolnostima.

Vertikalna transmisija - predstavlja dodatni način širenja ovog virusa u pčelinjim zajednicama (Kulinčević i Rothenbuhler, 1989). Detekcija virusnog genoma kod matica (Chen, 2005; 2006a; 2006b) pomoću molekularno genetičkih metoda kao i u leglu (larva, lutka, imago) (Chen i sar., 2006a; 2006b) potvrđuje vertikalni način širenja ovog virusa u pčelinjoj zajednici.

Klinička slika. Ispoljavanje manifestnih znakova bolesti u velikoj meri je povezan sa stresornim faktorima. Paraliza pčela izazvana CBPV predstavlja sindrom sa ispoljavanjem različitih simptoma. U Velikoj Britaniji najčešći simptom koji se ispoljava kod pčela jesu nenormalni pokreti „trembling”, drhtanje krila i celog tela kod obolelih pčela. Obolele pčele gube sposobnost letenja, formirajući grupice na zemlji. Na telu obolelih pčela mogu se zapaziti uvećani abdomen kao i raširena krila koja zauzimaju nepravilne položaje. Posledica širenja abdomena jeste širenje mednog želuca

zbog nakupljanja tečnosti. Velika količina tečnosti u mednom želucu ubrzava simptome za nastanak dizenterije, tako da obolele pčele dolaze u terminalnu fazu gde u kratkom vremenskom roku uginjavaju. Obolele pčele koje su izgubile sposobnost letenja takođe se mogu grupisati u gornje delove košnice i daju karakterističnu sliku sindroma CCDS (eng. Colony Collapse Disorder Syndrome) tj. slabo pčelinje društvo sa maticom i nekoliko radilica u kome se nalazi dovoljna količina hrane (med i perga).

Drugi simptom koji se takođe javlja kod obolelih pčela jeste da se u društvu uočavaju male, crne “čelave” pčele. Ove pčele nisu izgubile sposobnost letenja, ali može se zapaziti da ove pčele imaju otežano letenje. Zbog izmenjenog izgleda može se primetiti da društvo ovako obolele pčele prepoznaje i pokušava da izbaci iz košnice. Obolele pčele ipak posle nekoliko dana gube sposobnost letenja, pokazuju tremor i ulaze u terminalnu fazu kada veliki broj obolelih pčela uginjava.

U obolemom društvu od CBPV mogu se zapaziti oba simptoma gde uvek jedan dominira nad drugim. Razlog nastanka različitih simptoma leži verovatno u genetici same individue (Kulinčević i Rothenbuhler, 1973; Rinderer i sar., 1976).

Dijagnoza. Primenom molekularnih metoda RNK virusa u varoi nije nađena, što nam govori da nije vektor ovog virusa i ne učestvuje u širenju virusa između jedinki i pčelinjih društava (Chantawannakul i sar., 2006; Gauthier i sar., 2007). Dijagnoza se može postaviti i kliničkim pregledom (adspekcijom), ali problem predstavljaju obolela društva sa inaparentnom infekcijom. Tačna, brza i precizna dijagnoza se može postići primenom molekularnih metoda RT-PCR i real-time PCR tehnologije, kako kod društva sa izraženom kliničkom slikom, tako i kod društava sa inaparentnom infekcijom u cilju preveniranja eventualnih gubitaka pčelinjih zajednica (Tentcheva i sar., 2004; Gauthier i sar., 2007; Celle i sar., 2008; Simeunović, 2015; Morimoto i sar., 2012; Tarić i sar., 2019). Na prostoru Srbije prisutvo CBPV ustanovili su Simeunović (2015), dok kasnija istraživanja istraživača iz iste laboratorije ističu da je zastupljenost ovog virusa znatno manja u odnosu na druge pčelinje viruse kao što su ABPV, DWV i SBV (Ćirković i sar., 2018; Stanimirović i sar., 2019).

2.3.3. Virus deformisanih krila

Virus deformisanih krila (DWV) prvi put je izolovan iz pčela koje su bile infestirane *V. destructor* u Japanu. Karakteristika ove bolesti da oboljevaju najmlađe odrasle pčele sa deformisanim ili potpuno nerazvijenim krilima (de Miranda i Genersch, 2010). DWV u pčelinjim društvima može se smatrati kao „ubikvitarnom“ pojavom, jer se nalazi u niskoj koncentraciji i izaziva latentne infekcije (de Miranda i Fries, 2008).

Etiologija. Virus deformisanih krila spada u familiju Iflaviridae. Posедуje ikosaedričnu simetriju, veličine približno 30 nm. Građen je od jednolančanog pozitivno orijentisanog molekula RNK i tri glavna strukturna proteina (Ball i Bailey, 1991). Rod Iflavirus poseduju jedinstveni veliki ORF, koji kodira sintezu strukturnih i nestrukturnih proteina (Lanzi i sar., 2006). Pčelinja društva mogu tolerisati veoma visoke količine virusa, a da pri tome ne pokazuju spoljašnje kliničke simptome (Gauthier, 2007).

Transmisija i patogeneza. Virus deformisanih krila u kontaktu sa pčelama može se prenositi horizontalno i vertikalno. DWV je detektovan u svim stadijumima razvoja pčela kao i u žlezdanim sekretima (Chen i sar., 2005; 2006a; 2006b). Replikacija virusa se odvija u epitelnim ćelijama srednjeg i zadnjeg creva (Fievet i sar., 2006). Virus se takođe umnožava u ćelijama mozga, reproduktivnim organima matice i trutova (seme trutova) (Chen i sar., 2005, 2006b; Fievet i sar., 2006).

Horizontalna transmisija - se odvija intezivnim kontaktom između obolelih i zdravih jedinki putem ishrane, fecesa, inficirane hrane ili legla (Mockel i sar., 2011).

Vertikalna transmisija - se obavlja putem oplodjenih jaja čije je seme zaraženo virusnim česticama i virus se prenosi na potomstvo gde su jaja radilica inficirana i infekcija reprproduktivnih organa matice gde se virus može naći u radiličkom i trutovskom leglu.

Prenošenje DWV se odvija pomoću varoe koja predstavlja mehanički i biološki vektor (de Miranda i Genersch, 2010). Visok titar antitela u pčelinjem krpelju pre inficiranja larvi predstavlja glavni i osnovni preduslov za ispoljavanje kliničkih simptoma kod mladih (Yue i Genersch, 2005; Gisder i sar., 2009). Gauthier i sar. (2011) u svom istraživanju govore o patogenom delovanju virusa na reproduktivne organe matice tj. jajnika, izazivajući njihovu degeneraciju. Zanimljivo je da virus ne mora uvek dovesti do degenerativnih promena na jajnicima pa čak i kada se nalazi u visokom titru.

Pored varoe, Neuman (Coloss workshop, New molecular tools, Bern, Switzerland, 12–21 May, www.colos.org/proceedings) je proučavao i uticaj i značaj

male košničke bube *Aethina tumida* i zaključio da takođe može biti biološki vektor DWV, ali i drugih pčelinjih virusa. RT-PCR – om detektovan je genetički materijal virusa kod *A. tumida* u obolelim pčelinjim zajednicama od strane DWV. Klinička slika zavisi od mnogih faktora (broja virusnih čestica, načina prenošenja, okoline) tako da kod novoizleženih radilica mogu se zapaziti promene na krilima koje se manifestuju skraćenim i deformisanim krilima, promenjen abdomen, a nekada može doći do promene boje tela pčele (Yang i Cox-Foster, 2005). Obolele pčele imaju skraćen životni vek u odnosu na zdrave jedinke i uginjavaju za manje od 67h od izleganja (Yang i Cox-Foster, 2005). Kao i ostali pčelinji virusi i DWV ima potencijal da utiče na gubitak pčelinjih zajednica (CCD) (Genersh i Aubert, 2010). Ovaj virus u Srbiji ispitivalo je više istraživača u okviru obimnih istraživanja utvrđivanja filetičke veze virusa sa ovih prostora sa virusima detektovanim u drugim delovima sveta pri čemu je utvrđena zastupljenost ovog virusa čak do 74% od ukupnog broja ispitivanih uzoraka (Simeunović, 2015; Ćirković i sar., 2018; Stanimirović i sar., 2019).

2.3.4. Nozemoza

Uzročnik nozemoze spada u tip (Phylum) mikrosporidija (*Microsporidia*). To su intracelularni, obligatorni, jednoćelijski paraziti koji se van domaćina nalaze u formi spora (Mehlhorn, 2008). Nozemoza je bolest odraslih pčela, a dve vrste roda *Nosema* sp., parazitiraju u evropskoj medonosnoj pčeli (*A. mellifera*) i to *Nosema apis* (Zander, 1909), a druga je *Nosema ceranae* (Fries i sar., 1996; Higes i sar., 2006). Veličina jednoćelijskih orgnaizama kreće se između 2 - 40µm u prečniku. Zbog odsustva mitohondrija, peroksizoma i Goldžijevog aparata spadaju u eukariote (Corradi i Keeling, 2009). Opisano je preko 1300 različitih vrsta mikrosporidija koje su organizovane u 160 rodova i to na osnovu ćelijske strukture, životnog ciklusa kao i na osnovu odnosa prema domaćinu (Keeling, 2009).

Patogeneza. Stvaranjem adekvatnih uslova, spore kroz akvaporine koriste vodu i dolazi do stvaranja intravakuolarnog pritiska i uvećanja posteriornih vakuola. Povećanjem intravakuolarnog pritiska dolazi do pucanja vakuola formiranjem polarnog filameta koji penetrira u ćeliju domaćina. Uloga polarnog filameta jeste da prenosi sporoplazmu i na taj način dolazi do bespolnog razmnožavanja (Bigliardi i Sacchi 2001; Franzen 2005). Ulaskom mikrosporidije unutar ćelije domaćina počinje razvoj od šizogonije,

merogonije i sporogonije. Ovim razvojem parazit uništava ćeliju domaćina i oslobađa spore van ćelije i tako započinje novi ciklus razvoja od spore do spore.

N. apis parazitira u epitelnim ćelijama srednjeg creva (*ventriculus*). Infekcija nastaje *per os* unosom spora koje su infektivni oblik mikrosporidija prilikom bliskog kontakta (*trophallaxis*), ali spore takođe mogu biti prisutne i u fecesu obolelih pčela gde higijeničarke mogu raširiti spore. Nakon indigestije i dospeća spora do srednjeg creva one otpočinju proces germinacije (Weidner i sar., 1984). U optimalnim uslovima kompletan razvoj parazita od spore do spore nakon ingestije traje od 48-60 h. Nakon dve nedelje od infekcije ceo ventrikulus biva invadiran. Ukupan broj spora po pčeli u ovom periodu može iznositi između 30 i 50 miliona spora (Ball i Bailey, 1991). Zbog intenzivnih deoba u kratkom periodu ceo lumen creva biva ispunjen sporama koje na kraju dosapevaju u spoljašnju sredinu (Fries 1988; De Graaf i sar., 1994). Izvor spora predstavljaju svakako obolele radilice kao i matica i inficirani vosak, med tj. ceo unutrašnji deo košnice (Malone i sar., 2001). Na radionici COLOSS-a (2009) kao i od strane Higes i sar. (2010) uvode se termini za nozemozu i to:

- a) nozemoza tip A - čiji je uzročnik *N. apis*
- b) nozemoza tip C - čiji je uzročnik *N. ceranae*

Ovakvom klasifikacijom kada je reč o nozemozi tip C može se reći da se odlikuje odsustvom simptoma koje su karakteristične za *N. apis* (Martín-Hernández i sar. 2007; Higes i sar., 2010). Istraživanja Stevanovic i sar. (2013) pokazala su da nozemoza u Srbiji nije „tipa C“, kao i da ne postoje simptomi koji mogu služiti kao markeri za predviđanje kolapsa pčelinjih društava.

A) *Nosema apis*

Zander (1909) opisuje i klasifikuje *N. apis* u grupu mikrosporidija kao parazita koji napada srednje crevo pčela. Međutim, postoje pisani tragovi o prisustvu ovog parazita koji je izazivao probleme u pčelarstvu pre nego što je navedeni parazit otkriven i opisan (Donhoff, 1857). Ranija pretpostavka da je *N. apis* direktno vezana za evropsku medonosnu pčelu (*A. mellifera*), a *N. ceranae* za azijsku medonosnu pčelu (*A. ceranae*) nije tačna na osnovu mnogih istraživanja koji pokazuju mešane infekcije (Fries i sar., 1996; Huang i sar., 2007; Klee i sar., 2007; Williams i sar., 2008; Tapasztó i sar., 2009; Giersch i sar., 2009). Areal rasprostranjenja ovog parazita predstavljaju hladni predeli

zbog veće otpornosti na oštre klimatske uslove (Forsgren i Fries, 2010; Higes i sar., 2013).

Klinička slika. Kada je reč o kliničkoj slici infekcija pčela *N. apis* može se manifestovati na:

a) *individulanim pčelama* - koje mogu imati određene promene na abdomenu (bledi i prošireni) (Fries, 1997). Takođe se može zapaziti promena u ponašanju pčela koje podrhtavaju i gube mogućnost letenja sa leta ili satonoša (OIE, 2018). Kod matice koje su inficirane može se zapaziti smanjeno polaganje jaja zbog degenerativnih promena na jajnicima (Liu, 1992).

b) *nivou pčelinjeg društva* - zbog promene ponašanja radilica može se zapaziti smanjenje prinosa pčelinjih proizvoda, slab razvoj društva, gubitak broja pčela kao rezultat skraćanja života pčela (Fries, 1993). Takođe, važan klinički znak prisustva *N. apis* jeste dijareja koja se može zapaziti po ramovima satnih osnova (OIE, 2018). Posledica slabog razvoja zajednice jeste i uticaj infekcije na rad hipofaringealnih žlezda koje imaju ulogu u proizvodnji mleča za ishranu legla (Wang i Moeller, 1970).

Dijagnoza. Dijagnoza se može postaviti na osnovu kliničkih simptoma, ali sigurna i tačna dijagnoza se svakako može postići upotrebom svetlosne mikroskopije detekcijom spora iz macerata kao i upotrebom molekularno genetičkih metoda.

B) *Nosema ceranae*

Pronalaskom *N. ceranae* kod azijske (Fries i sar., 1996) i evropske pčele (Higes i sar., 2006) i iscrpnim naučno istraživačkim radom na genomu nozeme kod ove dve vrste pčela može se zaključiti da ne postoje nikakve razlike u genomu, tj. barijera za ovu mikrosporidiju i ne postoje. Sve učestalije infekcije u S. Americi (Williams i sar., 2008) i Evropi (Stevanovic i sar., 2011; 2013) objašnjavaju se uticajem toplije klime gde je inače ovaj parazit dominantan za razliku od *N. apis* gde je njeno prisustvo vezano za hladnije krajeve. Mikrosporidija *N. ceranae* ima afinitet prema toplijim krajevima (Runckel i sar., 2011; Dainat i sar., 2012). Gisder i sar. (2010) u svojim istraživanjima govori o prisustvu sezonalnosti i generalno niskoj prevalenciji u Nemačkoj (1,3 – 14,9%). Takođe, U Srbiji, Stevanović i sar. (2013) govore o prisustvu sezonalnosti uz visoku opštu prevalenciju tokom cele godine (73-98%). Na prostoru Balkana *N. ceranae*

je dominantnija i ako je klima umerenija (Tlak Gajger i sar. 2010; Bacandritsos i sar. 2010; Stevanovic i sar. 2011; 2013; Simeunovic i sar., 2014a).

Patogeneza i klinička slika. Kada je reč putevima prenošenja i načinu širenja parazita *N. ceranae* su identični kao i kod *N. apis*. Razlika se ogleda u tome što se DNK nozemoze tip C nalazi i u drugim tkivima (malpigijeve cevčice, hipofaringealne i pljuvačne žlezde (Gisder i sar., 2010; Copley i Jabaji, 2011), glava, toraks, jajnici, spermateka i jaja (Traver i Fell, 2011), ali ovi nalazi još uvek nisu histopatološki potvrđeni izuzev u epitelnim ćelijama creva (Higes i sar., 2006; García-Palencia i sar., 2010). Upotrebom velike količine šećera i smanjena učestalost uzimanja hrane (Naug i Gibbs, 2009) što je i karakteristično kod obolelih pčela dolazi do smanjenja nivoa šećera u hemolimfi i rezultuje pojavom energetskeg stresa (Mayack i Naug, 2010). Matice u društvima u kojima je ustanovljeno prisustvo *N. ceranae* ispoljavaju značajno slabije reproduktivne i produktivne performanse (Simeunovic i sar., 2014a). Ovako obolela društva svakako su podložna i drugim bolestima kao što je krečno leglo (Hedtke i sar., 2011), a efikasnost borbe protiv pčelinjeg krpelja *V. destructor* je značajno smanjena (Botías i sar., 2011).

Dijagnoza. Dijagnoza se može postaviti kao i kod prisustva *N. apis* s tim kada je reč o razlikovanju između prisustva infekcije izazvane nozemozom tip A i tipom C svetlosna mikroskopija nije baš pouzdana zbog slične građe i veličine spora. Pouzdana detekcija i dijagnoza se svakako može postići pomoći savremenih molekularno genetičkim metodama: duplex-PCR (Stevanovic i sar. 2011, 2013), RFLP-PCR (Stevanovic i sar. 2011), real-time PCR (Traver i Fell, 2011) i metod izotermalne amplifikacije nukleinskih kiselina (eng. Loop mediated isothermal amplification – LAMP) (Ptaszyńska i sar., 2014).

Terapija i preventiva. Kada je reč o preventivnim merama potrebno je odabrati jake pčelinje zajednice, na pčelinjaku obezbediti dovoljnu količinu sveže tekuće pijaće vode i koristiti čist dezinfikovani pribor. Pored ovih mera potrebno je s vremena na vreme bar dva puta godišnje pregledati pčelinje zajednice (pred zazimljavanje i u proleće kada počinje intezivan rad pčelinje zajednice). U praksi pčelari svojom lošom apitehnikom ne sprovode ove navedene mere što i objašnjava visoku prevalencu obolelih društava od nozeme u pojedinim regionima (Stanimirović i sar., 2008; 2013). Upotreba Fumidil B ublažava infekciju *N. apis* bez štetnih posledica po pčele, za razliku od preparata Humatin i Nosemack neznatno smanjuju infekciju s tim što Nosemack ima i štetna

dejstva (Furgala i Boch, 1970). Upotreba fumagilina može smanjiti infekciju, ali samo dok se koristi. Prestankom upotrebe fumagilina dolazi do naglog propadanja društva zbog dodatne infekcije sa *N. ceranae*. Takođe, treba istaći da mnogi lekovi, pa i fumagilin kao antibiotik koji se koristi u pčelarstvu, predstavlja potencijalnu opasnost, kako za pčele, tako i za čoveka kao krajnjeg konzumenta pčelinjih proizvoda. Tu se pre svega misli na mutagen i genotoksični potencijal navedenih hemijskih supstanci pa i fumagilina među njima (Stanimirović i sar., 2007; 2008; Stevanović i sar., 2008). Pčele inficirane mikrosporidijom *Nosema ceranae*, imaju statistički značajno povećano mortalitet i samnjugenu ekspresiju većine gena značajnih za imunitet, tako uslovljavajući pojavu oksidativnog stresa pčela. Mnogi prirodni preparati, kao oni na bazi timola, izolovanog iz aromatičnog bilja, zatim, preparat na biljnoj bazi: Medenko forte i masno aminokislinsko-vitaminski preparat B⁺, onda, ekstrakt gljive *Agaricus blazei*, kao i veštački mineralno-vitaminski, aminokislinski suplement Beewell AminoPlus pokazali su značajnu antinozematoznu aktivnost podstičući aktivnost gena značajnih za imunitet pčela uz smanjenje njihovog oksidativnog stresa (Glavinić, 2019; Stanimirović i sar., 2019, Dolašević i sar., 2020; Dolašević, 2020).

2.3.5. Infekcije izazvane tripanozomama

Tripanozome (*Lotmaria passim* i *Crithidia mellificae*) pripadaju jednoćelijskim eukariotama. To su intracelularni paraziti koji su prisutni kod odraslih pčela (Schwarz i Evans, 2013). Zadnjih godina intenziviraju se istraživanja uticaja ovih tripanozoma na zdravlje pčela (Stevanović i sar., 2016, Vejnović, 2019).

Etiologija. Tripanozome pripadaju obligatornim parazitima i mogu inficirati različite vrste (kičmenjaci, biljke, insekti). Tripanozome poseduju mitohondrije koje imaju više kopija mitohondrijskog genoma. Promastigote mogu imati oblik lancete ili kruškolik sa jednim slobodnim bičem koji se ubacuje u flagelarni dzepni otvor. Sferoidne forme oblažu zid creva, a mogu se videti i u obliku agregata. Tripanozome često parazitiraju u srednjem ili zadnjem crevu insekata (Maslov i sar., 2013). Kod pčela (*A. mellificae*) i bumbara (*Bombus terrestris*) tripanozome su privukle pažnju naučnika, jer kod ovih vrsta imaju negativan uticaj (Brown i sar., 2003; Gegear i sar., 2005; Runckel i sar., 2011; Ravoet i sar., 2013; Schwarz i Evans, 2013).

Lotmaria passim (Schwarz i sar., 2015) i *Crithidia mellificae* (Langridge i McGhee, 1967) su tripanozome koje se nalaze kod medonosne pčele, a kod bumabra *C. bombi* (Koch i Schmid-Hempel, 2011).

Rasprostranjenost. Zbog negativnog uticaja tripanozoma na zdravlje bumbara, poslednjih godina i medonosne pčele, postaju predmet naučnih istraživanja kako bi se utvrdila tripanozomalna zastupljenost, a zatim i njihov negativn uticaj na zdravlje pčela. Cox-Foster i sar. (2007) u svom radu govore da društva koja su bila pogođena CCD bila opterećena i sa tripanozomama. U tom periodu nisu se razlokovale tripanozome, pa su označene kao *Leptomonas - Crithidia*. Ovu činjenicu potvrđuje i studija Evans i sar. (2009) u kojoj su analizirani uzorci iz košnica uzetih u periodu zime 2007 - 2008. u SAD i potvrdio prisustvo tripanozoma kako u obolelim tako i u zdravim (kontrolnim) košnicama. U Srbiji, tripanozoma vrste *L. passim* je utvrđena u uzorcima pčela prikupljenih u periodu 2007-2015 godine (Stevanović i sar., 2016). U ispitivanim uzrocima utvrđeno je prisustvo samo jedne vrste pčelinjih tripanozoma, *L. passim*, čija je godišnja zastupljenost bila u opsegu 38,9–83,3%, a prosečna zastupljenost za navedeni 9-godišnji period 62,3%. Ova detekcija *L. passim* u analiziranim uzorcima pčela predstavlja prvi nalaz ove vrste u Srbiji, a otkriće *L. passim* u uzorcima iz 2007. godine predstavljaju najstariji genetički potvrđen nalaz ovog parazita na globalnom nivou (Vejnović, 2018).

Runckel i sar. (2011) su identifikovali *C. mellificae*, ali nisu mogli da pronađu povezanost između *C. mellificae* i gubitka društava, ali koinfekcija sa mikrosporidijom *N. ceranae* i *C. mellificae* bila je u pozitivnoj korelaciji. Tripanozoma *C. mellificae* je označena kao faktor koji može uticati na zdravlje i vitalnost pčelinjih društava.

U periodu 2011 - 2012 na prostoru Belgije, veliki broj pčelinjih društava je uginuo (oko 50%). Ispitivanjem uzoraka identifikovano je prisustvo *V. destructor* koji je doprineo razvoju CCD, ali pored pčelinje grinje detektovani su i drugi patogeni (*V. destructor*, *N. ceranae* i *C. mellificae*) koji svojim sinergističkim delovanjem svakako utiču na razvoj CCD i posledično dovode do gubitka velikog broja pčelinjih zajednica (Ravoet i sar., 2013).

Morimoto i sar. (2012) tokom istpitivanja (2007-2012) pčelinjih uzoraka evropske medonosne pčele na prostoru Japana detektovao je prisustvo *C. mellificae*,

međutim ovu tripanozomu nije idnetifikovao kod azijske pčele (*A. ceranae*). Yang i sar. (2013) na prostoru Kine (2011-2012) tokom istraživanja detektovali su *C. mellificae* i kod *A. ceranae*, što se može zaključiti da ova tripanozoma može inficirati i druge vrste pčela.

Međutim, novijim istraživanjima od strane Schwarz i sar. (2015) ukazuju da je zapravo *L. passim* dominantna vrsta tripanozoma u pčelinjim zajednicama širom sveta, a ne *C. mellificae*, kako se ranije smatralo. Sa ovim rezultatima može se zaključiti da su gubici pčela u Americi (Cornman i sar., 2012) i Belgiji (Ravoet i sar., 2013), inicijalno protumačeni kao posledica parazitizma vrstom *C. mellificae*, zapravo bili izazvani vrstom *L. passim*. Istraživanja iz Srbije (Stevanović i sar., 2016) i Čilea (Arismendi i sar., 2016) ukazuju da *L. passim* predstavlja dominantnu tripanozomu kod evropske medonosne pčele.

Klinička slika. Zbog sinergističkog delovanja sa ostalim patogenima, a i zbog nedovoljno naučnih radova o direktnim štetnim uticajima tripanozoma na pčelinje zajednice i zajednice bumbara može se govoriti o uopštenom sinergističnom delovanju tripanozoma na zajednicu. Pčele i bumbari se inficiraju tripanozomama fekalno-oralnim putem (Ruiz-González i Brown, 2006; Runckel i sar., 2014). Društva bumbara koja su pod stresom mogu ispoljiti štetne efekte kada su inficirani sa *C. bombi* (Brown i sar., 2003; Yourth i sar., 2008), a štetan uticaj tripanozome na bumbare se ogleda u vidu smanjene sposobnosti za sakupljanje polena, smanjenog rasta i većeg mortaliteta (Koch i Schmid-Hempel, 2011). Takođe, inficiranim bumbarima treba više vremena da pristupe aktivnosti ka sakupljanju nektara, kao i da infekcija može uticati na njihovu sposobnost da u proleće osnuju novu koloniju (Brown i sar., 2003; Yourth i Schmid Hempel, 2006; Gomez-Moracho i sar., 2017).

Kada je reč o medonosoj pčeli koja tokom zimskih meseci ne uginjava, ako je društvo inficirano, količina infekta se svakako može povećati, a i omogućiti da se i veliki broj pčela inficira zbog međusobnog kontakta tokom zimovanja.

Dijagnoza. Dizajnirani su prajmeri za real-time PCR i obavljena optimizacija te metode koja obezbeđuje istovremenu detekciju i kvantifikaciju *L. passim*, a samim tim i detaljno praćenje *L. passim* infekcije na terenu (Stevanović i sar., 2016; Vejnović, 2018).

Na osnovu ovih navedenih informacija može se zaključiti da nauka još nema konkretne dokaze o direktnom uticaju navedenih tripanozoma, ali se svakako može zaključiti da sinergističkim delovanjem sa drugim patogenima nanose štetu u mnogim zemljama sveta gde se intenzivno pčele uzgajaju (Goulson i sar., 2015; Lee i sar., 2015) i potpomažući nastanak kolapsa pčelinjih zajednica što na kraju dovodi do gubitka velikog broja pčelinjih zajednica. Zbog gore navedenih činjenica i istraživanja, da bi razumeli patogenezu, a posledično i razvoj nastanka kliničke slike potrebna su dodatna istraživanja.

2.4. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres se može definisati kao disbalans u ravnoteži između proizvodnje reaktivnih oblika kiseonika i antioksidativne odbrane (Betteridge i sar., 2000). Reaktivni oblici kiseonika (ROS) su slobodni radikali koji su važni za ćelijske funkcije i generisani su u različitim biološkim procesima. Slobodni radikal je nestabilan i visoko reaktivan molekul, koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona. Uključeni su u regulaciju različitih metaboličkih procesa u ćeliji kao i u procese intercelularne signalizacije, sa izraženim baktericidnim dejstvom (Evans i Halliwell, 1999). ROS, takođe, mogu da izazovu starenje ćelija, indukuju apoptozu kao i regulacione puteve rasta ćelija (Valko, 2006). Oni se generišu kao nusproizvodi aerobne respiracije, u procesu oksidacije organskih jedinjenja pri čemu nastaju superoksidni anjon (O_2^-) i vodonik peroksid (H_2O_2). Ćelijski izvori ROS-a proizvode se dejstvom različitih oksidativnih enzima, koji uključuju plazma membranski nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazu, intracelularnu citosolnu ksantin oksidazu, peroksizomalne oksidaze, endoplazmatske retikularne oksidaze i komponente mitohondrijskog elektronskog transporta (Bandyopadhyay i sar., 1999). Osim toga, ROS takođe nastaje, autooksidacijom kateholamina, ubihidrokinona, hemoproteina i enzima flavina (Ahmad i Pardini, 1990). Kao odgovor na nutritivni stres, ćelije ulaze u proces autofagije koja može dovesti ili do adaptacije ili do smrti. Rezultati autofagije indukovane gladovanjem i proizvodnjom reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), su pre svega oštećenja DNK molekula, aktivacija PARP-1 (eng. Poly [ADP-ribose] polymerase 1) i inhibicija mTOR-a (eng. mammalian target of rapamycin). ROS se prirodno sintetiše u svim ćelijama organizma,

a modifikacija normalnih uslova utiče na sintezu ROS i vodi pojavi oksidativnog stresa. Kod medonosne pčele izvor ROS je mikrozomalna oksidacija ksenobiotika. Mikrozomi sadrže enzime citohroma P450 (CYPs) koji katalizuju polivalentnu oksidaciju slobodnih radikala i štetnih ksenobiotika koji simultano generišu O_2 i druge ROS. Sistem CYP hidroksilaze uključuje flavoproteine i familiju hemoproteina koji su lokalizovani na membrani endoplazmatskog retikuluma. Različite izoforme CYP su uključene u metabolizam različitih ksenobiotika (Tellam i sar., 1999; Zhao i sar., 2010). CYP grupe se razlikuju na osnovu metabolizma endogenih i egzogenih supstanci. Mikrozomalna glutation S transferaza (GST) je usko povezana sa CYP sistemom koji doprinosi brzom inaktivaciji aktivnih metabolita nastalih tokom metabolizma ksenobiotika. Mikrobiom intestinalnog sistema je najgušća populacija u kojoj postizanje homeostaze između potencijalnih patogena i brojnosti mikroorganizama predstavlja veliki imunološki izazov u crevnom sistemu (Gruenewald sar., 2009). Svaki organizam pa i pčelinji kontrolu patogena postiže aktivacijom enzima koji proizvode ROS. Dvostruka oksidaza (DUOX) je član porodice nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze (NADPH oksidaza) i najvažniji je enzim koji se izlučuje iz enterocita kao odgovor na prisustvo patogena (Zhao i sar., 2010; Kounatidis i Ligoxygakis, 2012). ROS se sintetišu u mnogim fagocitima kao odgovor na interakciju ligand-fagocit (McConville i sar., 2007; Wagner i sar., 2008) koji svojom antimikrobnom aktivnošću štiti ćelije od infektivnih patogena. U početku se proizvodi superoksidni anjon (O_2^-) koji se, potom, spontano ili enzimski pretvara u H_2O_2 (vodonik peroksid) što rezultuje stvaranjem još toksičnijih produkata: hidroksilni radikal (OH^\cdot) i sinventni kiseonik (IO_2). ROS su direktno toksični, ili ispoljavaju antimikrobnu aktivnost u sinergizmu sa lizozomnim hidrolazama i/ili reaktivnim oblicima azota (RNS), kao i sa enzimskim kompleksom NADPH oksidaza koji su vezani za plazma membranu (Koppenol i sar., 1992). Zagađenost životne sredine usled kontaminacije vazduha, zemlje i vode različitim fizičkim, hemijskim i biološkim agensima može biti jedan od značajnih faktora koji vode oksidativnom stresu živih organizama pa i pčela. Jedinjenja koja se koriste u industriji i poljoprivredi, uključujući metale, metaloide i različita organska jedinjenja mogu indukovati oksidativni stres stvaranjem ROS kod beskičmenjaka (Ahmad, 1995). Fenolna jedinjenja (flavonoidi i tanini) koja se nalaze kod biljaka i imaju odbrambenu ulogu mogu proizvesti slobodne radikale kod insekata koji se hrane

na tim biljkama (Sakihama i sar., 2002). Poremećaj homeostaze metalnih jona, takođe, dovodi do oksidativnog stresa uslovljavajući povećanje produkcije ROS i remećenje antioksidativne zaštite organizma, indukujući uslove za razvoj simptoma brojnih bolesti (Hybertson i sar., 2011). Metali kao što su Fe (gvožđe), Cu (bakar), Cr (hrom), Co (kobalt) indukuju sintezu superoksidnih i hidrokslinih radikala (Fentonska reakcija) i drugih ROS što uslovljava produkciju malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala (HNE) i drugih egzocikličnih DNK produkata koji su kancerogeni i mutageni. Takođe, redoks negativni metali Cd (kadmijum), As (arsen) i Pb (olovo) izazivaju toksično vezivanje za sulfidrilne grupe proteina i depleciju glutaciona (Chaitanya i sar., 2016). Oksidativni stres je posledica disbalansa između proizvodnje i uklanjanja ROS i RNS produkata. ROS i RNS imaju dvostruku ulogu u biološkim sistemima koje mogu biti štetne, ali i korisne i stvaraju se:

- a) tokom UV, rentgenskim X i gama zračenjem;
- b) kao proizvod reakcije katalizovani metalima;
- c) u atmosferi kao zagađivači;
- d) u neutrofilima i makrofagima tokom inflamatornih procesa (Valko i sar., 2006).

Proizvodnja slobodnih radikala se kontroliše pomoću mehanizama antioksidativne odbrane (Evans i Halliwell, 1999) koja može biti enzimska i neenzimska. Medonosna pčela, koja spada u insekte, kao i druge vrste životinja poseduje skup enzima koji imaju ulogu u uklanjanju različitih radikala (Krishnan i Kodrik, 2006; Krishnan i sar., 2007a; 2007b) kao što su: superoksid dismutaza (SOD) koja je prisutna u citosolu i mitohondrijama, katalaza (CAT) prisutna u peroksidomima, askorbat peroksidaza (Mathews i sar., 1997) glutation S transferaza (GST) peroksidaza, tireodoksin/tireoreduktazni sistem (Krishnan i sar., 2009) itd. Pored enzimskih sistema insekti poseduju i neenzimske sisteme kao što su: karotenoidi, α -tokoferol, askorbinsku kiselinu, glutation (Yu, 1994; Felton i Summers, 1995; Kanzok i sar., 2001; Krishnan i sar., 2009), mokraćnu kiselinu, poliole, feritin i transferin (Felton i Summers, 1995).

Patogeneza i klinički simptomi oksidativnog stresa. Oksidativni stres je rezultat poremećaja u oksidativnom balansu antioksidanata što dovodi do oštećenja ćelija i organa. U suštini oksidativni stres nastaje kada produkcija bioaktivnih oksidativnih proizvoda nadmašuje kapacitet endogenog antioksidativnog odbrambenog sistema

(Nisar i sar., 2013). Oksidativni stres narušava intracelularno okruženje što rezultuje stvaranjem obolelih ćelija kao i smanjenjem preživljavanja samih ćelija. ROS može uticati na različite funkcije reproduktivnog sistema, a preveliki nivoi ROS mogu dovesti do patoloških promena u reprodukciji (Moreira da Silva i sar., 2010). Patološki efekti se ostvaruju pomoću različitih mehanizama koji uključuju oštećenje lipida, inhibiciju sinteze proteina i osiromašivanje ATP-a (Ray i sar., 2004). ROS, na primer $O^{\cdot-2}$ difunduje i prolazi kroz ćelijsku membranu tako da menja ćelijske molekule (lipide, proteine, nukleinske kiseline). Takođe, Sordillo i sar. (2009) u svom radu govore o uticaju ROS na DNK tako što prekidaju lance DNK.

Nagle fiziološke i bihevioralne promene izazivaju oksidativni stres u telu životinja. Razlog nastanka oksidativnog stresa je višestruk i obuhvata veliki broj različitih faktora koji su genetičke prirode u sadejstvu sa ekološkim faktorima. Klimatski, ekološki, nutricionisti, fizički, socijalni, fiziološki stresori svakako utiču i smanjuju dobrobit i performanse životinja (Freeman, 1987). Aktivnost Cu/Zn SOD, CAT i GPx (eng. glutathione peroxidase) se smanjuje ukoliko postoji deficit Cu kod životinja. Nisar i sar. (2013) u svom radu navode da su optimalne koncentracije Cu neophodne za održavanje strukture i integriteta DNK tokom oksidativnog stresa. Takođe, može se zaključiti da kod životinja kod kojih se razvio oksidativni stres smanjuje i posredovani ćelijski imunski odgovor.

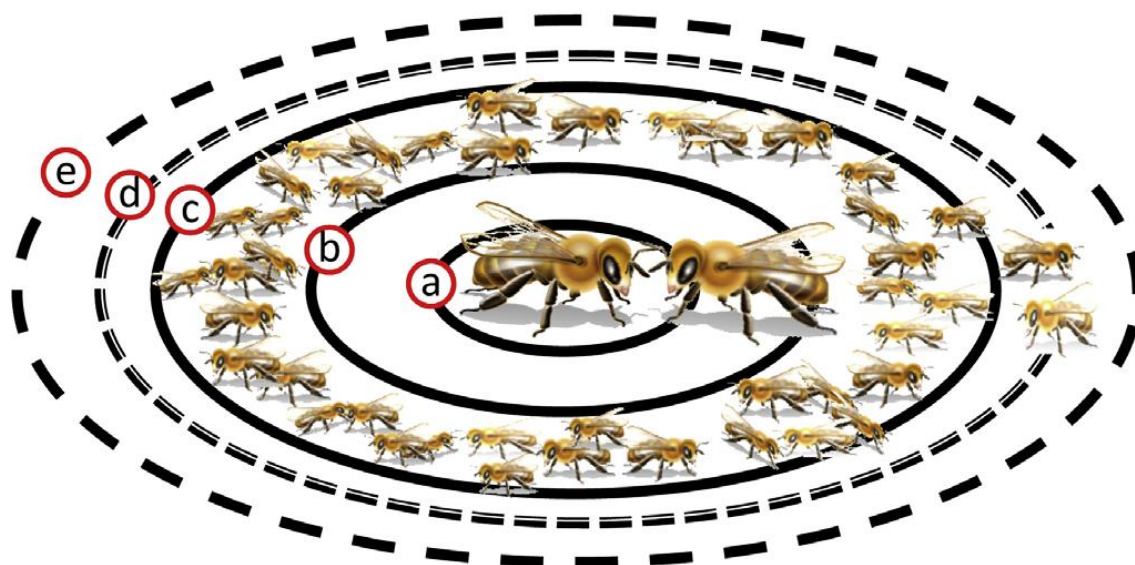
Oksidativni stres kod medonosne pčele. Pčele su izložene brojnim zagađivačima koji kontaminiraju njihovo stanište kako iz atmosfere i vode ili posredno konzumacijom polena i nektara od biljaka koje rastu u zagađenom prostoru (Lambert i sar., 2012). Pčele mogu biti dobar biološki pokazatelj za otkrivanje organskih i neorganskih zagađivača iz okoline uzimajući u obzir njihov veliki radijus kretanja (Beekman i Ratnieks, 2000). Oksidativni stres može da predstavlja dobar biološki marker za praćenje dejstva polutanata na fiziološke parametre pčela (Korayem i sar., 2012). Stanište može znatno uticati na zdravlje pčela. U radu Nikolić i sar. (2015) ispitivali su odgovor antioksidativnih enzima na prisustvo toksičnih metala kod medonosne pčele na tri različite lokacije u Srbiji i ustanovili veću koncentraciju olova (Pb) u telu pčela iz industrijskih krajeva u odnosu na stanište pčela koje nije imalo razvijenu industriju. Takođe, povećana ekspresija gena SOD i CAT kod pčela iz urbanih i industrijskih staništa govori da se pčelinji organizam i te kako prilagođava na povećan oksidativni

stres, a da su antioksidativni enzimi pčela pod značajnim uticajem zagađenja životne sredine. Pored teških metala, hemioterapeutici koji se koriste u suzbijanju varoe takođe imaju uticaj na zdravlje pčela. Žikić i sar. (2020) ispitali su efekat kumafosa i amitraza i ustanovili da korišćeni hemioterapeutici znatno utiču na oksidativni status pčela. Kumafos je doprineo smanjenju oksidativnog stresa koji se razvio kod pčela infestiranim varom. Pored genotoksičnog uticaja amitraza na DNK, Radaković i sar. (2013) su ustanovili i uticaj amitraza na razvoj oksidativnog stresa. Orčić i sar. (2017) su ustanovili da postoji razlika antienzimske odbrane između letnjih i zimskih pčela radilica ukazujući na smanjeni nivo antioksidativne enzimske odbrane tokom zimovanja što je verovatno posledica smanjene proizvodnje ROS. Treba naglasiti da razvoj oksidativnog stresa može biti iniciran nizom faktora uključujući okruženje gde pčele borave, zatim prisustvo pesticida u košnicama i pašnjacima (Nikolić i sar., 2015), ali nepravilna primena apitehničkih mera, prisustvo patogena i sam način pčelarenja mogu, takođe, uticati na razvoj oksidativnog stresa (Tarić i sar., 2019, Tarić i sar., 2020).

2.5. SOCIJALNI IMUNITET PČELA

Prvu definiciju socijalnog imuniteta postavio je Cremer i sar. (2007) objašnjavajući da socijalni imunitet predstavlja „kolektivno delovanje ili altruističko ponašanje koje rezultuje izbegavanjem, kontrolom ili eliminacijom parazitskih infekcija“. Zatim, Wilson-Rich i sar. (2009) definišu da socijalni imunitet predstavlja „kolektivnu odbranu protiv parazita i patogena tj. odbrana na nivou grupe od parazita izražena u društvima eusocijalnih insekata (i donekle u grupama primata). Ove odbrane su uključivale bihevioralno ponašanje gde individua sređuje drugu individuu radi uklanjanja ektoparazita kao i higijensko ponašanje uklanjajući iz legla obolele larve (Cremer i sar., 2007; Wilson-Rich i sar., 2009). Na osnovu ovih definicija Meunier (2015) predlaže da se socijalni imunitet definiše kao „svaki kolektivni i lični mehanizam koji se javlja i/ili održava barem delimično zahvaljujući odbrani protiv parazita koju pruža ostalim članovima grupe“. Formiranje socijalnog imuniteta može umanjiti izražavanje individualnog imuniteta zbog ulaganja u socijalni imunitet (Evans i sar., 2006; Cremer i sar., 2007; Cotter i Kilner, 2010). Tri genomske i dve fiziološke studije su sprovedena na eusocijalnim i neeusocijalnim insektima i podržale su ovu tvrdnju (Evans i sar., 2006, Weinstock i sar., 2006; Miller i Simpson, 2010; Richter i

sar., 2012; Wang i sar., 2013). Društveni život može biti od koristi mnogim organizmima, ali izaziva i velike trškove, naročito zbog povećane mogućnosti izbijanja bolesti i potencijal patogena i parazita da iskoriste veliku brojnost individua (Schmid-Hempel, 1998). To je sigurno slučaj sa socijalnim inkestima, koji obično žive u velikim kolonijama sa stalnom interakcijom među pojednicima. Konzorcijum za sekvencioniranje genoma pčele otkrio je da medonosne pčele (*Apis mellifera*), koje neguju izrazito socijalni životni stil, imaju prilično slabiji individualni imunitet u poređenju sa nesocijalnim insektima (Evans i sar., 2006). Autori su istakli da imunološka zaštita individualnih pčela može nadoknaditi određenim ponašanjem na nivou društva pomoću socijalnog imuniteta (Cremer i sar., 2007). Medonosna pčela gradi leglo, a izgradnja legla se često smatra jednim aspektom socijalnog imuniteta, jer uskladišteni med i matični mleč sadrže antimikobne materije, koje su sintetisale odrasle pčele radilice (Morse i Flottum, 1997). Postoji nekoliko načina ponašanja koja smanjuju opterećenje parazitima i patogenima. Na primer, higijensko i negovateljsko ponašanje je karakteristično za individue koje mogu otkriti i ukloniti bolesne larve pre nego što se razvije infektivna faza (Ćirković, 2002; Stanimirović i sar., 2005a,b; Stevanović i sar., 2007, 2011; Muñoz i sar., 2012). Ovakava društva su otporna na prisustvo uzročnika krečnog legla, američke truleži i grinje varoe (Wilson-Rich i sar., 2009). Prikupljanje smole sa različitih biljaka pčelama omogućava da redukuju efekte patogena (Langenheim, 2003). Medonosna pčela, na zadnjim ekstremitetima sakuplja smolu i polen, gde ga deponuje u saće, mešajući ga sa različitom količnom voska proizvodeći propolis. U radu Simone i sar. (2009) se navodi da biljne smole dovode do znatnog smanjenja ekspresije dva gena (hymenoptaecin i AmEater) kao i do smanjenog opterećenja bakterija u društvima. U pogledu ljudskog zdravlja i bolesti poklonjena je znatna pažnja o antimikrobnim svojstvima propolisa (Bankova, 2005). Socijalni imunitet je rezultat saradnje pojedinaca unutar grupe u borbi protiv povećanog rizika od prenosa boleti koji proizilazi iz socijalnog grupnog života (Cremer i sar., 2007). Sam opstanak pčela zavisi od mehanizama odbrane organizma sa jedne strane i agenasa koji se nalaze u spoljašnjoj sredini sa druge strane. Socijalna organizacija kod medonosne pčele je složena i postoje različiti mehanizmi odbrane (**Slika 5.**).



Slika 5. Nivoi odbrane u pčelinjem društvu: (a) individualni mehanizmi odbrane (b) interakcije između dve jedinice kao što je uzajamno čišćenje (c) kolektivni mehanizmi odbrane u kojima značajnu ulogu ima podela rada (d) minimiziranje ulaska infektivnih agenasa, patogena i parazita (e) korišćenje propolisa i drugih resursa iz spoljašnje sredine za zaštitu pčelinjeg društva (Evans i Spivak, 2010).

Medonosna pčela socijalni imunitet ostvaruje pomoću mehanizama koji proističu iz bihevioralnog ponašanja koje pomaže zajednici da se odbrani od patogena (Cremer i sar., 2007; Wilson-Rich i sar., 2009). Ulaganje u individualni imunitet ima visoku cenu za društvo (Evans i Pettis, 2005). Udruživanje zajedničkih mehanizama (materijalnih, enregetskih) omogućuje društvu efikasniju i ekonomičniju borbu protiv agenasa iz spoljašnje sredine te na taj način je kroz evoluciju formiran socijalni imunitet insekata koji je analogan ćelijskom i humoralnom imunitetu viših organizama (Cremer i Sixt, 2009). Za razvoj socijalnog imuniteta kod pčela veoma je važna socijalna organizacija društva (**slika 5**), jer učestali kontakti između jedinki i legla imaju važnu ulogu u prenošenju patogena.

Aktivnost enzima glukoza oksidazi (GOX) ima ulogu da „konzervira“ pčelinje proizvode (med i perga) i spreči njihovo kvarenje (Visscher, 1980). Mnogobrojni sekret, a između ostalog i GOX se sintetiše u egzokrinim žlezdama koji katalizuje β -D glukozu do glukonske kiseline i vodonik-peroksida koji ima antiseptička svojstva i na

taj način doprinosi dodatnoj zaštiti i razvoju socijalnom imunitetu. Alaux i sar. (2010) navode da aktivnost enzima GOX zavisi od ishrane. Bogata, izbalansirana poliflorna ishrana povećava aktivnost GOX i doprinosi jačanju imuniteta za razliku od monoflorne ishrane. Pčele više teže ka poliflornoj ishrani kada im je na raspolaganju različito mednosno bilje.

Prisustvo bolesti kod divljih pčelinjih zajednica, a takođe, i kod tradicionalno gajenih pčela u trmkama, nije dovoljno ispitano, ali se može osnovano pretpostaviti da je pojava bolesti pčelinjeg legla i odraslih pčela kod njih mala, naravno, što nameće potrebu intezivnih istraživanja u ovoj oblasti. Postupci pčelara, zatim globalizacija i ili industrijalizacija remete ravnotežu na štetu pčela dovodeći do velikih gubitaka kako kod komercijalno, i tradicionalno gajenim pčelama, tako i među divljim pčelinjim zajednicama vrste *A. mellifera* širom sveta (Goulson i sar., 2015). Činjenica, da komercijalno gajena društva imaju malu verovatnoću preživljavanja ukoliko se ne leče, dok divlja društva obično preživljavaju u prirodi gde se očekuju veći pritisci patogena zbog odsustva tretmana (Hinshaw i sar., 2020). Na osnovu činjenice da tradicionalne košnice u jugozapadnoj Srbiji nisu nikada ispitane na prisustvo bolesti legla kod pčela, osmišljena su istraživanja ove doktroske disertacije i određeni cilj i zadaci. Razlog za odabir navedenog regiona su rezultati dugogodišnjih citogenetičkih, bihejvioralnih i molekularno - genetičkih istraživanja pčela sjeničko-peštorskog regiona koja su ukazala na diferencijaciju lokalno adaptiranog sjeničko-peštorskog ekotipa pčela na osnovu karakterističnih markera na nivou hromozoma, mitohondrijalne DNK (Stanimirović i sar., 2005a; Muñoz i sar., 2012) i specifičnih bihejvioralnih mehanizama odbrane od patogena i parazita (Ćirković, 2002; Stanimirović i sar., 2005b; Stevanović i sar., 2007, 2011).

3. CILJ I ZADACI RADA

Cilj doktorske disertacije je bio ispitati da li između analiziranih grupa pčelinjih zajednica postoje razlike u pogledu prisustva patogena i pojave bolesti pčelinjeg legla i odraslih pčela, uz analizu bioloških (ekspresije GOX gena kao parametra socijalnog imuniteta i faktora oksidativnog stresa) i antropogenih faktora (menadžment u pčelarstvu) kod tradicionalno i komercijalno gajenih pčelinjih zajednica sa inaparentnim i aparentnim infekcijama.

Za postizanje navedenog cilja, postavljeni su sledeći zadaci:

1) Uporediti opterećenost uzročnicima bolesti legla (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Ascosphaera apis* i *Morator aetotulas*) kod tradicionalno i savremeno gajenih pčelinjih društava;

2) Ispitati da li je izbijanje bolesti pčelinjeg legla (američke truleži, evropske truleži, krečnog legla i mešinastog legla) češće kod tradicionalno gajenih ili kod savremeno gajenih pčelinjih zajednica;

3) Proceniti ulogu nekih predisponirajućih bioloških (genetičkih faktora i faktora oksidativnog stresa) i antropogenih faktora (menadžmenta u pčelarstvu) na pojavu bolesti pčelinjeg legla.

Osim navedenih zadataka u prijavi doktorske disertacije u toku njene izrade postavili smo i realizovali još tri dodatna istraživačka zadataka:

4) Uporediti stepen opterećenosti tradicionalno i savremeno gajenih pčelinjih zajednica uzročnicima bolesti odraslih pčela (virus akutne paralize pčela, virus hronične paralize pčela, virus deformisanih krila i *Nosema sp.*, *Lotmaria passim* i *Crithidia mellificae*).

5) Odediti i uporediti parametre oksidativnog stresa (SOD, CAT, GST i MDA) kod tradicionalno i savremeno gajenih pčelinjih društava;

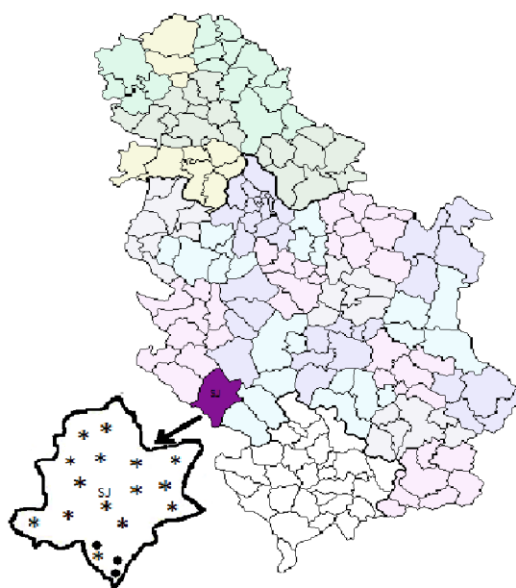
6) Ispitati ekspresiju GOX gena kao genetičkog parametra socijalnog imuniteta pčela kod tradicionalno i savremeno gajenih zdravih, inaparentnih i pčelinjih zajednica sa ispoljenom kliničkom slikom ispitivanih bolesti.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorkovanje materijala

Uzorci pčela uzeti su iz 144 naizgled zdravih pčelinjih društva (od toga su 24 pčelinja društva gajena u tradicionalnim košnicama – trmkama, a 120 u komercijalnim košnicama) iz 18 pčelinjaka, koji se nalaze na 1059 km² površine Peštarske visoravni, u jugozapadnom delu Srbije (43° 16' 14" N, 19° 59' 35" E; Slika 6). Istraživački rad na terenu je sproveden na ujednačenim pčelinjim društvima (društva pripremljena za zimovanje). Komercijalne košnice pripadale su pčelarima koji ne sele košnice. Na osnovu izjave pčelara matice su kupljene, a njihova starost bila je 1-3 godine. Tradicionalno gajena društva u trmkama nisu manipulisana ni na koji način tj. nisu tretirana nijednim veterinarskim preparatom, niti su se društva prihranjivala dodatno (šećerom i/ili medom). Smena matica se obavljala prirodnim putem. Iz odabranih pčelinjih društava uzeti su uzorci legla minimalne veličine 10x10cm i propisno upakovani u odgovarajuću ambalažu (OIE, 2013; Sl. glasnik RS, br. 25/2016) kako bi se ispitali na prisustvo uzročnika bolesti pčelinjeg legla (američka trulež legla, evropska trulež legla, virus mešinastog legla i krečno leglo). Uzorci od najmanje 180 odraslih pčela (60 za detekciju nukleinskih kiselina virusa i 60 za detekciju nozeme i 60 za detekciju tripanozoma) sakupljeni su sa perifernog saća plodišta ili iz medišta i analizirani na prisustvo virusa pčela (virus akutne paralize pčela (ABPV), virus hronične paralize (CBPV) i virus deformisanih krila - DWV), mikrosporidije roda *Nosema sp.* i tripanozoma *L. passim* i *C. mellificae*. Odrasle pčele su uzete pomoću plastične čaše sa ramova. Uzorkovanje i pregled obavio je autor ovog rada. Uzorkovanja obavljeno je anketiranje pčelara na posećenim pčelinjacima pomoću upitnika (ankete) (prilog 1) koncipiranog na osnovu aktuelnih upitnika koji se koriste u Evropi (Brodschneider i sar., 2016; Chauzat i sar., 2016) koji sadrži informacije o: lokaciji i životnoj sredini gde se nalazi pčelinjak, pčelinjaku i načinu pčelarenja (stacionirano, seleće), vlasniku, odnosno o pčelaru (iskustvo, starosna dob, brojnost košnica), proizvodnji pčelinjih proizvoda na pčelinjaku, zdravstvenom stanju pčelinjih društava (prethodni gubici pčelinjih društava), ishrani/ prihrani pčelinjih društava, uključenim veterinarskim tretmanima i suplementima. Na osnovu broja košnica određen je i tip pčelarenja i to: hobističko pčelarenje 1-20 košnica; poluprofesionalno pčelarenje

21-50 košnica i profesionalno pčelarenje >50 košnica. Takođe, obavljen je klinički pregled svih 144 pčelinja društava uz beleženje kliničke slike i procenu jačine pčelinjih društva merenjem površine legla (otvorenog i zatvorenog), površine saća sa hranom (količine meda i perge) i brojnosti odraslih pčela u društvu (prilog 2). Određivanje površine legla kao i prisustvo hrane i brojnost odraslih pčela u društvu određeni su po metodi Delaplane i sar. (2013). Sakupljene žive odrasle pčele su analizirane na prisustvo *Nosema sp.*, pčelinjih virusa (ABPV, CBPV, DWV) i tripanozoma *Lotmaria passim* i *Crithidia mellificae*. Kod njih je, takođe, analiziran nivo iRNK za gen GOX i obavljene analize parametara oksidativnog stresa (SOD, CAT, GST i MDA). Uzorci su stavljeni u sterilne epruvete za jednokratnu upotrebu, zapremine 20 ml, koje su zatim upakovane u transportnu torbu sa suvim ledom i čuvane u laboratoriji na -20°C do dalje obrade.



Legenda: SJ- sjeničko-pešterska visoravan, * Komercijalne košnice • Tradicionalne košnice - trmke

Slika 6. Distribucija 18 pčelinjaka na prostoru sjeničko-pešterske visoravni odakle su sakupljeni uzorci pčela (Republika Srbija)

4.2. Detekcija i determinacija vrste mikrosporidija roda *Nosema*

Detekcija spora obavljena je nekvantitativnom metodom koju preporučuje OIE (2013). Svaki homogenizovani uzorak pregledan je svetlosnim mikroskopom (Leica Microsystems, Nemačka) pri uveličanju 400x u cilju utvrđivanja prisustva spora mikrosporidija vrsta *Nosema* sp. Suspenzije svih uzoraka i pozitivnih i negativnih, podvrgnute su PCR analizi, kako bi se proverila pouzdanost prethodne metode. Za ekstrakciju DNK iz ispitujućih uzoraka, 1 ml suspenzije spora ispran je dva puta bidestilovanom vodom i centrifugiran (5 min, 16100×g). Suspenzija spora zamrznuta je u tečnom azotu i usitnjena u sterilnoj ambalaži. Za ekstrakciju DNK iz ispitujućih uzoraka korišćen je DNeasy Plant Mini Extraction Kit (Qiagen, Nemačka). Ekstrakt DNK čuvan je na -20°C do upotrebe za PCR. Za detekciju *Nosema* sp. i određivanje vrste, korišćene su dve metode: dupleks PCR sa prajmerima specifičnim za vrste (321APIS-FOR/REV za detekciju *N. apis* i 218MITOC-FOR/REV za detekciju *N. ceranae*) koje su dizajnirali Martín-Hernández i sar. (2007) i PCR-RFLP sa nos-16S-fw/rv prajmerima autora Stevanović i sar. (2011) za uzorke koji nisu uspeli da proizvedu amplikon u dupleks PCR. Obe metode PCR su obavljene na isti način po metodologiji koju je opisala Stevanović i sar. (2011). Uzorci kod kojih je potvrđeno da su nozema negativni posle amplifikacije pomoću nos-16S-fw/rv prajmera nisu podvrgnuti digestiji sa restrikcionim enzimima.

4.2.1. Priprema uzoraka za ekstrakciju RNK i DNK

Priprema uzoraka obavljena je na osnovu preporuke OIE (OIE, 2018). Nakon homogenizacije uzorak je centrifugiran 15 minuta na 5000 x g. Ekstrakcija RNK iz uzoraka odraslih pčela obavljena je pomoću „Quick-gRNATM MiniPrep” (Zymo Research, SAD) prema preporukama proizvođača, sa 140 µL supernatanta. Ekstraktovana RNK je kvantifikovan na spektrofotometru (BioSpec-nano, SHIMADZU) i prevedena u cDNK korišćenjem seta „FastGene 55-Scriptase cDNA Synthesis“ (Nippon Genetics, Japan) primenom RT-PCR. Ekstrakcija DNK iz uzoraka larvi legla obavljena pomoću QIAamp DNA (Qiagen, Nemačka) i DNeasy Plant Mini Extraction Kit (Qiagen, Nemačka) prema preporuci proizvođača. Izolati su čuvani na -20°C do upotrebe.

4.3. Real time PCR amplifikacija pčelinjih virusa

Za detekciju RNK virusa pomoću real time PCR korišćene su pozitivne kontrole za ABPV, CBPV, DWV i SBV dobijene od Veterinarskog instituta „Kraljevo“ (Srbija). Pozitivne kontrole su dobijene korišćenjem konvencionalnog RT-PCR i dokazano je prisustvo sva četiri virusa sekvencioniranjem. Prajmer parovi i PCR program koji se koristi za RT-PCR preuzeti su od “French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety” (ANSES). Sve reakcije RT-PCR su odradene na Rotor-Gene Q 5plex aparatu (Qiagen, Nemačka). Uzorci su testirani na prisustvo ABPV, CBPV, DWV i SBV i pušteni pojedinačno. Prajmeri i probe (Tabela 1) su odabrani na osnovu rada koji su objavili Chantawannakul i sar. (2006). Prajmeri i TaqMan probe su dobijene od Eurofins MWG Operon (Germany). Optimalna koncentracija prajmera je iznosila 800 nM, a probe 400 nM po reakciji. Ukupna zapremina jedne reakcije je iznosila 25 µL od toga: 12,5 µl of 2x RT-PCR Master Mix (Qiagen, Germany), 0.8 µM svakog prajmera (jedan par prajmera po reakciji), 0,4 µM svake probe, 0,25 µl RT Mix (Qiagen, Germany), voda i 2µl RNK uzorka. Korišćen je ranije opisan protokol za real time PCR (Chantawannakul i sar., 2006, Simeunović, 2015; Tarić i sar., 2020).

Tabela 1. Korišćeni prajmeri za detekciju pčelinjih patogena i tripanozoma			
Prajmeri za detekciju of <i>N. ceranae</i> i <i>N. apis</i> (multiplex PCR)			
Prajmer	Patogen	Sekvenca (5'–3')	Referenca
218MITOC-FOR 218MITOC-REV	<i>N. ceranae</i>	CGGCGACGATGTGATATGAAAAATATTA CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG	Martín- Hernández i sar., 2007
321APIS-FOR 321APIS-REV	<i>N. apis</i>	GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACATG	
Prajmeri za detekciju of <i>N. ceranae</i> / <i>N. apis</i> (multiplex PCR) pomoću PCR-RFLP			
Prajmer	Patogen	Sekvenca (5'–3')	Referenca
nos-16S-fw nos-16S-rv	<i>N. ceranae</i> <i>N. apis</i>	CGTAGACGCTATTCCTAAGATT CTCCCAACTATACAGTACACCTCATA	Stevanović i sar., 2011
Prajmeri za detekciju pčelinjih virusa			
Prajmer/proba	Patogen	Sekvenca (5'–3')	Referenca
APV95F APV159R APV121T	Acute bee paralysis virus (ABP V)	TCCTATATCGACGACGAAAGACAA GCGCTTTAATCCATCCAATTGA TTTCCCCGACTTGAC	Chantawanna kul i sar., 2006
CBPV304F CBPV371R CBPV325T	Chronic bee paralysis virus (CBPV)	TCTGGCTCTGTCTTCGCAA GATACCGTCGTCACCCTCATG TGCCCACTAATAGTTGGCAGTCTGC	
DWV958F DWV9711R DWV9627T	Deformed wing virus (DWV)	CCTGGACAAGGTCTCGGTAGAA ATTCAGGACCCCAACAAAT CATGCTCGAGGATTGGGTCGTCGT	
SBV311F SBV380R SBV331T	Sacbrood virus (SBV)	AAGTTGGAGGCGGYATTTG CAAATGTCTTCTACDAGAAGYAAGGATTG CGGAGTGGAAAGAT	
F- forward primer; R - reverse primer; T - probe. Probes consist of oligonucleotides with a 5'-reporter dye (FAM, 6-carboxy-Xuorescein) and a 3'-quencher (TAMRA, tetra-methylcarboxyrhodamine)			
Prajmeri za detekciju pčelinjih patogena koji izazivaju bolesti legla			
Prajmer/proba	Patogen	Sekvenca (5'–3')	Referenca
AFB-F AFB-R	<i>P. larvae</i>	CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G	Dobbelaere i sar., 2001
EFBFor EFBRev EFB T	<i>M. plutonius</i>	TGTTGTTAGAGAAGAATAGGGGAA CGTGGCTTTCTGGTTAGA FAMAGAGTAACTGTTTTCTCGTGACGGT	Budge i sar., 2010
3-F1 3-R1	<i>A. apis</i>	TGCTGTGCGGCTAGGTG CCACTAGAAGTAAATGATGGTTAGA	James i Skinner, 2005
Prajmeri za detekciju tripanozoma			
Prajmer	Patogen	Sekvenca (5'–3')	Referenca
LpCytb_F1 LpCytb_R	<i>L. passim</i>	cGAAGTgCaCATATATGCTTtAC gcCAaAcACCaATaActGGtAct	Stevanović i sar., 2016
CmCytb_F CmCytb_R	<i>C. mellifica</i>	AGTtTGAgCtGtGGaTTTgTt AACCTAtACaGGcACaGTTGC	
Prajmer	Enzim	Sekvenca (5'–3')	Referenca
GOX_F GOX_R	Glucose oxidase	GAGCGAGGTTTCGAATTGGA GTCGTTCCCCGAGATTCTT	Yang i Cox- Foster, 2005

4.4. Real time PCR amplifikacija evropske kuge pčelinjeg legla

Ispitivanje ekstrakta DNK na prisustvo evropske truleži obavljeno je pomoću real-time PCR testa korišćenjem specifičnih prajmera EFBFor (Tabela 1). Proba i prajmeri su reagovali samo sa ekstrahovanom DNK iz ispitujućih uzoraka na *M. plutonius* i nije došlo do unakrsne reakcije sa drugim bakterijama (Budge, 2010). Pozitivna kontrola dobijena je zahvaljujući kolegijalnoj ljubaznosti dr Orlando Yañeza (Institut za zdravlje pčela iz Berna, Švajcarska). Reakcija sadrži 1x bufferA, 0.025 U/μl, AmpliTaq Gold, 0.2 mM dNTP, 5.5 mM MgCl₂, 300 nM prajmer, 100 nM probe i 10μl ekstrakta DNK nukleinske kiseline. Ukupna zapremina po jednoj reakciji iznosi 25 μl (Budge i sar., 2010). Negativna kontrola je korišćena u svakoj reakciji. Reakcije su izvedene u duplikatu prema protokolu koji su opisali Budge i sar. (2010).

4.5. Kultivacija bakterija *Paenibacillus larvae*

Larve iz legla uzete su pomoću sterilnih briseva i suspendovane u 6 ml fiziološkog rastvora natrijum-hlorida (0,9% NaCl). Larve su izmecerirane i ceo sadržaj dobro homogenizovan. Formirana suspenzija je izložena toplotnom šoku na temperaturi od 95°C u trajanju od 4 minuta u cilju eliminacije vegetativnih oblika drugih mikroorganizama uključujući i druge sporogene mikroorganizme, kako bi se smanjila kontaminacija podloge (OIE, 2016). Za izolaciju *P. larvae* korišćena je MYPGP podloga (Dingmann i Stahly, 1983) uz dodatak pipemidinske (Alippi, 1995) i nalediksinske (Hornitzky i Clark, 1991) kiseline. Nakon zasejavanja uzoraka, petrijeve posude su odložene na inkubaciju u trajanju od 2-4 dana na temperaturi od 37°C uz dodatak 10% CO₂ kako bi se obezbedili mikroaerofilni uslovi. Pre kultivacije, sva oprema je sterilisana, a zasejavanje je obavljeno u kontrolisanim sterilnim uslovima. Odrasle bakterijske kolonije podvrgnute su mikroskopskom pregledu.

4.6. Liza spora bakterija *Paenibacillus larvae*

Kako bi se omogućilo oslobađanje bakterijske DNK iz spora, liza je obavljena pomoću *Enzymatic lysis buffer-a* i lizozima. U zapreminu od 10ml dodat je TE puffer koji sadrži: 20mM TRIS-HCl (pH 8,0) koji je dodat u svaki uzorak, 2mM EDTA, 0,5% (w/v) TritonX, 20 mg lizozima za 1ml. Dobijena smeša je inkubirana na 37°C tokom 1h. Nakon inkubacije dodato je 5 ml proteinaze K i lizat inkubiran na 56°C tokom 30

min. Zatim je dodato 200 ml pufera AL (Qiagen, Nemačka) i obavljena inkubacija u trajanju od 30 min na 56°C. Bakterijska DNK je izolovana pomoću QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Nemačka) prema upustvu proizvođača.

4.7. Kultivacija bakterija *Melissococcus plutonius*

Homogenizovana suspenzija zasejana je na selektivnu podlogu sa osnovnim modifikovanim medijumom (Bailey, 1957) za kultivaciju *M. plutonius* na ekstraktu kvasca, koji je dopunjen, skrobom, glukozom, cisteinom i agarom u anaerobnim uslovima, uz dodatak sterilisane nalidiksinske kiseline (Forsgren i sar., 2013), kako bi se sprečio rast sekundarnih bakterija. Referentni soj je kultivisan paralelno sa ispitujućim uzorcima.

4.8. Kultivacija gljivice *Ascospaera apis*

A. apis je izolovana iz sasušenih mumificiranih larvi blede-sive boje uzetih sa podnjače. Pre kultivacije, larve su potopljene u rastvor 10% natrijum-hipohlorita (NaClO) na 10 min i potom dva puta isprane u destilovanoj vodi u trajanju od 2 min. Mumificirane larve su isečene na sitnije deliće i postavljene na saburo dekstorznom agaru (SDA). Zasejane petri šolje inkubirane su na temperaturi od 30-34°C tokom 2-4 dana (Hornitzky, 2001; Jensen i sar., 2013).

4.9. PCR amplifikacija DNK *Paenibacillus larvae*

Reakciona smeša se sastojala od 2,5µl PCR buffer, 2µl MgCl₂, 0,25µl dNTP, oba prajmera po uzorku 0,5µM i taq polimeraze 0,3U, dH₂O i uzoraka DNK 5µl. Celokupna reakciona smeša je imala zapreminu od 25µl. Amplifikacija je urađena u PCR aparatu (Gradient Multigene Gradient Thermal Cycler, Labnet International, Inc.) prema protokolu koji su objavili Dobbelaere i sar. (2001). Amplifikovani proizvodi su na 0,8% agaroznom gelu očitani na UV transiluminatoru (Vilber - Lourmat). Približna veličina produkta je određena korišćenjem DNK lestvice od 100 bp.

4.10. PCR amplifikacija DNK *Ascospaera apis*

PCR analize obavljene su na DNK ekstrahovanoj iz uzoraka, u reakciji zapremine od 25 μ l koja sadrži 18,01 μ l vode bez nukleaza, 2,5 μ l 10x PCR buffer, 0,63 μ l 10mM dNTP, 1,5 μ l MgCl₂, 0,66 μ l oba prajmera po uzorku (10 μ M), 1 μ l uzorka DNA i 0,1 μ l Taq DNA polymerase (5U/ μ l, Eppendorf Hot Master Taq, Brinkmann Instruments, Westbury, SAD). Uslovi analize na konvencionalnom PCR aparatu su usaglašeni prema autorima James i Skinner (2005). PCR produkti su elektroforetski odvojeni na 1,5% agaroznom gelu.

4.11. PCR amplifikacija DNK *Lotmaria passim* i *Crithidia mellificae*

PCR smeša je izvedena u mikrotubama zapremine od 0,2 ml na PCR aparatu „Mastercycler Personal“ (Eppendorf, Germany). Kao negativna kontrola korišćena je voda bez nukleaza, a kao pozitivna kontrola DNK *L. Passim* i DNK *C. mellificae*. Ukupna PCR smeša iznosila je 20 μ l od toga za tripanozomu *L. passim* korišćeno je 14,9 μ l vode bez nukleaza, 2 μ l 10x KAPA Taq pufera iz kita, 0,4 μ l dNTP miksa koncentracije 10 mM, 0,4 μ l MgCl₂ koncentracije 25 mM, po 0,6 μ l prajmera LpCytb_F1 i LpCytb_R (Tabela 1) koncentracije 10 μ M, 0,1 μ l KAPA Taq DNK Polymerase koncentracije 5 U/ μ l i 1 μ l DNK izolata. PCR reakcija je izvedena prema protokolu: inicijalna denaturacija u trajanju od 2 minuta na 95°C praćena sa 40 ciklusa denaturacije od 30 sekundi na 95°C, 30 sekundi hibridizacija na 55°C i 20 sekundi ekstenzije na 72°C. Finalna ekstenzija je trajala 2 minuta na 72°C (Stevanović i sar., 2016; Vejnović, 2019).

Za amplifikaciju DNK tripanozome *C. mellificae* korišćeno je 14,9 μ l vode bez nukleaza, 2 μ l 10x KAPA Taq pufera iz kita, 0,4 μ l dNTP miksa koncentracije 10 mM, 0,4 μ l MgCl₂ koncentracije 25 mM, po 0,6 μ l prajmera CmCytb_F i CmCytb_R (Tabela 1) koncentracije 10 μ M, 0,1 μ l KAPA Taq DNA Polymerase koncentracije 5 U/ μ l i 1 μ l DNK izolata. Zapremina PCR reakcije iznosila je 20 μ l. PCR reakcija je izvedena prema protokolu koji se sastoji od inicijalne denaturacije u trajanju od 2 minuta na 95 °C praćena sa 40 ciklusa denaturacije od 30 sekundi na 95°C, 30 sekundi hibridizacije na 59°C i 20 sekundi ekstenzije na 72°C. Finalna ekstenzija trajala je 2 minuta na 72°C (Stevanović i sar. 2016; Vejnović, 2019).

Vizuelizacija amplifikovanih DNK sekvenci obavljena je elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu za *L. passim*, odnosno 1,8% agaroznom gelu za *C. mellifcae* u trajanju od 30 minuta i naponu od 100 V.

4.12. Priprema uzorka za spektrofotometriju

Korišćeno je pet odraslih pčela radilica za svaki pojedinačni uzorak, koje su homogenizovane u 0,05 M hladnom Tris-HCl puferu (pH 7.4) i centrifugirane 15 min, 10 000 g na +4°C. Supernatnat je korišćen za analizu parametara oksidativnog stresa na spektrofotometru Biobase BK-7390 UV-visible spectroscopy system (Biobase).

4.13. Parametri oksidativnog stresa

Aktivnost enzima katalaze (CAT) određena je po metodologiji Aebi (1984) korišćenjem H₂O₂ kao supstrata. Jedna jedinica CAT aktivnosti definiše se kao količina koja razlaže 1 mol H₂O₂ i izražena je kao U mg⁻¹ protein. Aktivnost CAT je određena pomoću spektrofotometrije talasne dužine 240 nm koristeći koeficijent ekstinkcije od 43,6 cm⁻¹.

Glutation-S-transferaza (GST) je odrađena po metodologiji Habig i sar. (1974), a spektrofotometrijsko određivanje GST je praćeno konjugacijom redukovano glutationa na 1-hloro-2,4-dinitrobenzen na 340 nm talasne dužine u trajanju od 3 minuta na temperaturi od 25°C. Enzimaska aktivnost GST je izražena u µmol/min/mg proteina. Aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) merena je indirektnim praćenjem stepena inhibicije autooksidacije adrenalina do adrenohroma u alkalnom medijumu na talasnoj dužini od 480 nm (Misra i Fridovich, 1972).

Koncentracija malondialdehida (MDA) je odrađena po metodologiji Girotti i sar. (1991), a zasniva se na merenju ljubičaste boje koja je nastala kao proizvod reakcije MDA i TBA kompleksa i određena na talasnoj dužini od 530 nm. Vrednost MDA je izražena u nmol/mg/protein koristeći molarni koeficijent ekstinkcije 1.56×10^{-5} /mol/cm.

Koncentracija proteina u homogenoj smeši određena je po metodologiji od strane Bradford (1976), a BSA je korišćen za izradu kalibracione krive.

4.14. Određivanje iRNK za ekspresiju gena enzima glukoza oksidaze

Ukupna RNK je izolovana iz uzoraka koji su bili u DNA/RNA Shield (Zymo) pomoću Quick-g RNATM MiniPrep (Zymo Research) prema upustu proizvođača. Ekstrahovana RNK je kvantifikovana na spektrofotometru BioSpec-nano Microvolume UV-Vis (Shimadzu) i prevedena u cDNK koristeći FastGene 55-Scriptase cDNA Synthesis set (Nippon Genetics) u RT-PCR. Kvantitativni real-time PCR je izveden sa KAPA SYBR® FAST qPCR Kits (KAPA BIOSYSTEMS) pomoću specifičnih prajmera (Tabela 1). PCR reakcija je imala zapreminu od 20 µl od toga SYBER master mix 10 µl, oba prajmera po 1 µl, uzorak 2 µl i dH₂O do 20 µl. PCR analize su rađene u triplikatu na PCR aparatu Multigene Gradient Thermal Cycler (Labnet International) koristeći sledeći protocol rada: 1 ciklus u trajanju od 3 minuta preinkubacije, zatim 45 ciklusa amplifikacije u trajanju od 30 sekundi na 94 °C, aniling na 60 °C u trajanju od 30 sekundi i ekstenzija na 72 °C u trajanju od 30 sekundi. Relativna kvantifikacija je izračunata metodom $2^{-\Delta Ct}$ (Evans, 2006) koristeći aktin kao kontrolni gen za normalizaciju ekspresije GOX gena.

4.15. Statistička obrada podataka

U cilju statističke obrade podataka za poređenje učestalosti u broju patogena između pčelinjih zajednica gajenih u komercijalnim i tradicionalnim košnicama korišćen je Fisher exact test. Ekstrapolacija podataka o broju patogena kod tradicionalnih košnica izvršena je pomoću aplikacije EstimateS (Colwell i sar., 2004; Colwell i sar., 2012). Normalna raspodela podataka za parametre oksidativnog stresa i glukoza oksidazi (GOX) je testirana korišćenjem Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov testa. Podaci ne prate normalnu raspodelu (Shapiro-Wilk test, $p < 0,05$; Kolmogorov-Smirnov test $p < 0,05$), a testiranje razlika između dve grupe je urađeno primenom Mann-Whitney U testa. Za analiziranje učestalosti u anketama korišćen je χ^2 (hi-kvadrat) ili Fisher exact test. Statistička analiza eksperimentalnih podataka je urađena pomoću softvera GraphPad Prism version 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

5. REZULTATI

5.1. Rezultati ankete

Dizajn istraživanja zahtevao je kreiranje obrasca ankete sa pitanjima za pčelare koji je dat u Prilogu 1. ove doktorske disertacije pod nazivom Obrazac 1. - Anketa.

Statističkom obradom anketnih pitanja pod rednim brojem 1a, 1b, 1c, 7, 9b, 9c, 10b, 11f (nadmorska visina pčelinjaka, pašni uslovi uzgoja pčela, zastupljenost pčelinjaka u odnosu na naseljeno mesto, dužina pčelarskog iskustva, laboratorijske analize uginulih društava, korišćenje pčelarskog dnevnika, provere zdravstvenog i kondicionalnog stanja pčelinjih zajednica, period menjanja matica i upotreba suplemenata) nije utvrđeno postojanje statističkih značajnih razlika.

Upotreba agropesticida, prema obavljenoj anketi pčelara, bila je statistički značajno visoka ($p < 0,0001$) u okolini pčelinjaka sa komercijalnim načinom gajenja u odnosu na pčelinjake sa tradicionalnim načinom gajenja pčela (**Tabela 2**). Analizom anketnih podataka, utvrđeno je da na tradicionalnim pčelinjacima postoji statistički značajno više ($p < 0,05$) pčelara sa po manje od 20 košnica po pčelinjaku u odnosu na komercijalne pčelinjake (**Tabela 2**). Na osnovu broja košnica u planinskom kraju određen je način pčelarenja: hobisti, poluprofesionalci i profesionalci. Statističkom obradom podataka uočeno je postojanje statistički značajno većeg broja hobista ($p < 0,05$) sa tradicionalnim uzgojem pčela u odnosu na komercijalni način pčelarenja (**Tabela 2**). Statističkom obradom podataka o starosnoj strukturi pčelara uočena je da su pčelari starosne dobi od 30 - 45 godina statistički ($p < 0,0001$) više zastupljeni u tradicionalnom pčelarenju u odnosu na komercijalni način gajenja pčela (**Tabela 2**). Pčelaraska proizvodnja na komercijalnim pčelinjacima u ispitivanim područjima pretežno je bazirana na proizvodnji meda, polena, rojeva i matica, dok je na tradicionalnim pčelinjacima pre svega bila zastupljena proizvodnja rojeva i meda. Statistička obrada podataka između dve ispitivane grupe je pokazala da postoji statistički veći broj tradicionalnih pčelara ($p < 0,01$) koji se bavi proizvodnjom rojeva u odnosu na broj pčelara u komercijalnom pčelarstvu (**Tabela 2**). Pčelari iz oba tipa uzgoja pčela obavljaju pregled društava na 5, 7, 14 ili na 21 dan. Statističkom obradom dobijenih podataka utvrđeno je da postoji statistički značajno veći broj pčelara ($p < 0,001$) u tradicionalnom sistemu uzgoja pčela, koji svoja društva pregledaju 21. dana (**Tabela 2**). Na osnovu statističke obrade

anketnih podataka o upotrebi veterinarskih preparata utvrđeno je da postoji značajno veća ($p < 0,001$) upotreba veterinarskih preparata u komercijalnom u odnosu na tradicionalno pčelarenje (**Tabela 2**). Statističkom obradom anketnih podataka, takođe, je utvrđeno da postoji veća statistička značajnost u broju tradicionalnih pčelara ($p < 0,001$), koji ne menjaju matice ili kod kojih se matice menjaju prirodnim putem, u odnosu na broj pčelara na komercijalnim pčelinjacima (**Tabela 2**). Obradom anektnih podataka uočena je značajno veća statistička značajnost ($p < 0,001$) u broju pčelara koji obavljaju prihranu društava na komercijalnim u odnosu na tradicionalne pčelinjake (**Tabela 2**). Obradom anektnih podataka uočen je značajno veći broj komercijalnih pčelara ($p < 0,001$) koji kupuju komercijalne pogače (**Tabela 2**). Na komercijalnim pčelinjacima je korišćen sirup u prihrani pčela. Po sastavu najzastupljeniji sirup je bio šećerni, a zatim šećerno-medni sirup u nešto manjem procentu. Na tradicionalnim pčelinjacima nije bilo prihrane društava sirupom (**Tabela 2**). Pogača na komercijalnim pčelinjacima je korišćena za prihranu društava. Po sastavu zastupljenija je bila pogača sa šećernim, u odnosu na pogaču sa šećerno-mednim testom. Na tradicionalnim pčelinjacima nije bilo prihrane društava primenom pogača (**Tabela 2**). Prihrana društava na komercijalnim pčelinjacima pomoću sirupa i pogača najčešće je obavljana u proleće, zatim zimi, a manje u leto i jesen. Na tradicionalnim pčelinjacima nije bilo nikakve prihrane (**Tabela 2**).

Tabela 2. Anketni rezultati – Obrazac 1.

Pitanja	Odgovori			P vrednost
	Da n (%)	Ne n (%)		
Upotreba agropesticida				p<0,0001
Komercijalna društva	33 (68,75)	15 (31,25)		
Tradicionalna društva	0 (0,00)	9 (100,00)		
Broj košnica	1-20 n (%)	21-50 n (%)	>50 n (%)	p<0,05
Komercijalna društva	12 (25,00)	18 (37,50)	18 (37,50)	
Tradicionalna društva	6 (66,67)	3 (33,33)	0 (0,00)	
Tip pčelarenja	Hobistički n (%)	Poluprofesionalni n (%)	Profesionalni n (%)	p<0,05
Komercijalna društva	12 (25,00)	18 (37,50)	18 (37,50)	
Tradicionalna društva	6 (66,67)	3 (33,33)	0 (0,00)	

Starost pčelara	30-45 n (%)	46-65 n (%)	>65 n (%)		p<0,0001
Komercijalna društva	9 (18,75)	30 (62,50)	9 (18,75)		
Tradicionalna društva	9 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)		
Pčelinji proizvodi	Med n (%)	Polen n (%)	Rojevi n (%)	Malice n (%)	p<0,01
Komercijalna društva	30 (62,50)	6 (12,50)	6 (12,50)	6 (12,50)	
Tradicionalna društva	3 (33,33)	0 (0,00)	6 (66,67)	0 (0,00)	
Pregled	Na 5 dana n (%)	Na 7 dana n (%)	Na 14 dana n (%)	Na 21 dan n (%)	p<0,001
Komercijalna društva	3 (6,25)	15 (31,25)	21 (43,75)	9 (18,75)	
Tradicionalna društva	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	9 (100,00)	
Upotreba vet. preparata	Da n (%)	Ne n (%)			p<0,001
Komercijalna društva	48 (100,00)	0 (0,00)			
Tradicionalna društva	0 (0,00)	9 (100,00)			
Menjanje matice	Da n (%)	Ne n (%)	Ponekad n (%)		2. p<0,001
Komercijalna društva	21 (43,75)	6 (12,50)	21 (43,75)		
Tradicionalna društva	0 (0,00)	9 (100,00)	0 (0,00)		
Prihrana	Sirup n (%)	Pogača n (%)	Suplement n (%)	Sve n (%)	p<0,001
Komercijalna društva	0 (0,00)	3 (6,25)	0 (0,00)	45 (93,75)	
Tradicionalna društva	0 (0,00)	0 (00,00)	0 (0,00)	0(00,00)	
Nabavka pogača	Kupuje n (%)	Priprema n (%)			p<0,001
Komercijalna društva	36 (75,00)	12 (25,00)			
Tradicionalna društva	0 (0,00)	0 (0,00)			
Sastav sirupa	Šećerno-medni n (%)	Šećerni n (%)	Medni n (%)		3. -
Komercijalna društva	3 (6,25)	45 (93,75)	0 (0,00)		
Tradicionalna društva	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)		
Sastav pogače	Šećerno-medno testo	Šećerno testo n (%)			

	n (%)				-
Komercijalna društva	12 (25,00)	36 (75,00)			
Tradicionalna društva	0 (0,00)	0 (0,00)			-
Period prihrane	Jesen n (%)	Proleće n (%)	Zima n (%)	Leto n (%)	
Komercijalna društva	6 (12,50)	18 (37,50)	15 (31,25)	9 (18,75)	
Tradicionalna društva	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	

5.2. Rezultati kliničkog pregleda

Za potrebe utvrđivanja zdravstvenog statusa pčelinjih zajednica pre uzorkovanja i obavljanja eksperimenta kreirali smo anketni obrazac za skeniranje postojećeg zdravstvenog stanja pčelinjih zajednica pod nazivom **Obrazac 2. - Zdravstveni list za pčelinje društvo**. Ovaj obrazac je sastavni deo rezultata ove doktorske disertacije i dat je u **Prilogu 2**.

Na osnovu anamnestičkih anketnih podataka i njihovom statističkom obradom je utvrđeno da su od veterinarskih preparata najzastupljeniji bili „hard“ akaricidi (hemijski sintetisani) na komercijalnim pčelinjacima, sa 54,17% učešća, dok su „soft“ akaricidi (na bazi supstanci prirodnog porekla) manje bili upotrebljivani u 45,83% slučajeva. Na tradicionalnim pčelinjacima nisu primenjivani nikakvi veterinarski preparati (**Tabela 3**). Kao soft akaricidi na komercijalnim pčelinjacima (**Tabela 3**) su korišćeni uglavnom preparati na bazi organskih kiselina (59,09%) i etarskih ulja (40,91%). Od hard akaricida korišćen je amitraz (100,00%), dok ostali preparati na bazi fluvalinata, flumetrina, kumafosa i cimiazolhidrohlorida nisu bili u upotrebi na ispitivanim komercijalnim pčelinjacima (**Tabela 3**). Stacionarno pčelarenje je bilo značajno više zastupljeno ($p < 0,05$) kod tradicionalnog u odnosu na komercijalni način gajenja pčela (**Tabela 3**).

Tabela 3. Rezultati zdravstvenog stanja ispitivnih pečlinjih zajednica - Obrazac 2.

Pitanja	Odgovori					P vrednost
	Soft n (%)		Hard n (%)			
Vrsta akaricida						-
Komercijalna društva	22 (45,83)		26 (54,17)			
Preparati	Organska kiselina n (%)	Etarska ulja n (%)	Biljni ekstrakti n (%)			-
Komercijalna društva	13 (59,09)	9 (40,91)	0 (0,00)			
Preparati	Fluvalinat n (%)	Bayvarol n (%)	Kumafos n (%)	Amitraz n (%)	Cimiazol n (%)	-
Komercijalna društva	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	26 (100,00)	0 (0,00)	
Tip pčelarenja	Stacionaran n (%)	Seleći n (%)	Stajaći i seleći n (%)			p<0,05
Komercijalna društva	30 (62,50)	0 (0,00)	18 (37,50)			
Tradicionalna društva	9 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)			

Rezultati ispitivanja količine meda i prosečne površine zatvorenog legla prikazani su u **Tabeli 4**. Kod komercijalnih društava (**Tabela 4**) površina saća pod medom je iznosila $7143,03 \pm 2663,17 \text{ cm}^2$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$), dok kod pčelinjih zajednica gajenih u trmkama nije bilo mogućnosti za merenje površine saća pod medom. Prosečna površina zatvorenog legla po košnici na komercijalnim pčelinjacima (**Tabela 4**) iznosila je $7038,32 \pm 1683,97 \text{ cm}^2$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$), a kod pčelinjih zajednica gajenih na tradicionalan način nije bilo moguće obaviti merenja površina zatvorenog legla.

Tabela 4. Površina saća pod medom i površina zatvorenog legla u cm^2

Komercijalne košnice	n	\bar{x}	SD	Sem	X max	X min	CV (%)
Površina saća pod medom cm^2	119	7143,03	2663,17	244,13	12963	1547	37,28
Površina zatvorenog legla cm^2	119	7038,32	1683,97	154,37	5721	3278	23,93

Površina saća pod pergom kod komercijalnih društava (**Tabela 5**), izražena putem medijane iznosila je 2047cm² (1511-2574), dok je medijana površine otvorenog legla kod komercijalnih društava (**Tabela 5**) iznosila je 3114cm² (2699-3841). Međutim, medijana broja adultnih pčela komercijalno gajenih u DB košnicama (**Tabela 5**), iznosila je 23 821 (22099-26623), dok kod pčela gajenih u trmkama nije bilo moguće da se odrede gore pomenuti parametri jačine pčelinjeg društva.

Tabela 5. Parametri jačine društva ispitivanih pčelinjih zajednica

Komercijalne košnice	n	Me	Q ₁	Q ₃	X max	X min	CV (%)
Površina saća pod pergom cm ²	119	2047	1511	2574	4987	258	42,70
Površina otvorenog legla cm ²	119	3114	2699	3841	4877	1087	26,70
Brojnost adultnih pčela	119	23821	22099	26623	29834	2382	15,22

5.3. Komparativni prikaz zastupljenosti pčelinjih patogena u leglu i na odraslim pčela kod tradicionalno i komercijalno gajenim pčelinjim zajednicama

Uočena je značajna razlika u broju vrsta patogena između komercijalno i tradicionalno gajenih pčelinjih zajednica. Njihov broj je bio statistički znatno veći kod komercijalno gajenih pčela (**Tabela 6**).

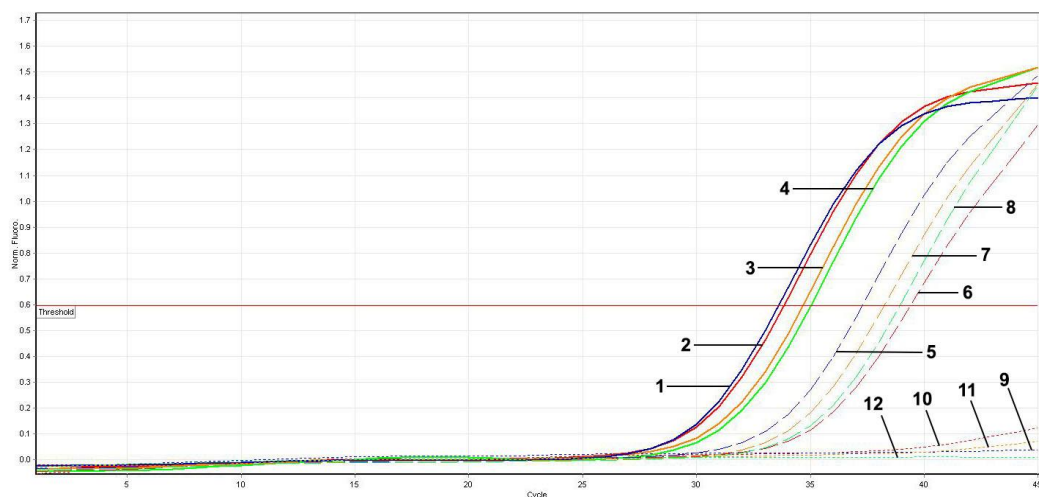
Tabela 6. Zastupljenost nukleinskih kiselina (DNK i RNK) uzročnika pčelinjih bolesti u komercijalnim i tradicionalno gajenim pčelinjim društvima

Genetski materijal uzročnika bolesti pčela		Košnice		P vrednost
		Komercijalne n=120	Tradicionalne n=24	
Bolesti legla	DNK- AFB ¹	16,67%	0,00%	<0,05
	DNK- EFB ²	0,00%	0,00%	>0,05
	DNK- CHB ³	13,33%	0,00%	<0,05
	RNK- SBV ⁴	96,67%	33,33%	<0,05
	DNK- <i>L.passim</i>	16,67%	8,33%	> 0,05
	DNK- <i>C. mellificae</i>	0,00%	0,00%	> 0,05
Bolesti odraslih pčela	RNK- ABPV ⁵	83,33%	33,33%	<0,001
	RNK- CBPV ⁶	100,00%	33,33%	<0,001
	RNK- DWV ⁷	100,00%	33,33%	<0,001
	DNK- <i>N. ceranae</i>	61,67%	29,17%	<0,01
	DNK- <i>L.passim</i>	50,00%	25,00%	< 0,05
	DNK- <i>C. mellificae</i>	0,00%	0,00%	> 0,05
Legenda: 1. Američka kuga 2. Evropska kuga 3. Krečno leglo 4. Virus mešinastog legla 5. Virus akutne paralize pčela 6. Virus hronične paralize pčela 7. Virus deformisanih krila				

Kod većine pčelinjih zajednica tradicionalno gajenih u trmkama otkriveno je da su u 66,66% slučajeva potpuno slobodne od patogena koje smo pratili (*Paenibacillus*

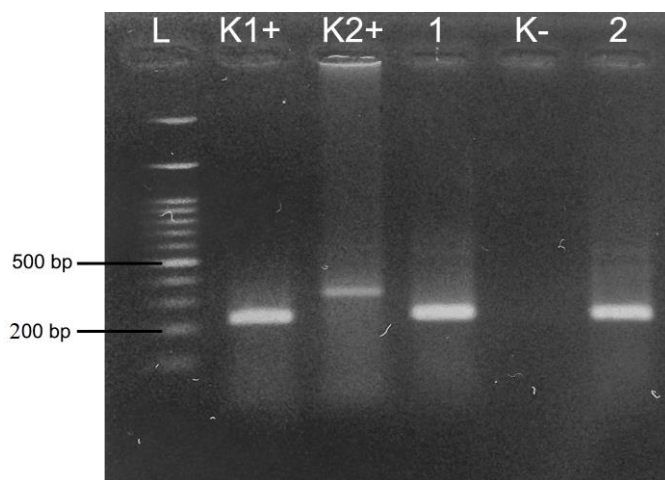
larvae - AFB, *Melissococcus plutonius* - EFB, *Ascospheara apis* - CHB. U 33,33% uzoraka uočeno je prisustvo samo jednog patogena pčelinjeg legla i to virusa mešinastog legla – SBV (**Tabela 6**). Što se tiče bolesti odraslih pčela utvrđeno je da je samo jedan pčelinjak od tri tradicionalna pčelinjaka u blizini komercijalnog pčelinjaka bio pozitivan na jedan ili više virusa (virus mešinastog legla-SBV, virus akutne paralize pčela-ABPV, virus hronične paralize pčela-CBPV i virus deformisanih krila pčela-DWV), što predstavlja 33,33% inficiranih od ukupnog broja analiziranih ispitujućih društava.

Većina društva koja su uzgajana u komercijalne svrhe imala su višestruke virusne infekcije (**Slika 7**), s tim da je virus DWV i CBPV je bio prisutan u 100,00%, SBV u 96,67% i ABPV u 83,33% uzoraka.



Slika 7. Amplifikacione krive real-time RT-PCR bazirane na TaqMan probama koje pokazuju prisustvo nukleinskih kiselina virusa. Linije 1-4 – pozitivna kontrola: 1) plava linija - za ABPV; 2) Crvena linija - za CBPV; 3) Narandžasta linija - za DWV; 4) Zelena linija - za SBV; Isprekidane linije (5-8) – uzorci, odgovarajuće. Tačkaste linije (9-12) – negativne kontrole, odgovarajuće. Pojedinačne replikacije su prikazane radi jasnoće.

U pčelinjim zajednicama gajenim na tradicionalna način u trmkama *Nosema ceranae* je bila detektovana u 29,17% uzoraka, dok je kode komercijalno gajenih pčela bila detektovana u 61,67% uzoraka (**Slika 8. i Tabela 6.**).



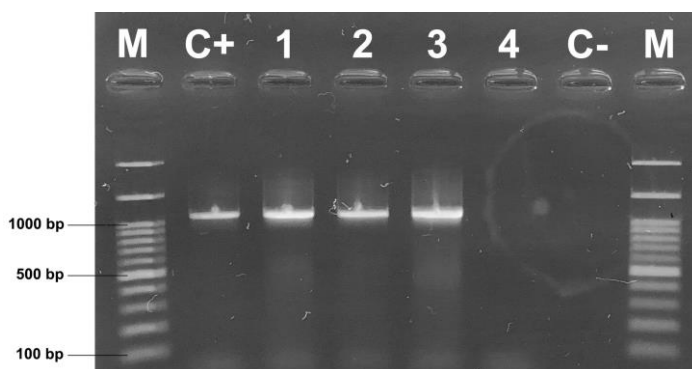
Slika 8. Vizuelizacija duplex PCR produkata pomoću prajmera 321APIS-FOR/REV i 218MITOC-FOR/REV DNK mikrosporidija *N. ceranae* i *N. apis*. L- ladder (100 bp) ; K1+, pozitivna *N. ceranae* kontrola; K2+, pozitivna *N. apis* kontrola; K-, negativna kontrola; 1–2 - uzorci.

PCR metodama - duplex PCR i RFLP-PCR nismo detektovali ni jedan *N. apis* pozitivan uzorak među ispitivanim pčelinjim zajednicama. Genetički materijal tripanozome *Lotmaria passim* je, takođe, detektovan u pčelinjem leglu (16,67%) i kod odraslih pčela (50,00%) koje su komercijalno gajene; ali i kod tradicionalno gajenih pčela kako u leglu (8,33%) tako i u odraslim pčelama (25,00%). Tripanozoma *Crithidia mellificae* nije dokazana ni u jednom uzorku, bez obzira na način pčelarenja i vrstu uzorka (**Tabela 6**). Takođe, poređenjem pozitivnih uzoraka između pčelinjeg legla (16,67%) i odraslih pčela (50,00%) gajenih u komercijalnim uslovima utvrdili smo veću prevalencu tripanozome *L. passim* kod odraslih pčela, dok kod pozitivnih uzoraka u leglu i kod odraslih pčela gajenih u trmkama nije bilo statističke značajne razlike (**Tabela 7**).

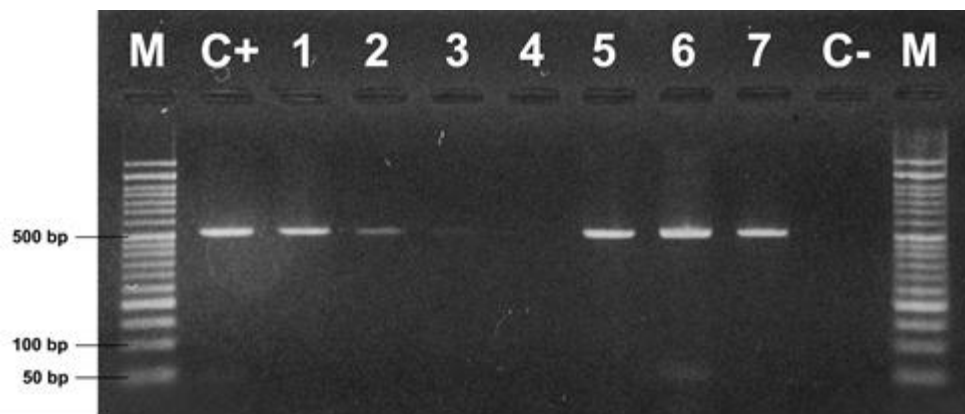
Tabela 7. Zastupljenost tripanozome *L. passim* između larvi i odraslih pčela u komercijalnim i tradicionalnim košnicama – trmkama.

Košnice					
Pozitivni uzorci na prisutvo <i>L. passim</i> u komercijalnim pčelinjacima			Pozitivni uzorci na prisutvo <i>L. passim</i> u tradicionalnim pčelinjacima		
Leglo n=120 (%/No)	Odrasle pčele n=120 (%/No)	<i>P</i> vrednost	Leglo n=24 (%/No)	Odrasle pčele n=24 (%/No)	<i>P</i> vrednost
16,67% (20)	50,00% (60)	< 0,01	8,33% (2)	25,00% (6)	> 0,05

Za razliku od tripanozome *L. passim*, pčelinjih virusa i mikrosporidije *N. ceranae*, u tradicionalno gajenim društvima, patogeni bakterijskih i gljivičnih bolesti su bili ređe detektovani - *Paenibacillus larvae* u 16,67% (**Slika 9**) i *Ascospheara apis* (**Slika 10**) u 15.83% (**Tabela 6**).

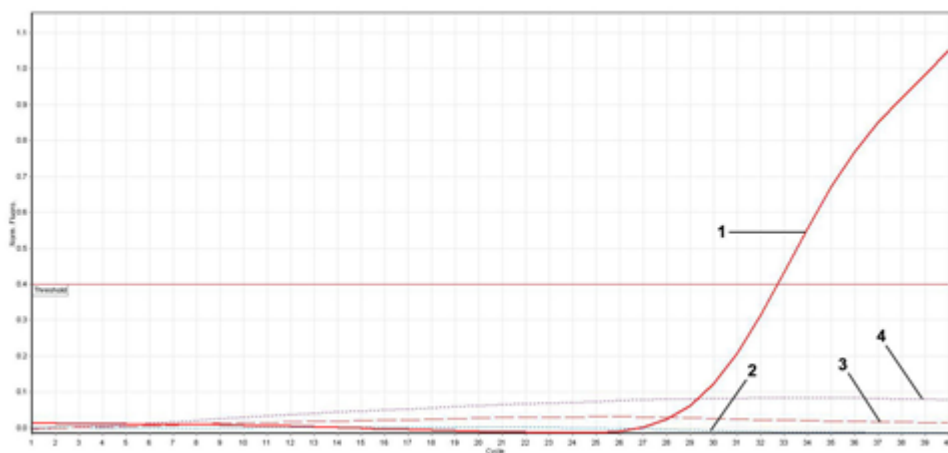


Slika 9. Vizuelizacija PCR produkata DNK bakterije *P. larvae*. M - 100 bp ladder DNK marker; C+ pozitivna kontrola; 1-4 - uzorci; C- negativna kontrola. Veličina pozitivnih produkata su prikazani sa leve strane.



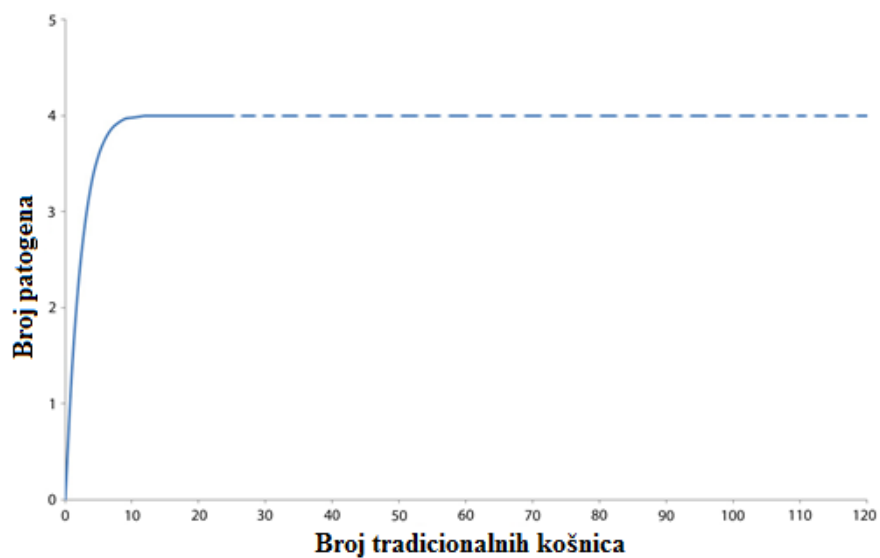
Slika 10. Gel elektroforeza DNK amplifikovanih produkata gljivice *A. apis*. M, 50 bp ladder DNK marker; C+, pozitivna kontrola; C- negativna kontrola; 1-2- uzorci. Veličina pozitivnih produkata su prikazani sa leve strane.

Uzročnik EFB (**Slika 11**) nije dokazan ni u jednom uzorku pčela, bez obzira na način pčelarenja i vrstu uzorka (**Tabela 6**).



Slika 11. Amplifikacione krive real-time RT-PCR koje pokazuju prisustvo DNK bakterije *M. plutonius*. Neprekidna linija (1) – pozitivna kontrola za *M. plutonius*; Tačkaste linije, plava i ljubičasta (2 i 4) - uzorci; Isprekidana linija (3) – negativna kontrola.

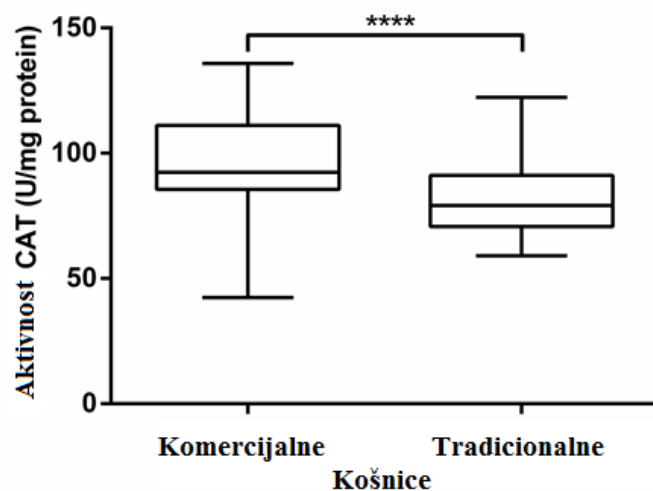
Rarefrakciona analiza je pokazala da broj patogena u tradicionalno gajenim košnicama trmkama ne bi bio promenjen sa povećanjem broja analiziranih košnica – trmki (**Slika 12**).



Slika 12. Rarefrakciona analiza

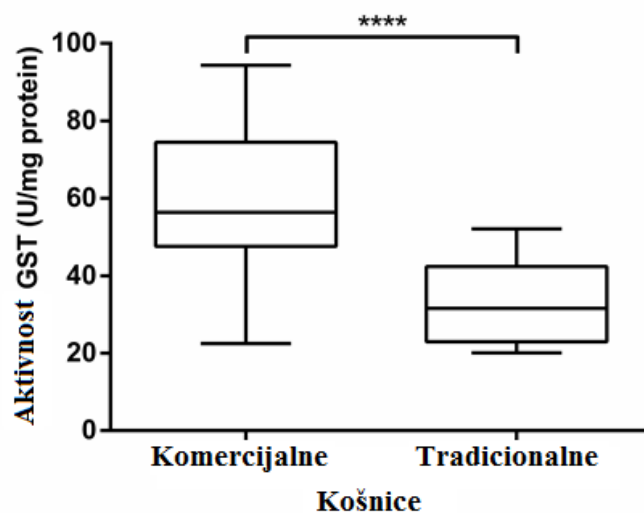
5.4. Parametri oksidativnog stresa

Analizom parametara oksidativnog stresa utvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika između dveju grupa pčela, u zavisnosti od načina njihovog uzgoja. Kod tradicionalno gajenih društava praćena aktivnosti katalaze - CAT parametra bila je značajno niža ($p < 0,01$) u odnosu na komercijalno gajena društva (**Grafikon 2**).



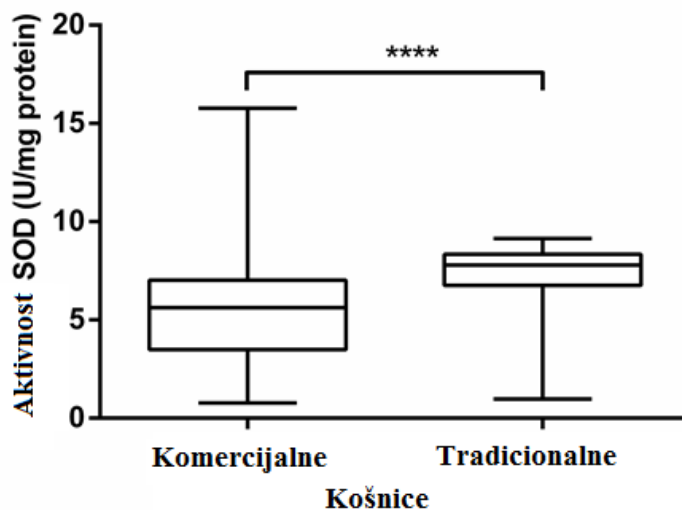
Grafikon 2. Komparativni prikaz aktivnosti katalaze (CAT) isptivanih kod pčela u komercijalno i tradicionalno gajenim pčelinjim zajednicama

Takođe, dobijeni rezultati pokazuju značajno nižu ($p < 0,01$) aktivnost glutathion S-transferaze - GST parametra oksidativnog stresa u odnosu na komercijalno gajena društva (**Grafikon 3**).



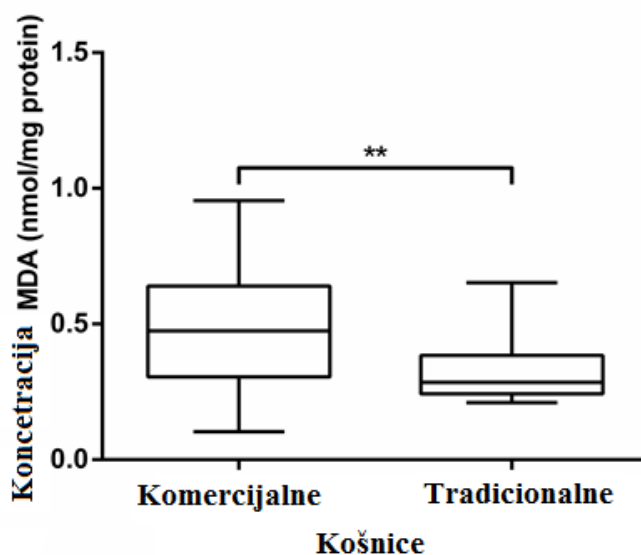
Grafikon 3. Komparativni prikaz aktivnosti glutation S-transferaze (GST) kod pčela u komercijalno i tradicionalno gajenim pčelinjim zajednicama

Nasuprot tome, aktivnost superoksid dismutaze - SOD (**Grafikon 4**) je bila značajno veća ($p < 0,01$) kod tradicionalnih društava u odnosu na komercijalno gajena društva.



Grafikon 4. Komparativni prikaz aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) kod pčela u komercijalno i tradicionalno gajenim pčelinjim zajednicama

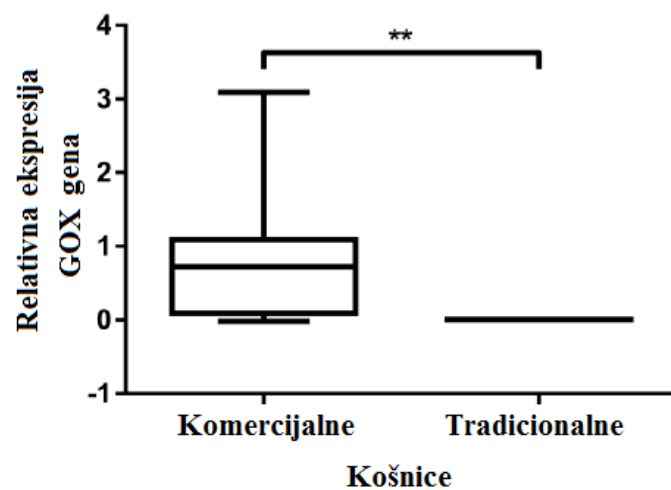
Međutim, uočena je statistički značajna razlika nivoa malondialdehida - MDA (**Grafikon 5**) između pčela gajenih u navedena dva načina pčelarenja; MDA nivo je bio signifikantno veći ($p=0,002$) kod komercijalno gajenih društava.



Grafikon 5. Komparativni prikaz vrednosti koncentracija malondialdehida (MDA) kod pčela u komercijalno i tradicionalno gajenim pčelinjim zajednicama

5.5. Relativna ekspresija GOX gena za socijalni imunitet pčela

Statističkom obradom podataka koji se odnose na ekspresiju iRNK gena za enzim glukoza oksidazi (GOX) između pčelinjih društava gajenih na tradicionalan i komercijalan način (**Grafikon 6**) ustanovili smo postojanje statistički značajne razlike ($p<0,01$) veće ekspresije GOX gena kod komercijalnog načina gajenja pčela u odnosu na tradicionalno gajene pčele u trmkama.



Grafikon 6. Nivo ekspresije gena za glukoza okidazu (GOX) pčela iz komercijalnog i tradicionalnog načina pčelarenja

6. DISKUSIJA

Mnogi literaturni podaci govore o sve većoj ugroženosti zdravlja pčela različitim patogenima (vanEngelsdorp i sar., 2009; Genersch, 2010a; Neumann i Carreck, 2010; vanEngelsdorp i Meixner, 2010; Stanimirović i sar., 2019). Ovo je prvo uporedno istraživanje prisustva najvažnijih uzročnika pčelinjeg legla i odraslih pčela na komercijalnim i tradicionalnim pčelinjacima, gde su analizirani kako parametri oksidativnog stresa tako i nivo iRNK za gen GOX. Tako smo dobili vrlo značajne informacije o uticaju čoveka na pčele, njihovu produktivnost, zdravstveno i reproduktivno stanje, kao i vrlo bitno saznanje da još uvek na tradicionalnim pčelinjacima postoje društva „slobodna“ na određene patogene i pored toga što su bile pod uticajem čoveka, koji je bio značajno manji u odnosu na komercijalne pčelinjake. Pčelama, posebno onim gajnim u komercijalne svrhe, pomoć pčelara je veoma važna kada je reč o njihovom opstanku u krajnje nepovoljnim uslovima (npr. nestašica hrane, bolesti ili gubitak matice). U radu Tarić i sar. (2019) većina komercijalno gajenih društva, naizgled je bila zdrava, urpkos kasnije potvrđenom multipatogenom prisustvu. Ovo podržava ideju da čovek i mere koje obično koristi u komercijalnom pčelarstvu, mogu sprečiti izbijanje i širenje bolesti, omogućiti opstanak pčelama, zatim, njihovu dobru zdravstvenu kondiciju i produktivnost. Ipak, potrebna su dalja istraživanja kako bi se odgovorilo na pitanje: „da li i kako menadžment utiče na razvoj legla, stanje pčelinjeg društva, njihov oksidativni i energetske stres, kao i na stepen oštećenja njihove DNK“?

Naši rezultati pokazuju da je značajno veća rasprostranjenost pčelinjih patogena u komercijalno gajenim pčelama u odnosu na tradicionalno gajene pčele (**Tabela 6**) (Tarić i sar., 2019; 2020). Mnogi literaturni podaci ukazuju da patogeni mogu biti prisutni u komercijalnim pčelinjim društvima i asimptomatski (Gauthier i sar., 2007; vanEngelsdorp i sar., 2009; Stevanović i sar., 2013; Simeunović i sar., 2014a;b). Tradicionalne košnice tj. trmke nisu pogodne za komercijalno pčelarstvo, ali pčele gajene u trmkama omogućavaju im bolje prilagođavanje lokalnim uslovima životne sredine (Stanimirović i sar., 2005a;b). Veću prevalencu patogena u komercijalnim društvima u odnosu na tradicionalna društva možemo objasniti na osnovu dobijenih rezultata iz ankete i obavljenog kliničkog pregleda ispitivanih pčelinjih društava

(**Tabela 2 i 3**). Trmke su manje izložene negativnim antropogenim uticajima i savremenim apitehničkim merama kao što su: zamena i gajenje matica, manipulacija sa voskom i satnim osnovama, neadekvatno hranjenje i veće uznemiravanje komercijalnih društava zbog učestalih, ali ponekad i nepotrebna otvaranja košnica, što doprinosi manjem širenju patogena nego kod komercijalno gajenih zajednica. Pčele gajene u trmkama, hrane se prirodnom, uravnoteženom energetsom i proteinskom hranom (nektar i polen) i manje su izložene energetsom i oksidativnom stresu u poređenju sa pčelama komercijalno gajenim. Dakle, one imaju, možda, jači imunski sistem i manje su sklone infekcijama. Zbog neuravnotežene ishrane i velikih metaboličkih zahteva, velike su šanse da komercijalno gajene pčele razviju oksidativni (Nikolic i sar., 2015; Simone-Finstrom i sar., 2016, Stanimirović i sar., 2019; Tarić i sar., 2020) i energetski (Mayack i Naug, 2009; Martin-Hernandez i sar., 2011; Bordier i sar., 2017) stres uz sklonost ka raznim infekcijama. Pčele koje koriste šećer favorizuju reprodukciju patogena, posebno nozemu, kojoj nedostaju mitohondrije, jer za razvoj koriste energiju domaćina (Mayack i Naug, 2009). Pčele radilice u takvim društvima prihranjene šećernom hranom, imaju velike metaboličke zahteve i postaju sklone stresu kada su inficirane nozemom (Higes i sar, 2010; Mayack i Naug, 2010, Tarić i sar., 2020), a problemi se pogoršavaju, još i starenjem matica (Simeunović i sar., 2014b).

Naši rezultati koji se odnose na prevalencu pčelinjih virusa: DWV (100.00%), CBPV (100.00%), SBV (96.67%) i ABPV (83.33%) u komercijalnim društvima su u skladu sa nalazima nekih istraživača koji su proučavali virusne infekcije u komercijalnim pčelinjacima (Simeunović i sar., 2014a, 2015; Ćirković i sar., 2018, Stanimirović i sar., 2019). U uzorcima uzetim iz trmki sa jednog od tri tradicionalna pčelinjaka koji se nalazio u blizini komercijalnog pčelinjaka detektovan je genetički materijal virusa mešinastog legla. To nas navodi na zaključak da pošto je komercijalni plčelinajk bio pozitivan na sve praćene virusne infekcije došlo do mešanja pčela između ova dva pčelinjaka, što je rezultiralo pojavu visrusa mešinastog legla u pčelinjim zajednicama tradionalnog pčelinjaka.

Pomoću molekularno genetičkih analiza detektovan je genetički materijal *P. larvae* i *A. apis* u komercijalnim društvima. Pčele gajene u trmkama su bile slobodne od navedenih patogena. Kod komercijalno gajenih pčela uvek postoji određena količina neiskorišćene hrane koja je eventualno kontaminirana, a može se ponovo koristiti i

postati potencijalni izvor infekcije za neinficirane pčelinje zajednice, ali i dodatno opterećenje za već inficirana pčelinja društva (Mattila i sar., 2012; de Guzman i sar., 2017). Kod tradicionalno gajanih pčela sama proizvodnja pčelarskih proizvoda ne zdravstveno ne opterećuje pčelinje zajednice, jer kod tradicionalnog pčelarenja, pčelar ima pristup pčelarskim proizvodima (med, vosak) samo nakon uništavanja celih pčelinjih društava, tako prekidajući ciklus razvoja pčelinjih patogena kod odraslih pčela i u pčelinjem leglu. Zamena voska u komercijalnim pčelinjacima smanjuje rizik pojave AFB i zato ovu praksu treba podsticati (de Graaf i sar., 2001; de Guzman i sar., 2017). Pogrešnom pčelarskom tehnikom i neadekvatnom ishranom pčela, pčelari mogu oslabiti pčelinju zajednicu, uslovljavajući skraćenje životnog veka pojedinačnih pčela (Simone-Finstrom i sar., 2016). Pčelar intenzivnim radom forsira određene košnice i pravi velika društva koja formiraju velike površine legla te na taj način stvaraju uslove za brzu reprodukciju i prenošenje patogena na susedne košnice i pčelinjake, a tako i na divlje pčele (Neumann i Blacquiere, 2017).

Prisustvo uzročnika krečnog legla kod komercijalnih društava, a odustvo u trmkama (**Tabela 6**) objašnjavamo činjenicom da je loša pčelarska praksa i loša konstrukcija komercijalnih košnica, stvara povoljne uslove za pojavu krečnog legla i drugih bolesti (Ruottinen, i sar., 2014). Vlažnost se često zapaža kod komercijalnih košnica sa lošom ventilacijom (Borum i Ulgen, 2008). Sama konstrukcija trmki i vrsta materijala od kojih su izgrađene ne dozvoljavaju pojavljivanje vlage, te je izloženost uzročniku CHB smanjena. Takođe, velika prevalenca *N. ceranae* na prostoru Pešteri (Stevanovic i sar., 2011, 2013, 2016) doprinosi razvoju bolesti krečnog legla. Poznata je korelacija između pojavljivanja nozeme u proleće i krečnog legla sa varoom u leto (Hedtke i sar., 2011).

Uzročnik EFB nije otkriven ni u jednom ispitujućem uzorku bez obzira na tip pčelaranja. Pretpostavljamo, da je vreme uzorkovanja imalo uticaja na negativan rezultat, jer je poznato da se bolest pretežno javlja u proleće. U vreme uzorkovanja larvi, tokom avgusta meseca, larve su izgledale zdravo i bile bez znakova bolesti pčelinjeg legla. Uzročnik *M. plutonius* je uglavnom prisutan kod larvi sa vidljivom kliničkom slikom (Forsgren i sar., 2005). Međutim, moguće je i da asimptomatska društva budu pozitivna na prisustvo uzročnika EFB (Belloy i sar., 2007; Budge i sar., 2010). Belloy i sar. (2007) su utvrdili da su pčelinje zajednice bez znakova infekcije na

pčelinajcima koji su bili u blizini pčelinjaka sa vidljivim simptomima bolesti EFB, ipak imali 30% zarazenih asimptomatskih društva.

Naša istraživanja su potvrdila prisustvo *V. destructor* u komercijalnim košnicama, dok u trmkama nije detektovan ni jedan pčelinji krpelj ove vrste. Ovo bi mogao da bude dodatni razlog za veću prevalencu patogena pčela u komercijalno gajenim društvima u odnosu na pčele gajene na tradicionalan način, s obzirom da je *V. destructor* vektor vertikalnih i horizontalnih infekcija većine ispitivanih patogena (Generish 2010; vanEngelsdorp i Meixner, 2010; Stanimirović i sar., 2019)

Rezultati ove disertacije o nalazu višestrukih infekcija medonosnih pčela komercijalno gajenih, je u skladu sa mnogim istraživanjima o višestrukim mešanim infekcijama virusima, mikrosporidijama, tripanozomama i ektoparazitima (vanEngelsdorp i sar., 2009; Simeunović i sar., 2014b; Tlak Gajger i sar., 2014; Simeunović, 2015; Stevanović i sar., 2016; Vejnović i sar., 2018, Tarić i sar., 2019; Stanimirović i sar., 2019; Tarić i sar., 2020). Treba imati na umu da je prisustvo virusa, posebno DWV i ABPV usko povezano sa velikom infestacijom društava ektoparazitom *V. destructor* (Genersch, 2010; vanEngelsdorp i Meixner, 2010; Simeunović, 2015; Stanimirović i sar., 2017; Ćirković i sar., 2018; Tarić i sar., 2019; Stanimirović i sar., 2019) koji je fizički i biološki vektor mnogim pčelinjim patogenima.

U analiziranim uzorcima utvrđena je značajno veća ($p < 0,01$) prevalenca infekcije *N. ceranae* komercijalnih košnica (61,67%) u poređenju sa tradicionalnim (29,17%) i možemo pretpostaviti da je razlog za to bila znatna ograničena izloženost tradicionalnih društava antropogenim uticajima tj. pčelarskoj praksi uzgoja i zamene matica, manipulacija satnim osnovama i saćem, neadekvatna prihrana i povećano uznemiravanje komercijalnih društava zbog često, obično nepotrebnog otvaranja košnica što se može videti u rezultatima ankete (**Tabela 2**). Svi ti antropogeni uticaji i savemeni apitehnički postupci dodatno podstiču širenje patogena (Tarić i sar., 2020). U skladu sa ovim našim rezultatima su i mnoga istraživanja drugih autora koja su potvrdila negativan antropogeni uticaj na pčele: povećano optrećenje *N. ceranae* nastaje usled uznemiravanja pčela (Morimoto i sar., 2011) kao i prelazak na neprirodna (klimatski i ekološki) različita okruženja (Burnham i sar., 2019). Međutim, velika prevalenca nozeme u komercijalnim društvima može biti povezana sa prisustvom bolesti krečnog legla koja je, takođe, dokazana u radu Tarić i sar. (2019), što je u

saglsnosti sa nalazima Hedtke i sar. (2011) koji su ustanovili postojanje veze u pojavljivanju nozeme i krečnog legla.

Prisustvo tripanozome *L. passim* detektovana je ne samo kod odraslih pčela, već i u leglu kod komercijalnih i tradicionalno gejnih pčela (**Tabela 7**). Prevalnca *L. passim* kod odraslih pčela: 50% kod komercijalnih i 25% kod tradicionalnih društava (Tarić i sar., 2020) je prilično veća nego u Sjedinjenim Američkm Državama - 16% u komercijalnim i 4% u divljim društvima (Williams i sar., 2019), ali značajno niža nego u komercijalnim pčelinjacima u Čileu - 90% (Arismendi i sar., 2016). Prevalenca utvrđene infekcije odraslih pčela tripanozomom *L. passim* od 50%, slična je vrednosti dobijenoj u prethodnim istraživanjima u Srbiji kada je kod uzoraka prikupljenih u periodu od 2007 - 2015 utvrđeno prisustvo ovo parazita u 60% ispitivanih uzoraka (Stevanović i sar., 2016). Prisustvo DNK *L. passim* u pčelinjim larvama predstavlja prvo otkiće ovog parazita u leglu (Tarić i sar., 2020), ali su neophodna dalja ispitivanja da bi se utvrdilo da li ova tripanozoma, zaista, i parazitira u pčelinjim larvama. Prevalneca *L. passim* veća je kod odraslih komercijalno gajenih pčela nego kod larvi ($p < 0,01$). Znatno niža ($p < 0,05$) prevalnca *L. passim* u društvima gajenim u trmkama u poređenju sa pčelama iz komercijalnih košnica je verovatno rezultat minimalnog upliva pčelara u rad pčela u trmkama, što znatno smanjuje i mogućnost širenja infekcije. Slične rezultate su dobili Williams i sar. (2019) koji su poredili komercijalna i divlja društva i otkrili značajno nižu prevalencu *L. passim* kod divljih društava. U našem istraživanju *L. passim* je detektovana samo u trmkama na jednom od tri pčelinjaka, koji se nalazio u blizini komercijalnog gde je došlo do mešanja pčela (Tarić i sar., 2020). Naši rezultati visoke prevalencije *L. passim* u komercijalnim društvima (50% kod odraslih pčela i 16% u leglu) i *N. ceranae* (61,67%) su u skladu sa rezultatima Stevanović i sar. (2016) koji su dijagnostikovali ko-infekciju sa oba parazita u 60,50% ispitanih kolonija tokom devetogodišnjeg perioda istraživanja (2007-2015). Ovi rezultati sugerišu da postoji mogućnost zajedničkog delovanja između dva crevna parazita *L. passim* i *N. ceranae*, i da postoji pozitivna korelacija između nivoa njihove infekcije, slične godišnje dinamike i sezonalnosti (Vejnović i sar., 2018). S obzirom na to da je u pitanju hipoteza, tek treba utvrditi da li deluju sinergistički na pčelu, imajući u vidu da društva podležu većim zimskim gubicima kada su inficirane sa oba parazita (Raovet i sar., 2013).

Kada je reč o parametrima oksidativnog stresa (SOD, CAT, GST i MDA) rezultati su pokazali da se komercijalno i tradicionalno gajena društva značajno razlikuju u parametrima oksidativnog stresa kao i u prevalenci prisutva patogena. Rezultati našeg istraživanja su pokazali značajno veće aktivnosti SOD kod tradicionalno gajenih pčela u odnosu na komercijalna društva (**Grafikon 4**), što nam govori i ukazuje da prve imaju dobro razvijen zaštitni mehanizam protiv ROS (reaktivne vrste kiseonika). Poznato je da SOD katalizuje dismutaciju superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$) do vodonik peroksida i predstavlja prvu odbranu protiv ROS (Surai, 2015). Manja aktivnost SOD u komercijalnim društvima u poređenju sa tradicionalnim može se objasniti inaktivacijom SOD njegovim produktom, vodonik peroksidom (Nikolić-Kokić i sar., 2010) što se dešava usled povećane dismutacije superoksidnog anjona. Može se pretpostaviti da je povećana proizvodnja $O_2^{\cdot-}$ odgovor domaćina na prisustvo patogena, s obzirom na to da je prevalenca patogena u komercijalnim društvima bila značajno veća nego kod pčela koje se gaje u trmkama. Suprotno tome, u našem istraživanju značajno je bila veća aktivnost CAT u komercijalnim društvima u odnosu na tradicionalna (**Grafikon 2**). Pored SOD, enzim CAT, takođe, igra važnu ulogu u antioksidativnoj odbrani i katalizuje vodonik peroksid na vodu i kiseonik. Katalaza (CAT) štiti organizam od pojave hidroksilnih radikala. Veća aktivnost CAT u komercijalnim društvima je verovatno rezultat povećane proizvodnje supstrata vodonik peroksida koji predstavlja odgovor pčele na veće opterećenje patogenima (virusi, bakterije, paraziti, mikrosporidije, gljivice i drugim patogenima) u odnosu na tradicionalna društva što je i opisano u istraživanju Tarić i sar. (2019). Zna se da je CAT deo imunološkog sistema i da ima veoma važnu zaštitnu ulogu kod insekata kada su inficirani crevnim parazitima (Ha i sar., 2005). Kod komercijalno gajenih pčela izmerana je značajno veća aktivnost GST (**Grafikon 3**) u odnosu na tradicionalna društva, zbog većeg opterećenja patogena, što je u skladu sa rezultatima Vidau i sar. (2011) i Dussaubat i sar. (2012). S obzirom da su mikrosporidije i tripanozome crevni paraziti prisutni kod pčela, objašnjenje za povećanje GST predložili su Dubovsky i sar. (2008), a koje glasi: „GST je uključen u inaktivaciji toksičnih produkata tokom lipidne peroksidacije koja se odvija kao rezultat borbe organizma protiv crevnih parazita.“ Koncentracija MDA u našim istraživanjima bila je značajno veća kod komercijalnih društava u odnosu na tradicionalna, što je rezultat povećane lipidne peroksidacije

izazvane većom prevalencijom patogena u telu ispitivanih pčela (**Grafikon 5**). I drugi autori (Wang i sar., 2001; Dubovskiy i sar., 2008; Ahmed, 2012) su ukazali na povećanu peroksidaciju lipida usled prisustva patogena kod insekata. S toga je sasvim moguće da značajno veće vrednosti parametara oksidativnog stresa (CAT, GST i MDA) kod komercijalnih društava proizilaze zbog većeg prisustva patogena. Treba imati na umu da je uzrok povećane prevalencije patogena i stresa u komercijalnim društvima rezultat prisustva antropogenog faktora, tj. rezultat neadekvatne pčelarske prakse. Ovu tvrdnju potvrđuju dobijeni rezultati iz ankete i kliničkog pregleda pčelinjih zajednica (**Tabela 2 i 3**) kao i istraživanja od strane Stanimirovića i sar. (2019), Tarića i sar. (2019, 2020).

Znatno viši nivo iRNK za gen GOX u komercijalno gajenim društvima (**Grafikon 6**) u odnosu na pčele gajene u trmkama dodatni je nalaz koji podržava hipotezu o negativnom uticaju čoveka. Društva u ispitivanim pčelinjacima sa komercijalno i tradicionalno gajenim pčelama žive u identičnim uslovima životne sredine i hrane se istom medonosnom florom, s tim što se prve intenzivno komercijalno korsite i dohranjuju šećernim sirupom ili pogačom (u uslovima oskudne prirodne paše i za stimulaciju rada matice), a zatim i tretiraju antivaraoznim i drugim, retko registrovanim, veterinarskim preparatima (**Tabela 2 i 3**). Kod komercijalno gajenih pčela otkrivena je veća prevalencija patogena (Tarić i sar., 2019; 2020), ali i značajno viši nivo iRNK za gen GOX, s obzirom da je GOX parameter socijalnog imuniteta u koji pčele ulažu mnogo više nego u individualni imunitet (Alaux i sar., 2010). Povećana ekspresija GOX gena zavisi od kvaliteta dostupne hrane. Aktivnost GOX se povećava upotrebom poliflorne ishrane (prevažno je pod uticajem polen različitih biljnih vrsta) i doprinosi jačanju imuniteta u odnosu na monoflornu ishranu (Alaux i sar., 2010). Iako su i komercijalno i tradicionalno gajena društva u našem istraživanju boravila na istom području i koristila pašu jednakog kvaliteta i količine, značajno je bio veći transkriptski nivo za GOX gen u komercijalnim društvima. Za razliku od komercijalno gajenih društava, pčele u trmkama su evidentno znatno manje bile opterećene patogenima. Pored toga, uticaj pčelara na njih bio je znatno slabiji, jer im nije dodavana neprirodna hrana (sirup i pogače koje su pravili pčelari), nisu bile lišene ni meda, a nije bilo ni upotrebe veterinarskih preparata (**Tabela 2 i 3**). Imale su uravnoteženu i prirodnu hranu (med i pergu) i možemo pretpostaviti da zbog toga nije

bilo potrebe da povećaju sintezu GOX-a, verovatno zbog razvijene homeostaze kao rezultat nepostojanja uznemirujućih postupaka od strane pčelara, koji su neizbežni i uobičajeni u komercijalnom pčelarenju („šećerizacija“, neprofesionalna upotreba akaricida i česti uznemiravajući pregledi košnica). Čisti šećer (u obliku sirupa ili pogače) koji se često daje komercijalno gajenim pčelama može izazvati energetski i oksidativni stres, širenje patogena, iscrpljivanje pčela, njihovu povećanu smrtnost i često kolaps društva (Mayack i Naug, 2009, 2010; Martín Hernández i sar., 2011; Stanimirović i sar., 2019, Tarić i sar., 2020).

Pčelinja društva su često naizgled zdrava - različiti patogeni mogu biti dugo asimptomatski prisutni kod pčela (Simeunović, 2015; Ćirković i sar., 2018; Tarić i sar., 2019). Epizootiološka istraživanja mnogih autora otkrila su visoku prevalencu nozemoze u komercijalnim pčelinjacima širom sveta (Tlak-Gajger i sar., 2010; Traver i Fell, 2011; Fernández i sar., 2012; Stevanović i sar., 2011, 2013, 2016). U takvim društvima neuravnotežena ishrana uz kombinaciju sa drugim stresorima (patogeni, agropesticidi, savremena apitehnika) je “faktor plus” koji dovodi do slabljenja društva, pada imuniteta, poremećaja odnosa domaćin – parazit, energetskog i oksidativnog stresa i na kraju do kolapsa društva (Martín-Hernández i sar., 2011; Bordier i sar., 2017; Stanimirović i sar., 2019, Tarić i sar., 2020). Pored ovoga, hemizacija životne sredine agropesticidima i prekomerna primena akaricida i drugih preparata kod komercijalnog pčelarstva negativno utiče na zdravlje, imunitet i ponašanje pčela (Kiljanek i sar., 2016; Sánchez-Bayo i sar. 2016; Glavinic i sar., 2019), kao i na kvalitet pčelinjih proizvoda (Stanimirović i sar., 2002, 2005 a, b, 2007; Stevanović i sar., 2008; Stanimirovic i sar., 2019). Dugoročna upotreba antivaroznih preparata ometa koevoluciju domaćin - parazit (Neumann i Blacquièrè, 2017).

Kada je reč o razlici u broju analiziranih tradicionalnih i komercijalnih društava, može se postaviti pitanje: „da li povećanje broja trmki može biti direktno proporcionalno povećanju broja patogena? Statističkim analizama (EstimateS) pokazali smo da je analizirani broj trmki (24) bio i više nego dovoljan, jer na osnovu rarefrakcione krive je utvrđeno da se plato postiže već sa 12 analiziranih košnica u eksperimentu (**Slika 11**), pa bez obzira na eventualno povećanje broja trmki broj patogena ostaje nepromenjen (Tarić i sar., 2019).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz aktuelne literature, može se zaključiti sledeće:

1. Rezultati ovog rada dokazuju postojanje velikog broja društva sa asimptomatskim infekcijama i potvrđuju opravdanost primene molekularno-genetičkih metoda u analizi prisustva pčelinjih patogena.

2. Među pčelinjim društvima koje se uzgajaju tradicionalno, 66,66% je bilo bez prisustva praćenih patogena.

3. U komercijalno gajenim društvima sva četiri praćena virusa (ABPV, CBPV, DWV i SBV) detektovana su sa visokom prevalencom i to: DWV i ABPV u 96,67% slučajeva, SBV u 83,33% i CBPV u 100,00% uzoraka.

4. Tradicionalno gajene pčele nisu bile zaražene uzročnicima praćenih bakterijskih i gljivičnih bolesti, dok je među komercijalno gajenim, 16,67% bilo inficirano uzročnikom *Paenibacillus larvae* i 15,38% uzročnikom *Ascospheara apis*.

5. Uzročnik *Melissococcus plutonius* nije dokazan ni u jednom ispitivanom uzorku bez obzira na tip pčelarenja.

6. Kod komercijalno gajenih pčela utvrđeno je prisustvo ektoparazita *Varroa destructor*, kako u leglu, tako i na odraslim pčelama, dok kod tradicionalno gajenih ovaj ektoparazit nije bio detektovan.

7. Tradicionalan i prirodan način pčelaranja omogućava značajno bolje uslove za borbu sa patogenima i održavanje dobrog zdravlja pčela. Antropogeni uticaj je presudan kada je u pitanju širenje virusnih infekcija koje su povezane sa njihovim vektorom, ektoparazitom *Varroa destructor*.

8. Niži nivoi ekspresije GOX gena kod tradicionalno gajenih pčela u odnosu na komercijalno gajene može se smatrati odrazom njihove manje opterećenosti patogenima u odnosu na komercijalno gajena.

9. Veći nivo oksidativnog stresa, veća prevalenca endoparazita *Nosema ceranae* i *Lotmaria passim*, kao i povišena ekspresija gena za GOX kod komercijalno gajenih pčela predstavlja reakciju na antropogeno izazvan stres i napor društva da ublaži negativne efekte prouzrokovane od strane čoveka.

10. Svi rezultati ove disertacije dokazuju bolje stanje pčela u tradicionalno gajenim društvima (sličnim uslovima života pčela u divljini) i ukazuju na neophodnost opreza prilikom antropogenih aktivnosti kako bi negativni efekti na komercijalno gajena društva bili što manji.

8. LITERATURA

1. Aebi H, 1984, Catalase in vitro, *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
2. Ahmad S, 1995, Oxidative stress from environmental pollutants, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2), 135–57.
3. Ahmad S, Pardini RS, 1990, Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects, *Free radical biology & medicine*, 8(4), 401–13.
4. Ahmed AM, 2012, Lipid peroxidation and oxidative protein products as biomarkers of oxidative stress in the autogenous mosquito, *Aedes caspius*, upon infection with the mosquitocidal bacterium, *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Pakistan Journal of Zoology*, 44, 525-536.
5. Aizen MA, Garibaldi LA, Cunningham SA, Klein AM, 2009, How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production, *Annals of Botany*, 103(9), 1579-1588.
6. Aizen MA, Lawrence DH, 2009, The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination, *Current Biology* 19(11), 915-918.
7. Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y, 2010, Diet effects on honeybee immunocompetence, *Biology Letters*, 6, 562-565.
8. Alipi AM, 1995, Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium, *Microbiologia SEM*, 11, 343–350.
9. Alippi AM, 1991, A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina, *Jurnal Apiculture Research*, 30, 75–80.
10. Allen M, Ball B, 1996, The incidence and world distribution of honey bee viruses, *Bee World*, 77(3), 141-162.
11. Anderson, DL, Gibson NL, 1998, New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia, *Australian Systematic Botany*, 11, 53–72.
12. Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P, 2006, Honeybee viruses in Uruguay, *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 67- 70.

13. Antúnez K, Piccini C, Castro-Sowinski S, Rosado AS, Seldin L, Zunino P, 2007, Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates, *Veterinary Microbiology*, 124, 178–183
14. Arismendi N, Bruna A, Zapata N, Vargas M, 2016, PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries, *Journal of Invertebrate Pathology*, 134, 1-5.
15. Aronstein KA, Murray KD, 2010, Chalkbrood disease in honey bees, *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 20-29.
16. Ash CI, Fergus PG, Collins MD, 1993, Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test, *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3-4), 253-260.
17. Ashiralieva A, Genersch E, 2006, Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees-a review, *Apidologie*, 37(4), 411.
18. Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcaro C, Gallina A, Mutinelli F, 2010, Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies, *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2), 164–170.
19. Bailey L, 1957, The cause of European foulbrood, *Bee World*, 38(4), 85-89.
20. Bailey L, 1959, Recent research on the natural history of European foul brood disease, *Bee World*, 40(3), 66-70.
21. Bailey L, 1960, The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus.
22. Bailey L, 1963, *Infectious Diseases of the Honey-bee*.
23. Bailey L, 1963a, The pathogenicity for honey-bee larvae of microorganisms associated with European foulbrood, *Journal of Insect Pathology*, 5(2), 198-205.
24. Bailey L, Ball B, 1991, *Honey Bee Pathology*, Academic Press, London.
25. Bailey L, Ball BV, Perry JN, 1983, Honeybee paralysis: its natural spread and its diminished incidence in England and Wales, *Journal of Apicultural Research*, 22, 191–195.
26. Bailey L, Gibbs J, 1964, Acute infection of bees with paralysis virus, *Journal of Insect Pathology*, 6(4), 395-407.

27. Bailey L, Locher N, 1968, Experiments on the etiology of European foul brood of the honeybee, *Journal of Apicultural Research*, 7(2), 103-107.
28. Bailey L, Milne RG, 1969, The multiplication regions and interaction of acute and chronic bee-paralysis viruses in adult honey bees, *Journal of General Virology*, 4(1), 9-14.
29. Baker GM, Torchio GM, 1968, New records of *Ascosphaera apis* from North America, *Mycologia*, 60, 189–190.
30. Ball BV, Bailey L, 1991, Viruses of honey bees, *Atlas of Invertebrate Viruses*, 525-551.
31. Ball BV, Bailey L, 1997, Viruses. In: Morse RA, Flottum K, (Eds.), *Honey Bee Pests*.
32. Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK, 1999, Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis, *Current science*, 658-666.
33. Bankova VS, 2005, Recent trends and important developments in propolis research, *eCAM*, 2,29–32.
34. Beekman M, Ratnieks FLW, 2000, Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology*, 14, 490–496.
35. Belloy L, Imdorf A, Fries I, Forsgren E, Berthoud H, Kuhn R, Charriere JD, 2007, Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood, *Apidologie*, 38, 136–140.
36. Betteridge DJ, 2000, What is oxidative stress?, *Metabolism*, 49(2), 3–8.
37. Betts AD, 1932, Fungus diseases of bees, *Bee World*, 40, 156.
38. Bigliardi E, Sacchi L, 2001, Cell biology and invasion of the microsporidia, *Microbes and Infection*, 3(5), 373-379.
39. Bissett J, 1988, Contribution toward a monograph of the genus *Ascosphaera*, *Canadian Journal of Botany*, 66(12), 2541-2560.
40. Bogdanov S, Kilchenmann V, Imdorf A, 1998, Acaricide residues in some bee products, *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 57-67.
41. Bogdanov S, Kilchenmann V, Seiler K, Pfefferli H, Frey T, Roux B, ... Noser J, 2004, Residues of para-dichlorobenzene in honey and beeswax, *Journal of Apicultural Research*, 43(1), 14-16.

42. Bordier C, Suchail S, Pioz M, Devaud JM, Collet C, Charreton M, ... Alaux C, 2017, Stress response in honeybees is associated with changes in task-related physiology and energetic metabolism, *Journal of Insect Physiology*, 98, 47–54.
43. Borum AE, Ulgen M, 2008, Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) infection and fungal agents of honey bees in North- West Turkey, *Journal of Apicultural Research*, 47, 170–171.
44. Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Garrido-Bailón E, Nanetti A, Meana A, Higes M, 2011, *Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies, *Environmental Microbiology Reports*, 4, 57–65.
45. Bradbear N, 1988, The world distribution of major honeybee diseases and pests, *Bee World*, 69, 15–39.
46. Bradford, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
47. Brodschneider R, Gray A, van der Zee R, Adjlane N, Brusbardis V, Charrière JD, Chlebo R, Coffey MF, Crailsheim K, Dahle B, Danihlík J, 2016, Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey, *Journal of Apicultural Research*, 55, 5, 375-378.
48. Brødsgaard CJ, Hansen H, Ritter W, 2000, Progress of *Paenibacillus larvae larvae* infection in individually inoculated honey bee larvae reared single in vitro, in micro colonies, or in full-size colonies, *Journal of Apicultural Research*, 39(1–2), 19–27.
49. Brown MJ, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P, 2003, Strong context-dependent virulence in a host–parasite system: reconciling genetic evidence with theory, *Journal of Animal Ecology*, 72 (6), 994-1002.
50. Budge GE, Barrett B, Jones B ... Brown MA, 2010, The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures, *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2), 164-170.
51. Budge, G. E., Barrett, B., Jones, B., Pietravallo, S., Marris, G., Chantawannakul, P., ... Brown, M. A. (2010), The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures, *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2), 164-170.

52. Burnham AJ, McLaughlin F, Burnham PA, Lehman KH, 2019, Local honey bees (*Apis mellifera*) have lower pathogen loads and higher productivity compared to non-local transplanted bees in North America, *Journal of Apicultural Research*, 58(5), 694-701.
53. Celle O, Blanchard P, Olivier V, Schurr F, Cougoule N, Faucon JP, Ribiere M, 2008, Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread, *Virus Research*, 133(2), 280-284.
54. Chaitanya, RK, Shashank K, Sridevi P, 2016, Oxidative stress in invertebrate systems, In *Free Radicals and Diseases*, 19.
55. Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M, 2006, A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Tai honeybee (*Apis mellifera*) apiary, *Journal of Invertebrate Pathology*, 91, 69-73.
56. Chauzat MP, Jacques A, Laurent M, Bougeard S, Hendrikx P, Ribière-Chabert M, EPILOBEE Consortium, 2016, Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance, *Apidologie*, 47, 3, 348-378.
57. Chen YP, Evans J, Feldlaufer M, 2006a, Horizontal and vertical transmission of viruses in the honeybee, *Apis mellifera*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 152-159.
58. Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF, 2005, Quantitative analysis by real-time reverse transcription-PCR of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.), *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 436-441.
59. Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF, 2006b, Prevalence and transmission of honey bee viruses, *Applied and Environmental Microbiology* 72: 606-611.
60. Chen YP, Siede R, 2007, Honey bee viruses, *Advances in Virus Research*, 70, 33-80.
61. Cheshire FR, Cheyne WW, 1885, The pathogenic history and history under cultivation of a new bacillus (*B. alvei*), the cause of a disease of the hive bee hitherto known as foul brood, *Journal of the Royal Microscopical Society*, 5(4), 581-601.
62. Cirkovic D, 2002, Reproductive-productive and hygienic-grooming characterization of honey bee ecotype from Sjenica and Pester region (MSc thesis). University of Belgrade, Belgrade, Serbia.

63. Cirkovic D, Stevanovic J, Glavinic U, Aleksic N, Djuric S, Aleksic J, Stanimirovic Z, 2018, Honey bee viruses in Serbian colonies of different strength, PeerJ, 6, e5887, doi: 10.7717/peerj.5887.
64. Cirkovic D, Stevanovic J, Glavinic U, Aleksic N, Djuric S, Aleksic J, Stanimirovic Z, 2018, Honeybee viruses in Serbian colonies of different strength, Peer Journal, 6, e5887.
65. Colwell RK, Chao A, Gotelli NJ, Lin SY, Mao CX, Chazdon RL, Longino JT, 2012, Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation, and comparison of assemblages, Journal of Plant Ecology, 5, 3-21.
66. Colwell RK, Mao CX, Chang J, 2004, Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves, Ecology, 85, 2717-272.
67. Copley TR, Jabaji SH, 2012, Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees, Journal of Applied Microbiology, 112, 15–24.
68. Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, van Engelsdorp D, Evans JD, 2012, Pathogen webs in collapsing honey bee colonies, PLoS ONE, 7 (8), e43562.
69. Corradi N, Keeling PJ, 2009, Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions, Fungal Biology Reviews, 23(1), 1-8.
70. Cotter SC, Kilner RM, 2010, Personal immunity versus social immunity, Behavioral Ecology, 21, 663–668.
71. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, 2007, A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder, Science, 318(5848), 283-287.
72. Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P, 2007, Social immunity, Current Biology, 17, 693–702.
73. Cremer S, Sixt M, 2009, Analogies in the evolution of individual social immunity, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences, 364, 129–142.
74. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P, 2012, Predictive markers of honey bee colony collapse, PLoS ONE, 7(2), e32151.

75. Dall DJ, 1985, Inapparent infection of honey bee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia, *Annals of Applied Biology*, 106(3), 461-468.
76. Davis C, Ward W, 2003, Control of chalkbrood disease with natural products: a report for the RIRDC, Publication No. 03/107, Kingston, ACT, AU, 1–23.
77. De Graaf DC, Raes H, Sabbe G, De Rycke PH, Jacobs FJ, 1994, Early Development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the Midgut Epithelium of the Honeybee (*Apis mellifera*), *Journal of Invertebrate Pathology*, 63(1), 74-81.
78. de Graaf DC, Vandekerchove D, Dobbelaere W, Peeters JE, Jacobs FJ, 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.
79. de Guzman LI, Frake AM, Simone-Finstrom M, 2017, Comparative flight activities and pathogen load of two stocks of honey bees reared in gamma-irradiated combs, *Insects*, 8, 127.
80. De Miranda J, Cordoni G, Budge G, 2010, The acute bee paralysis virus –Kashmir bee virus – Israeli acute paralysis virus complex, *Jurnal Invertebrate Pathologi*, 103, 30–47.
81. de Miranda J, Genersch E, 2010, Deformed wing virus, *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 48–61.
82. de Miranda JR, Fries I, 2008, Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.), *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 184–189.
83. Delaplane KS, Van der Steen J, Guzman-Novoa E, 2013, Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. In: Dietemann V, Ellis JD and Neumann P. (Eds.), *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: Standard methods for Apis mellifera research*, *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-12.
84. Dingmann DW i Stahly DP, 1983, Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components, *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 860–869.
85. Dobbelaere W, De Graaf CD, Peeters EJ, 2001, 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(4), 363-370.

86. Dobrić Đ, Vicković D, Kulišić Z, 2000, Bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
87. Dolasevic S, Stevanovic J, Aleksic N, Glavinic U, Deletic N, Mladenovic M, Stanimirovic Z, 2020, The effect of diet types on some quality characteristics of artificially reared *Apis mellifera* queens, Journal of Apicultural Research, 59(1), 115-123.
88. Dolašević S, 2020, The influence of diet on the quality of naturally and artificially obtained queen bees, and vitellogenin gene expression during their development. Doctoral Dissertation, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1-91.
89. Dönhoff LR, 1857, Ueber Fadenpilze im Darm der Biene, Bien Zeit, 13, 66-7.
90. Dreher K, 1938, Auftreten von Bienenkrankheiten in Niedersachsen und Braunschweig im Jahre 1937, Niedersächsische Imker, 73(12), 282–284.
91. Dubovskiy IM, Martemyanov VV, Vorontsova YL, Rantala MJ, Gryzanova EV, Glupov VV, 2008, Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae), Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 148, 1-5.
92. Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi JH, Hernández RM, Botías C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RFA, Le Conte Y, Alaux C, 2012, Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*, PloS ONE, 7,e37017.
93. Dzierżon J, 1882, Dzierzon's Rational Bee-keeping: Or, The Theory and Practice of Dr. Dzierzon ... Houlston & sons.
94. Ellis JD, Munn PA, 2005, The worldwide health status of honey bees, Bee world, 86(4), 88-101.
95. Evans JD, 2006, Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease, Journal of Invertebrate Pathology, 93, 135–139.
96. Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006, Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*, Insect Molecular Biology, 15, 645–656.
97. Evans JD, Pettis JS, 2005, Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*, Evolution, 59, 2270–2274.

98. Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, 2009, Colony collapse disorder: a descriptive study, *PloS ONE*, 4 (8), e6481.
99. Evans JD, Spivak M, 2010, Socialized medicine: Individualcommunal disease barriers in honey bees, *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), 62–72.
100. Evans P, Halliwell B, 1999, Free radicals and hearing, Cause, consequence, and criteria, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 884, 19–40.
101. Felton GW, Summers CB, 1995, Antioxidant systems in insects, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2), 187–97.
102. Fernández JM, Puerta F, Cousinou M, Dios-Palomares R, Campano F, Redondo L, 2012, Asymptomatic presence of *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries, *Journal of Invertebrate Pathology*, 111, 106-110.
103. Fievet J, Tentcheva D, Gauthier L, De Miranda J, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2006, Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L., *Virology Journal*, 3(1), 16.
104. Flores JM, Gutierrez I, Espejo R, 2005b, The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions, *Mycologia*, 97, 1171–1176.
105. Flores JM, Gutierrez I, Puerta F, 2004, Oxytetracycline as a predisposing condition for chalkbrood in honeybee, *Veterinary Microbiology*, 103(3), 195-199.
106. Flores JM, Ruiz JA, Ruz JM, Puerta F, Bustos M, Padilla F, Campano F, 1996, Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions, *Apidologie*, 27, 185–192.
107. Flores JM, Spivak M, Gutiérrez I, 2005a, Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood, *Veterinary Microbiology* 108(1), 141-144.
108. Forsgren E, 2010, European foulbrood in honey bees, *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 5-9.
109. Forsgren E, Budge GE, Charrie`re JD, Hornitzky MAZ, 2013, Standard methods for European foulbrood research, *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–14.
110. Forsgren E, Fries I, 2010, Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees, *Veterinary Parasitology*, 170(3), 212-217.

111. Forsgren E, Lundhagen AC, Imdorf A, Fries I, 2005, Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood, *Microbial Ecology*, 50, 369–374.
112. Forsgren E, Stevanovic J, Friesa I, 2008, Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes, *Veterinary Microbiology* 129(3–4), 342-349.
113. Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME, 1999, Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47(1-2), 1-24.
114. Franzen C, 2005, How do microsporidia invade cells?, *Folia parasitologica*, 52(1-2), 36-40.
115. Frazier M, Mullin C, Frazier J, Ashcraft S, 2008, What have pesticides got to do with it?, *American Bee Journal*, 148(6), 521-524.
116. Freeman BM, 1987, The stress syndrome, *World's Poultry Science Journal*, 43, 15-19.
117. Freiberg M, De Jong D, Message D, Cox-Foster D, 2012, First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil, *Genetics and Molecular Research*, 11(3), 3310-3314.
118. Fries I, 1988, Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee, *Apidologie* 19, 319–328.
- Fries I, 1993, *Nosema apis*, a parasite in the honey bee colony, *Bee World*, 74(1), 5-19.
119. Fries I, 1997, Protozoa. In: Morse RA, Flottum K, (Eds.), *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, third ed. A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA, 59–76.
120. Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ, 1996, *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae), *European Journal of Protistology*, 32, 356–365.
121. Furgala B, Boch R, 1970, The Effect of Fumidil-B, Nosemack and Humatin on *Nosema apis*, *Jurnal Apiculture Resacarch*, 9, 2, 79-85.
122. García-Palencia P, Martín-Hernández R, González-Porto AV, Marín P, Meana A, Higes M, 2010, Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-workers honey bees (*Apis mellifera*), *Journal of Apicultural Research*, 49, 278–283.

123. Gauthier L, Ravallec M, Tournaire M, Cousserans F, Bergoin M, Dainat B, de Miranda, JR, 2011, Viruses associated with ovarian degeneration in *Apis mellifera* L. Queens, PLoS ONE, 6(1), e16217.
124. Gauthier L, Tentcheva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2007, Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique, *Apidologie*, 38, 426-435.
125. Gegear RJ, Otterstatter MC, Thomson JD, 2005, Does parasitic infection impair the ability of bumblebees to learn flower-handling techniques?, *Animal Behaviour*, 70(1), 209-215.
126. Genersch E, Ashiralieva A, Ingemar F, 2005, Strain-and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae subsp. larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7551-7555.
127. Genersch E, 2010a, Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping, *Applied microbiology and biotechnology*, 87(1), 87-97.
128. Genersch E, Aubert M, 2010, Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.), *Veterinary Research*, 41, 54.
129. Genersch E, 2010b, American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*, *Journal of invertebrate pathology*, 103, 10-19.
130. Genersch E, Forsgren, E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I, 2006, Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3), 501-511.
131. Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM, Carter MJ, 1999, The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus, *Journal of General Virology*, 80(6), 1541-1549.
132. Giangaspero M, Sekiguchi S, 2016, Risk Assessment of Animal Infectious Diseases and Decision Making Proces, *Clinical Microbiology*, 5, 242.
133. Giersch T, Berg T, Galea F, Hornitzky M, 2009, *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia, *Apidologie* 40, 117–123.

134. Gilliam M, Dunham DR, 1978, Recent isolation of *Bacillus pulvifaciens* from powdery scales of honey bee, *Apis mellifera*, larvae, *Journal of Invertebrate Pathology*, 32, 222–223.
135. Gilliam M, Taber S, Richardson GV, 1983, Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease, *Apidologie*, 14(1), 29-39.
136. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA, 1991, Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients, *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 31(1), 32-35.
137. Gisder S, Aumeier P, Genersch E, 2009, Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*), *Journal of General Virology*, 90(2), 463-467.
138. Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz MC, Linde A, Genersch E, 2010, Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*?, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3032–3038.
139. Glavinic U, Stankovic B, Draskovic V, Stevanovic J, Petrovic T, Lakic N, Stanimirovic Z, 2017, Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*, *PLoS ONE*, 12(11), e0187726.
140. Glavinic U, Tesovnik T, Stevanovic J, Zorc M, Cizelj I, Stanimirovic Z, Narat M, 2019, Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*, *PeerJ*, 7, e6325.
141. Glinski Z, 1982, Studies on pathogenicity of *Ascospaera apis* for larvae of the honeybee *Apis mellifera* L. Part II. Relationships between biochemical types and virulence of *A. apis*. *Annales Universitatis Mariae Curie Skłodowska*, 37(8), 69–77.
142. Glinski Z, Chmielewski M, 1996, Imidazole derivatives in control of the honey bee brood mycoses, *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 40(2), 165–173.
143. Gochnauer TA, 1973, Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture, *Journal of Invertebrate Pathology*, 22, 251–257.
144. Gomez-Moracho T, Heeb P, Lihoreau M, 2017, Effects of parasites and pathogens on bee cognition, *Ecological Entomology*, 42, 51-64.
145. Gordon RE, Haynes WC, Pang CHN, 1973, The genus *Bacillus*, *Agriculture Handbook N° 427*, USDA, Washington D.C.

146. Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL, 2015, Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers, *Science*, 347, 6229, 1255957.
147. Govani VA, Leat N, Allsopp M, Davison S, 2000, Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses, *Virology*, 277(2), 457-463.
148. Grabensteiner E, Ritter W, Carter MJ, Davison S, Pechhacker H, Kolodziejek J, Boecking O, Derakhshifar I, Moosbeckhofer R, Licek E, Nowotny N, 2001, Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 93–104.
149. Gruenewald C, Botella JA, Bayersdorfer F, Navarro JA, Schneuwly S, 2009, Hyperoxia-induced neurodegeneration as a tool to identify neuroprotective genes in *Drosophila melanogaster*, *Free Radical Biology and Medicine*, 46(12), 1668-1676.
150. Ha E, M Oh CT, Ryu JH, Bae YS, Kang SW, Jang IH, Brey PT, Lee1 WJ, 2005, An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*, *Developmental Cell*, 8, 125–132.
151. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974, Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
152. Hansen H, Brødsgaard CJ, 1999, American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control, *Bee world*, 80(1), 5-23.
153. Haseman L, 1961, How long can spores of American foulbrood live, *American Bee Journal*, 101, 298-299.
154. Hawksworth, DL, Sutton BC, Ainsworth GC, 1983, Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, CAB International, Kew, 30–31.
155. Heath LAF, 1982, Development of chalk brood in a honey bee colony; chalk brood pathogens: a review, *Bee World*, 63(3), 119–135.
156. Heath LAF, 1985, Occurrence and distribution of chalk brood disease of honeybees, *Bee World*, 66, 9–15.

157. Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E, 2011, Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood, *Journal of Invertebrate Pathology*, 108, 167-73.
158. Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Janssen P, Kersters K, De Vos P, ... Berkeley RCW, 1996, Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash i sar. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash i sar. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *Pulvifaciens*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(1), 270-279.
159. Higes M, Martín R, Meana A, 2006, *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe, *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 93–95.
160. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, 2010, *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis, *Apidologie* 41, 375–392.
161. Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R, 2013, *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen, *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 17-29.
162. Hinshaw C, Evans KC, Rosa C , López-Uribe MM, 2020, The role of pathogen dynamics and immune gene expression in the survival of feral honey bees, *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 505.
163. Hitchcock JD, Christensen M, 1972, Occurrence of chalk brood (*Ascosphaera apis*) in honey bees in the United States, *Mycologia*, 64(5), 1193–1198.
164. Hornitzky M, 2001, Literature review of chalkbrood, A report for the RIRDC, Publication No. 01/150, Kingston, ACT, Australia.
165. Hornitzky MAZ, Clark S, 1991, Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood, *Jurnal Apicultural Research*, 30(1), 13–16.
166. Hornitzky MAZ, Karlovskis S, 1989, A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees, *Journal of Apicultural Research*, 28, 118–120.
167. Hrabák J, Martínek K, 2007, Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* by using substrate-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, *Journal of apicultural research*, 46(3), 160-164.

168. Huang WF, Jiang JH, Chen YW, Wang CH, 2007, A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*, *Apidologie*, 38, 30–37.
169. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM , 2011, Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation, *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4-6), 234-246.
170. Ivanović J, Baltić MŽ, Jelić D, Janjić J, Bošković M, Marković R, Starčević-Dokmanović M, 2015, Research of production volume and market turnover of honey from 2004 to 2014, *Veterinarski glasnik*, 69(5-6), 467-478.
171. James RR, Skinner JS, 2005, PCR diagnostic methods for *Ascospaera* infections in bees, *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(2), 98-103.
172. James TJ, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, ... Vilgalys V, 2006, Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny, *Nature*, 443, 818–822.
173. Jensen AB, Aronstein K, Flores JM, Vojvodic S, Palacio MA, Spivak M, 2013, Standard methods for fungal brood disease research, *Journal of Apicultural research*, 52(1), 1-20.
174. Kanbar G, Engels W, 2003, Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites, *Parasitology Research*, 90(5), 349-354.
175. Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Müller HM, Botella-Munoz J, ... Becker K, 2001, Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*, *Science*, 291(5504), 643-646.
176. Katznelson H, 1950, *Bacillus pulvifaciens* (n. Sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae, *Journal of bacteriology*, 59, 153–155.
177. Keeling P, 2009, Five questions about microsporidia, *PLoS pathogens*, 5(9), e1000489.
178. Kilwinski J, Peters M, Ashiralieva A, Genersch E, 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, *Veterinary Microbiology*, 104(1-2), 31-42.

179. Kiljanek T, Niewiadowska A, Posytniak A, 2016, Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning, *Journal of Apicultural Science*, 60, 5-24.
180. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, ... Paxton R, 2007, Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 1–10.
181. Koch H, Schmid-Hempel P, 2011, Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19288-19292.
182. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS, 1992, Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide, *Chemical Research in Toxicology*, 5(6), 834-842.
183. Korayem AM, Khodairy MM, Abdel-Aal AA, El-Sonbaty AM, 2012, The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons, *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2(2), B93–B109.
184. Kounatidis I, Ligoxygakis P, 2012, *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection, *Open Biology*, 2(5), 120075.
185. Krishnan N, Kodrik D, 2006, Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress?, *Jurnal Insect Physiology*, 52(1), 11–20.
186. Krishnan N, Kodrik D, Kłodkiewicz B, Sehnal F, 2009, Glutathione–ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say), *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(3), 180-188.
187. Krishnan N, Kodrik D, Turanli F, Sehnal, F, 2007a, Stage-specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*, *Journal of Insect Physiology*, 53(1), 67-74.
188. Krishnan N, Večeřa J, Kodrik D, Sehnal F, 2007b, 20-hydroxyecdysone prevents oxidative stress damage in adult *Pyrrhocoris apterus*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 65(3), 114-124.

189. Kulinčević JM, Rothenbuhler WC, 1989, The effects of artificial infection with chronic bee paralysis virus on queens from strains of honeybees resistant or susceptible to hairless-black syndrome, *Journal of Apicultural Research*, 28, 79–80.
190. Kulinčević JM, Rothenbuhler WC, Stairs GD, 1973, The effect of presence of a queen upon outbreak of a hairless-black syndrome in the honey bee, *Journal of Invertebrate Pathology*, 21, 241-247.
191. Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, Larhantec M, Delbac F, Pouliguen H, 2012, Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination, *Environmental Pollution*, 170, 254–259.
192. Langenheim JH, 2003, *Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany*, Timber Press, Cambridge.
193. Langridge DF, McGhee RB, 1967, *Crithidia mellifica* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*, *The Journal of protozoology*, 14 (3), 485-487.
194. Lanzi G, de Miranda JR, Boniotti MB, Cameron CE, Lavazza A, Capucci L, Rossi C, 2006, Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.), *Journal of Virology*, 80(10), 4998-5009.
195. Lee KV, Steinhauer N, Rennich K, Wilson ME, Tarpy DR, Caron DM, Rose R, Delaplane KS, Baylis K, Lengerich EJ, Pettis J, 2015, A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA, *Apidologie*, 46, 292-305.
196. Liu TP, 1991, Ultrastructural changes in the spore and mycelia of *Ascosphaera apis* after treatment with benomyl (Benlate 50 W), *Mycopathologia*, 116, 23–28.
197. Liu TP, 1992, Oöcytes degeneration in the queen honey bee after infection by *Nosema apis*, *Tissue and Cell*, 24(1), 131-138.
198. Lončarić I, Derakhshifar I, Oberlerchner JT, Köglberger H, Moosbeckhofer R, 2009, Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria, *Journal of Invertebrate Pathology*, 100, 44–46.
199. Lopes LQS, Quatrin PM, De Souza ME, De Almeida Vaucher R, Vianna SRC, 2015, Fungal infections in honey bees, *Fungal Genomics Biology*, 4, 118.
200. Maassen A, 1913, Weitere Mitteilungen über die seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen [Further communication on the epidemic brood disease of bees], *Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft*, 14, 48-58.

201. Malloch D, 1981, The plectomycete centrum. In: Reynolds, D.R. (Ed.), *Ascomycete Systematics: The Luttrellian Concept*, Springer-Verlag, New York, 73–91.
202. Malone LA, Gatehouse HS, Tregidga EL, 2001, Effects of Time, Temperature, and Honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a Parasite of the Honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *Journal of Invertebrate Pathology*, 77, 258–268.
203. Marinković S, Nedić N, 2010, Analysis of production and competitiveness on small beekeeping farms in selected districts of Serbia, *Applied Studies in Agribusiness and Commerce APSTRACT*, Agroinform Publishing House, Budapest, 1-5.
204. Martín-Hernández R, Botías C, Barrios L, Martínez-Salvador A, Meana A, Mayack C, Higes M, 2011, Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*), *Parasitology Research*, 109, 605-612.
205. Martin-Hernandez R, Meana A, Prieto L, Martinez- Salvador A, Garrido-Bailon E, Higes M, 2007, Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6331–6338.
206. Maslov DA, Votýpka J, Yugesrchenko V, Lukeš J, 2013, Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed, *Trends in parasitology*, 29(1), 43-52.
207. Mathews MC, Summers CB, Felton GW, 1997, Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34(1), 57–68.
208. Mattila HR, Rios D, Walker-Sperling VE, Roeselers G, Newton IL, 2012, Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse, *PLoS ONE*, 7(3).
209. Mayack C i Naug D, 2010, Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers, *Journal of Insect Physiology*, 56, 1572-1575.
210. Mayack C, Naug D, 2009, Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection, *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 185-188.
211. McConville MJ, De Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T, 2007, Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania amastigotes*, *Trends in parasitology*, 23(8), 368-375.

212. McKee BA, Djordjevic SP, Goodman R D, Hornitzky MA, 2003, The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR, *Apidologie*, 34(1), 19-27.
213. McKee Ben A, Russell DG, Hornitzky MA, 2004, The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*), *Journal of Apicultural Research*, 43(3), 93-100.
214. Mehlhorn H, 2008, *Encyclopedia of Parasitology*, AM (Ed.), Springer, 1.
215. Meunier J, 2015, Social immunity and the evolution of group living in insects, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1669), 20140102.
216. Miller GA, Simpson SJ, 2010, Isolation from a marching band increases haemocyte density in wild locusts (*Chortoicetes terminifera*), *Ecological Entomology*, 35, 236–239.
217. Mingxiao M, Yanna Y, Xiaoli X, Lin Z, Yongfei L, Zhidong L, 2013, Genetic characterization of VP1 gene of seven Sacbrood virus isolated from three provinces in northern China during the years 2008–2012, *Virus Research*, 176(1), 78-82.
218. Misra HP, Fridovich I, 1972, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 3170–3175.
219. Mockel N, Gisder S, Genersch E, 2011, Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route, *Journal of General Virology*, 92(2), 370-377.
220. Moreira da Silva F, Marques A, Chaveiro A, 2010, Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in Reproduction, *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 127-133.
221. Morimoto T, Kojima Y, Toki T, Komeda Y, Yoshiyama M, Kimura K, Nirasawa K, Kadowaki T, 2011, The habitat disruption induces immune-suppression and oxidative stress in honey bees, *Ecology and Evolution*, 1, 201-217.
222. Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Kadowaki T, 2012, Molecular identification of Chronic bee paralysis virus Infection in *Apis mellifera* Colonies in Japan, *Viruses*, 4 (7), 1093-1103.

223. Morrissey BJ, Helgason, T, Poppinga L, Fünfhaus A, Genersch E, Budge GE, 2015, Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme, *Environmental microbiology*, 17(4), 1414-1424.
224. Morse RA, Flottum K, 1997, Honey bee pests, predators, and diseases, 3rd ed. AI Root Company, Medina, OH.
225. Mourad AK, Zaghoul OA, El MK, Nemat FM, Morsy ME, 2005, A novel approach for the management of the chalkbrood disease infesting honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies in Egypt, *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 70(4), 601-611.
226. Munćan P, Božić D, 2007, Regional Aspects of Beekeeping in Serbia, V Scintific Conference of Beekeeping with International Participation, 10–11. february, Faculty of Agriculture Belgrade, 167–172.
227. Muñoz I, Stevanovic J, Stanimirovic Z, De la Rúa, P ,2012, Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis, *Journal of Apicultural Science*, 56(1), 59-69.
228. National Research Council, 2006, Status of pollinators in North America, National Academic Press, Washington DC, USA.
229. Naug D, Gibbs A, 2009, Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*, *Apidologie*, 40(6), 595-599.
230. Neuendorf S, Hedtke K, Tangen G, Genersch E, 2004, Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen, *Microbiology*, 150(7), 2381-2390.
231. Neumann P i Blacquièrè T, 2017, The Darwin cure for apiculture? Natural selection and managed honeybee health, *Evolutionary Applications*, 10, 226–230.
232. Neumann P i Carreck NL, 2010, Honey bee colony losses, *Journal of Apicultural Research*, 49, 1–6.
233. Nikolic TV, Purac J, Orcic S, Kojic D, Vujanovic D, Stanimirovic Z, ... Blagojevic DP, 2015, Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee, *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 90, 181–194.
234. Nikolic-Kokic A, Blagojevic D, Spasic M, 2010, Complexity of free radical metabolism in human erythrocytes, *Journal of Medical Biochemistry*, 29, 189–195.

235. Nisar NA, Sultana M, Waiz HA, Para PA, Dar SA, 2013, Oxidative stress-threat to animal health and production, *International Journal of Livestock Research*, 3(2), 76-83.
236. Office International des Epizooties (OIE), 2008, *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*, <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008>.
237. Office International des Epizooties (OIE), 2013, *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*, <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2013>.
238. OIE (2016) World Organisation for Animal Health, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016*, Chapter 2.2.2., American Foulbrood of Honey Bees (Infection of Honey Bees with *Paenibacillus larvae*); Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf
239. OIE (2018) World Organisation for Animal Health, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018*, Chapter 3.2.4., Nosemosis of honey bees; Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf
240. Oldroyd BP, Goodman RD, Hornitzky MAZ, Chandler D, 1989, The effect on American foulbrood of standard oxytetracycline hydrochloride treatments for the control of European foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*), *Australian Journal of Agricultural Research*, 40(3), 691-697.
241. Olivier V, Blanchard P, Chaouch S, Lallemand P, Schurr F, Celle O, Ribière M, 2008, Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus, *Virus research*, 132(1), 59-68.
242. Orčić S, Tatjana N, Jelena P, Branko Š, Duško P B, Vukašinić E, Plavša N, Stevanović J, Kojić D, 2017, Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165, 120-128.
243. Palmer-Jones T, 1964, Diseases of honey bees in New Zealand, *New Zealand Entomology*, 3, 41-44.
244. Plavša N, Pavlović I, 2017, *Bolesti pčela*, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad.

245. Poppinga L, Genersch E, 2015, Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae, *Current Opinion in Insect Science*, 10, 29-36.
246. Potts SG, Roberts SP, Dean R, Marris G, Brown MA, Jones R, Settele J, 2010, Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe, *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 15-22.
247. Ptaszyńska AA, Borsuk G, Woźniakowski G, Gnat S, Małek W, 2014, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybees, *FEMS microbiology letters*, 357(1), 40-48.
248. Radakovic M, Stevanovic J, Djelic N, Lakic N, Knezevic-Vukcevic J, Vukovic-Gacic B, Stanimirovic Z, 2013, Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay, *Journal of Biosciences*, 38, 53-62.
249. Rana R, Rana BS, Kaushal N, Kumar D, Kaundal P, Rana K, Sharma HK, 2011, Identification of sacbrood virus disease in honeybee, *Apis mellifera* L. by using ELISA and RT-PCR techniques, *Indian Journal of Biotechnology*, 10(3), 274-284.
250. Rauch S, Ashiralieva A, Hedtke K, Genersch E, 2009, Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees, *Applied and environmental microbiology*, 75, 3344–3347.
251. Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, de Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, de Graaf DC, 2013, Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality, *PLoS ONE*, 8(8), e72443.
252. Ray S D, Lam TS, Rotollo JA, Phadke S, Patel C, Dontabhaktuni A, ... Bruculeri C, 2004, Oxidative stress is the master operator of drug and chemically-induced programmed and unprogrammed cell death: Implications of natural antioxidants in vivo, *Biofactors*, 21(1-4), 223-232.
253. Reybroeck W, Daeseleire E, De Brabander HF, Herman L, 2012, Antimicrobials in beekeeping, *Veterinary Microbiology*, 158(1-2), 1-11.
254. Ribiere M, Ball BV, Aubert M, 2008, Natural history and geographic distribution of honey bee viruses, in: Aubert M, Ball BV, Fries I, Moritz RFA, Milani N, Bernardinelli I, (Eds.), *Virology and the honey bee*, European Communities, Luxembourg, 15–84.

255. Ribiere M, Lallemand P, Iscache AL, Schurr F, Celle O, Blanchard P, Faucon JP, 2007, Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7711-7716.
256. Ribiere M, Triboulot C, Mathieu L, Aurieres C, Faucon JP, Pepin M, 2002, Molecular diagnostic of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 33, 339–351.
257. Richter J, Helbing S, Eler S, Lattorff HMG, 2012, Social context-dependent immune gene expression in bumblebees (*Bombus terrestris*), *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66, 791–796.
258. Rieg S, Bauer TM, Peyerl-Hoffmann G, Held J, Ritter W, Wagner D, ... Serr A, 2010, Paenibacillus larvae bacteremia in injection drug users, *Emerging infectious diseases*, 16(3), 487.
259. Rinderer TE, Rothenbuhler WC, 1976, Characteristic field symptoms comprising honeybee hairless-black syndrome induced in the laboratory by a virus, *Journal of Invertebrate Pathology*, 27, 215-219.
260. Roetschi A, Berthoud H, Kuhn R, Imdorf A, 2008, Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation, *Apidologie*, 39(3), 362-371.
261. Ruiz-González MX, Brown MJ, 2006, Honey bee and bumblebee trypanosomatids: specificity and potential for transmission, *Ecological Entomology*, 31(6), 616-622.
262. Runckel C, DeRisi J, Flenniken ML, 2014, A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellifica*, *PLoS ONE*, 9 (4), 95057.
263. Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL, 2011, Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*, *PloS ONE*, 6(6), e20656.
264. Ruottinen L, Berg P, Kantanen J, Kristensen TN, Praebel A, 2014, Status and conservation of the Nordic brown bee, Norway, The Nordic Genetic Resource Center (NOR).
265. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H, 2002, Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 177(1), 67-80.

266. Sánchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K, Desneux, N, 2016, Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review, *Environment International*, 89, 7-11.
267. Schirac, GA, 1769, *Histoire des Abeilles*, Chapter 3, 56.
268. Schmid-Hempel P, 1998, *Parasites in social insects*, Princeton University. Press, Princeton, NJ, 60.
269. Schuch DMT, Madden RH, Sattler A, 2001, An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey, *Journal of Apicultural Research*, 40(2), 59–64.
270. Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, de Graaf DC, Evans JD, 2015, Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), 567-583.
271. Schwarz RS, Evans JD, 2013, Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honeybees, *Developmental & Comparative Immunology*, 40 (3-4), 300-310.
272. Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D, 2005, Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite, *Journal of General Virology*, 86(8), 2281-2289.
273. Simeunovic P, Stevanovic J, Cirkovic D, Radojicic S, Lakic N, Stanisic Lj, Stanimirovic Z, 2014a, *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony, *Journal of Apicultural Research*, 53(5), 545-554.
274. Simeunovic P, Stevanovic J, Vidanovic D, Nisavic J, Radovic D, Stanisic L, Stanimirovic Z, 2014b, A survey of deformed wing virus and acute bee paralysis virus in honey bee colonies from Serbia using real-time RT-PCR, *Acta Veterinaria*, 64, 81–92.
275. Simeunović P, 2015, Molecular detection and identification of microsporidia and viruses in honey bee colonies in Serbia. Doctoral Dissertation, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, 1-145

276. Simone M, Evans JD, Spivak M, 2009, Resin collection and social immunity in honey bees, *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63(11), 3016-3022.
277. Simone-Finstrom M, Li-Byarlay H, Huang MH, Strand MK, Rueppell O, Tarpay DR, 2016, Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees, *Scientific Reports*, 6, 32023.
278. Skou JP, 1972, *Ascosphaerales*, *Friesia*, 10(1), 1–24.
279. Skou JP, 1988, More details in support of the class *Ascosphaeromycetes*, *Mycotaxson XXXI* (1), 191–198.
280. Službeni glasnik RS, br. 41/2009, 93/2012, 14/2016.
281. Službeni glasnik br. 110-00-13/2018-09 link: http://www.vet.minpolj.gov.rs/legislativa/pm_2018/Program%20mera%20za%202018.%20godinu.pdf
282. Sordillo, LM, Contreras GA, Aitken, SL, 2009, A review of current thinking regarding oxidative stress in periparturient dairy cattle, *Animal Health Research Reviews*, 10, 53-63.
283. Spiltoir CF, 1955a, Life cycle of *Ascosphaera apis*, *American Journal of Botany*, 42, 501–518.
284. Spiltoir CF, Olive LS, 1955, A reclassification of the genus *Pericystis* betts, *Mycologia*, 47, 238–244.
285. Spivak M, Reuter GS, 1998a, Honey bee hygienic behavior, *American Journal of Botany*, 138, 283– 286.
286. Spivak M, Reuter GS, 1998b, Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary, *Apidologie*, 29, 285–302.
287. Spivak M, Reuter GS, 2001, Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies, *Apis mellifera*, bred for hygienic behavior, *Apidologie*, 32, 555–565.
288. Stanimirovic Z, Glavinic U, Ristanic M, Aleksić A, Jovanović N, Vejnović B, Stevanović J, 2019, Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses, *Acta Veterinaria – Beograd*, 69, 1-31.
289. Stanimirovic Z, Glavinic U, Lacic N, Radovic D, Ristanic M, Taric E, Stevanovic J, 2017, Efficacy of plant-derived formulation “Argus Ras” in *Varroa destructor* control, *Acta Veterinaria*, 67, 191–200.

290. Stanimirovic Z, Stevanovic J, Andjelkovic M, 2005a, Chromosomal diversity in *Apis mellifera carnica* from Serbia, *Apidologie*, 36(1), 31-42.
291. Stanimirovic Z, Stevanovic J, Cirkovic D, 2005b, Behavioural defenses of the honey bee ecotype from Sjenica – Pester against *Varroa destructor*, *Acta Veterinaria*, 55(1), 69-82.
292. Stanimirovic Z, Pejovic D, Stevanovic J, Vucinic M, Mirilovic M, 2002, Investigations of hygienic behaviour and disease resistance in organic beekeeping of two honeybee ecogeographic varieties from Serbia, *Acta Veterinaria – Beograd*, 52, 169-180.
293. Stanimirović Z, Simeunović P, Stevanović J, Stanimirović M, 2013, Nozemoza i krečno leglo – klinička slika i saniranje inficiranih zajednica. Zbornik radova II Međunarodnog seminara pčelara DP „Matica“ Požega, 16. mart 2013, 21-63, Požega.
294. Stanimirović Z, Stevanović J, Bajić V, Radović I, 2007, Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests in vivo, *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628(1), 1-10.
295. Stanimirović Z, Stevanović J, Ćirković D, 2008, Preveniranje i kontrola američke kuge, nozemoze, varoze i nekih virusnih infekcija pčelinjih zajednica, Zbornik radova XXVI Savetovanja pčelara u Novom Sadu, pp. 27-60.
296. Statistički godišnjak, Republički zavod za statistiku, 2002.
297. Statistički godišnjak, Republički zavod za statistiku, 2018.
298. Statistički godišnjak, Republički zavod za statistiku, 2019.
299. Stevanovic J, Schwarz RS, Vejnovic B, Evans JD, Irwin RE, Glavinic U, Stanimirovic Z, 2016, Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees, *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 6-11.
300. Stevanovic J, Simeunovic P, Gajic B, Lakic N, Radovic D, Fries I, Stanimirovic Z, 2013, Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies, *Apidologie*, 44, 522-536.
301. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic RS, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N, 2011, Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder, *Apidologie*, 41, 49–58.

302. Stevanović J, Stanimirović Z, Radaković M, Stojić V, 2008, In vitro evaluation of the clastogenicity of fumagillin, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49(8), 594-601
303. Stevanovic J, 2007, Ekološko-etološki odbrambeni mehanizmi *Apis mellifera carnica* prema ektoparazitu *Varroa destructor* na području Srbije. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, str. 1-202.
304. Surai PF, 2015, Antioxidant Systems in Poultry Biology: Superoxide Dismutase, *Journal of Animal Research and Nutrition*, 1, 1–17.
305. Tapaszti Z, Forgách P, Kövágó C, Békési L, Bakonyi T, Rusvai M, 2009, First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies, *Acta Veterinaria Hungarica*, 57, 383–388.
306. Taric E, Glavinic U, Stevanovic J, Vejnovic B, Aleksic N, Dimitrijevic V, Stanimirovic Z, 2019, Occurrence of honey bee (*Apis mellifera* L.) pathogens in commercial and traditional hives, *Journal of Apicultural Research*, 58, 433-443.
307. Taric E, Glavinic U, Vejnovic B, Stanojkovic A, Aleksic N, Dimitrijevic V, Stanimirovic Z, 2020, Oxidative stress, endoparasite prevalence and social immunity in bee colonies kept traditionally vs. those kept for commercial purposes, *Insects*, 11(5), 266.
308. Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P, 1999, Peritrophic matrix proteins, *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(2), 87–101.
309. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N, 2003, Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(12), 2622-2636.
310. Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2004, Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7185-7191.
311. Tlak Gajger I, Kolodziejek J, Bakonyi T, Nowotny N, 2014, Prevalence and distribution patterns of seven different honeybee viruses in diseased colonies: A case study from Croatia, *Apidologie*, 45, 701–706.
312. Tlak Gajger I, Vugrek O, Grilec D, Petrinc Z, 2010, Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies, *Veterinarni Medicina*, 55(9), 457-462.

313. Traver BE i Fell RD, 2011, Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia, *Journal of Invertebrate Pathology*, 107, 43-49.
314. Tutkun E, Maden S, Inci A, Yilmaz B, 1993, General situation of chalkbrood disease in honeybees in Turkey, *Turkish Journal of Entomology*, 17(2), 65–68.
315. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic MM, Mazur M, 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
316. vanEngelsdorp D i Meixner MD, 2010, A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them, *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 80–95.
317. vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, ... Pettis JS, 2009, Colony collapse disorder: A descriptive study, *PLoS ONE*, 4(8), e6481.
318. Vejnovic B, Stevanovic J, Schwarz RS, Aleksic N, Mirilovic M, Jovanovic NM, Stanimirovic Z, 2018, Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 76-81.
319. Vejnović B, 2019, Molecular genetic identification of *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 trypanosome and the analysis of its impact on the health of bee colonies and economic effects in apiculture. Doctoral Dissertation. Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, str. 1-99.
320. Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, Alaoui HE, Belzunces LP, Delbac F, 2011, Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*, *PLoS ONE*, 6, e21550.
321. Visscher P, 1980, Adaptations of honey bees (*Apis mellifera*) to problems of nest hygiene, *Sociobiology*, 5, 249–260.
322. Wagner C, Isermann K, Fehrenbach H, Roeder T, 2008, Molecular architecture of the fruit fly's airway epithelial immune system, *BMC genomics*, 9(1), 446.
323. Waite RJ, Brown MA, Thompson HM, Bew MH, 2003, Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK, *Apidologie*, 34(6), 569-575.

324. Wang DI, Moeller FE, 1970, The division of labor and queen attendance behaviour of nosema-infected worker honey bees, *Journal of Economic Entomology*, 63, 1539–1541.
325. Wang Y, Oberley LW, Murhammer DW, 2001, Evidence of oxidative stress following the viral infection of two Lepidopteran insect cell lines, *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1448–1455.
326. Wang Y, Yang P, Cui F, Kang L, 2013, Altered immunity in crowded locust reduced fungal (*Metarhizium anisopliae*) pathogenesis, *PLoS Pathological*, 9, e1003102.
327. Weidner E, Byrd W, Scarborough A, Pleshinger J, Sibley D, 1984, Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle membrane into plasma membrane, *Journal of Protozoology*, 31, 195–198.
328. Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, Worley KC, Evans JD, Maleszka R, ... Elsik CG, 2006, Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*, *Nature*, 443(7114), 931-949.
329. White GF, 1906, The bacteria of the apiary with special reference to bee disease, USDA, Bureau of Entomology, Technical Series, 14, 1–50.
330. Wilkins S, Mike AB, Cuthbertson AGS, 2007, The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales, *Pest management science*, 63(11), 1062-1068.
331. Williams GR, Shafer AB, Rogers RE, Shutler D, Stewart DT, 2008, First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA, *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 189–192.
332. Williams MKF, Tripodi AD, Szalanski AL, 2019, Molecular survey for the honey bee (*Apis mellifera* L.) trypanosome parasites *Crithidia mellifica* and *Lotmaria passim*, *Journal of Apicultural Research*, 58, 553-558.
333. Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT, 2009, Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies, *Annual Review of Entomology*, 54, 405–423.
334. Wood M, 1998, Microbes help bees battle chalkbrood, *Agricultural Research*, 46(8), 16.
335. Woodrow AW, 1941, Behavior of honeybees toward brood infected with American foulbrood, *American Bee Journal*, 81, 363-366.

336. Yacobson BA, Elad D, Rosenthal K, Kmer I, Slovecky I, Efrat H, 1991, A recent chalkbrood outbreak in Israel: attempts at therapeutic intervention, *American Bee Journal*, 131, 786.
337. Yang B, Peng G, Li T, Kadowaki T, 2013, Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China, *Ecology and evolution*, 3(2), 298-311.
338. Yang X, Cox-Foster DL, 2005, Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 7470–7475.
339. Yourth CP, Brown MJF, Schmid-Hempel P, 2008, Effects of natal and novel *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae) infections on *Bombus terrestris* hosts, *Insectes Sociaux*, 55 (1), 86-90.
340. Yourth CP, Schmid-Hempel P, 2006, Serial passage of the parasite *Crithidia bombi* within a colony of its host, *Bombus terrestris*, reduces success in unrelated hosts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273(1587), 655-659.
341. Yu BP, 1994, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiological Reviews*, 74(1), 139–62.
342. Yue C, Genersch E, 2005, RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*), *Journal of General Virology*, 86, 3419–3424.
343. Yue C, Schröder M, Bienefeld K, Genersch E, 2006, Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones, *Jurnal Invertebrate Pathology*, 92, 93–96.
344. Yue D, Nordhoff M, Wieler LH, Genersch E, 2008, Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*), *Environmental microbiology*, 10(6), 1612-1620.

345. Zaghloul OA, Mourad AK, El MK, Nemat FM, Morsy ME, 2005, Assessment of losses in honey yield due to the chalkbrood disease, with reference to the determination of its economic injury levels in Egypt, *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 70(4), 703-714.
346. Zakon o stočarstvu. Službeni glasnik RS, 41/2009, 93/2012 i 14/2016.
347. Zander E, 1909, Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene, *Münchener Bienenzeitung*, 31, 196–204.
348. Zhao HW, Zhou D, Nizet V, Haddad GG, 2010, Experimental selection for *Drosophila* survival in extremely high O₂ environments, *PLoS ONE*, 5(7), e11701.
349. Žikić B, Aleksić N, Ristanić M, Glavinić U, Vejnović B, Krnjaić I, Stanimirović Z, 2020, Anti-varroa efficiency of coumaphos and its influence on oxidative stress and survival of honey bees, *Acta Veterinaria-Beograd*, 70(3), 355-373.

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Elmin Tarić je rođen 22. Januara 1989. Godine. Odrastao je i osnovnu školu i srednju završio u Sjenici. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beograu (FVM UB) je upisao 2008. Godine, a diplomirao 2014 godine sa prosečnom ocenom 9,44. Doktorske akademske studije na DVM UB je upisao 2015. godine. Položio je sve ispite predviđene planom i programom postdiplomskih studija sa prosečnom ocenom 9,50. Upisao je specijalističke studije 2018. godine i položio sve ispite predviđene planom i programom postdiplomskih studija sa prosečnom ocenom 9,71. Upisao je 2021. godine postdiplomske stidije – uza spicijalizacija iz oblasti Organska proizvodnja u stočarstvu. Tokom studiranja, Elmin Tarić bio je stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije (2008 – 2014); (2) Stipendista „Humantarne organizacije Stara Raška“ (2009-2013). Za vreme studiranja nagrađivan je od strane Fakulteta veterinarske medicine (2008-2014). U periodu od 2014-2015 godine obavljao je poslove veterinarske delatnosti u PVS „Sjenica“. Elmin Tarić je, 2014. godine prošao laboratorijsku obuku u Državnom veterinarskom institutu u Pragu, departman za higijenu hrane pod mentorstvom MV Dr Jan Kučera. Elmin Tarić je, 2016. godine položio državni ispit. U februaru 2015. Godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije: „Molekularno-genetička i ekofiziološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnji bezbedne hrane“, Ev. br. III46002, kojim rukovodi profesor dr Zoran Stanimirović. Od 2018. godine stekao zvanje istraživač saradnik.

10. PRILOZI DOKTORSKE DISERTACIJE

Prilog 1.

1. Anketa – Obrazac 1



Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine
Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Beograd



Obrazac 1.

KATEDRA ZA BIOLOGIJU

Datum i mesto
Anketa
Vaši podaci se neće koristiti u druge svrhe osim za potrebe naučno istraživačkog dela
1. Životna sredina:
a) Lokacija pčelinjaka – naziv mesta _____
- geografska širina: _____
- geografska dužina: _____
- nadmorska visina: _____
b) Ekosistem: _____
c) Pčelinjak je smešten:
1) u gradu 2) u selu 3) van naseljenog mesta
d) Da li postoji intezivna upotreba agropesticida u okolini pčelinjaka?
1. Da 2. Ne
2. Pčelinjak je:
a) stacioniran b) seleći c) stacioniran i seleći
paviljonski tip
kamion-prikolica
autobus

3. Koliko imate ukupno košnica?
a) 1-20 b) 21-50 c) >50
4. Kojim tipom pčelarenja se bavite?
a) Hobistički b) Poluprofesionalno c) Profesionalno
5. Koliko imate pčelinjaka _____; Koliko imate košnica po pčelinjaku? _____
6. Starost pčelara? a) < 30 god. b) 30-45 god. c) 46-65 god. d) >65 god.
7. Koliko imate iskustva u pčelarenju? _____
8. Šta sve proizvodite na Vašem pčelinjaku?
a) Med b) Polen c) Rojeve d) Matice e) Vosak f) Propolis g) Pergu h) Apitoksin



Obrasc 1.

9. Zdravstveno stanje društva:

a) Gubici društava u prethodnim godinama: 2013 ___%; 2014 ___%; 2015 ___%; 2016 ___%

b) Da li ste pčele iz uginulih društva slali na analize: Da, dijagnoza _____ Ne

c) Da li i koliko puta godišnje obavljate pregled košnica? _____

- Ko obavlja pregled? _____

- Da li imate pčelarski dnevnik i unosite li podatke u isti? Da Ne

- Da li uzorke pčela šaljete u laboratoriju na analizu i u koju? Da Ne

d) Da li koristite uobičajene veterinarske tretmane? Da Ne

10. Matice

a) Da li menjate matice?

1. Da 2. Ne 3. Ponekada

b) Koliko često menjate maticu?

1. jednom godišnje 2. svake druge godine 3. svake treće godine 4. Po potrebi

11. Ishrana pčela:

a) Tokom prihrane šta dajete društvima?

1. Sirup 2. Pogače 3. Suplemente 4. Sve navedeno

b) Pogače: 1. Kupujete 2. Sami pripremate

c) Sastav sirupa i procenat komponenti:

1. šećerno- medni šećer ___%; med ___%; voda ___%

2. šećerni šećer ___%; voda ___%

3. medni med ___%; voda ___%

d) Sastav pogače i procenat komponenti:

1. šećerno- medno testo šećer ___%; med ___%; voda ___%; polen ___%

2. šećerno testo šećer ___%; voda ___%; polen ___%

d) Sastav pogače i procenat komponenti:

1. šećerno- medno testo šećer ___%; med ___%; voda ___%; polen ___%

2. šećerno testo šećer ___%; voda ___%; polen ___%

e) U kojem vremenskom periodu obavljate prihranu društva?

f) Da li koristite suplemente?

1. Ne 2. Da, koje i kako _____

Anketu sproveo:

Prilog 2.

2. Zdravstveni list za pčelinje društvo - Obrazac 2



Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine
Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Beograd



Obrazac 2.

KATEDRA ZA BIOLOGIJU	
ZDRAVSTVENI LIST ZA PČELINJE DRUŠTVO	
Broj protokola _____	Datum i mesto pregleda _____
I PODACI O VLASNIKU	
Ime i prezime: _____	Kontakt tel: _____
Adresa: _____	
II PODACI O DRUŠTVU	
Br. pločice na košnici: _____	ID pčelinjaka: _____
ANAMNEZA:	
Glavni razlog dolaska:	
Prethodni problemi:	
Zazimljavanje:	



Obrasc 2.

Uobičajeni veterinarski tretmani:

- a) „Soft“ akaricidi: - Organske kiseline (Oksalna, Mravlja, Mlečna kiselina), Etarska ulja (Timol Api Life VAR®, Apiguard®, Thymovar®), Biljni ekstrakti (Argus Ras®, Nozevit®)
drugo: _____
- b) „Hard“ akaricidi: fluvalinat (Apistan®, Klartan®, Mavrik®), flumetrin (Bayvarol®, Bayticol 60%), kumafos (Perizin®, CheckMite+®, Asuntol®), amitraz (Apivar®, Taktik®, Amitraz®), cimiazol (Aptol®, Apichem®)
drugo: _____

Ishrana / prihrana pčela:

- a) Prirodna paša b) Sirup c) Pogača d) _____

Vrsta košnice/ način pčelarenja:

1. Pčelinjak je:
a) stacioniran b) seleći c) stacioniran i seleći
2. Koji tip košnica koristite?
a) DB b) LR c) AŽ d) _____

III Podaci o pčelinjaku

1. Položaj pčelinjaka u odnosu na saobraćajnice, fabrike, farme, voćnjake, poljop. gazd...

.....
.....

2. Raznovrsnost pčelinje paše

.....
.....
.....



Obrasc 2.

IV KLINIČKI PREGLED

Adspekcija spoljašnosti košnice

1. Aktivnost pčela na letu košnice	-	+	++	+++
2. Prisustvo uginulih pčela ispred košnice	-	+	++	+++
3. Stanje košnice (objekat)	-	+	++	+++
4. Prisustvo fekalnih mrlja	-	+		

Adspekcija unutrašnjosti košnice

1. Prisustvo fekalnih mrlja	-	+		
2. Prisustvo vlage	-	+		
3. Miris	svojestven	blago promenjen	izraženo promenjen	
4. Aktivnost pčela	-	+	++	+++
5. Površina saća pod medom	_____	cm ²	(880cm ² LR; 1130cm ² DB)*	
6. Površina saća pod pergom	_____	cm ²	(880cm ² LR; 1130cm ² DB)	

ADULTNE PČELE

1. Prisustvo matice	-	+		
2. Brojnost adultnih pčela	LR: (br. str. _____ x 880cm ²) x 1,25= _____			
	DB: (br. str. _____ x 1130cm ²) x 1,24= _____			
3. Zakržljala i deformisana krila	-	+		
4. Nadut abdomen	-	+		
5. Promena boje / nedostatak dlačica	-	+		
6. Prisustvo pčela koje puze ispred koš.	-	+		
7. Sakupljanje pčela u gomilice ispred koš.	-	+		
8. Odnos uginulih pčela raširenih				
8. Odnos uginulih pčela raširenih ekstremiteta i pčela u fetalnoj formi**	_____			



Obrasc 2.

PČELINJE LEGLO

- | | | | |
|------------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| 1. Površina zatvorenog legla | _____ cm ² | | |
| 2. Površina otvorenog legla | _____ cm ² | | |
| 3. Kvalitet legla | Tepih/Čebasto leglo | Prošarano leglo | |
| 4. Poldopčiči na leglu | normalni | deformisani perforirani | ulegnuti perforirani |
| 5. Ropiness test | - + | | |

Varroa destructor

- | | |
|------------------------------------|-----|
| 1. Prisutna na odraslim pčelama | - + |
| 2. Prisutnost u leglu | - + |
| 3. Prisutnost u otpadu na podnjači | - + |

V DIFERENCIJALNO DIJAGNOSTIČKI

- | | |
|---------|---------|
| 1. | 4. |
| 2. | 5. |
| 3. | 6. |

Pregled izvršio:

* Površina se odnosi na jednu stranu rama LR ili DB kolnice

** Uzorak od 300 pčela uzeti sa leta i zamrznutih

Prilog 3.

4. Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Elmin Tarić _____

Broj indeksa 2014/005 _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Komparativno ispitivanje prisustva uzročnika i bolesti pčelinjeg legla tradicionalno i savremeno gajenih pčelinjih društava uz analizu uticaja nekih bioloških i antropogenih faktora“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Prilog 4.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog
rada**

Ime i prezime autora Elmin Tarić

Broj indeksa 2014/005

Studijski program Докторске академске студије Факултета ветеринарске
медицине Универзитета у Београду

Naslov rada: „Komparativno ispitivanje prisustva uzročnika i bolesti pčelinjeg legla
tradicionalno i savremeno gajenih pčelinjih društava uz analizu uticaja nekih bioloških i
antropogenih faktora“

Mentor 1: Dr Jevrosima Stevanović, redovni profesor

Mentor 2: Dr Aleksandar Stanojković, viši naučni saradnik

Potpisani Elmin Tarić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja **u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 5.

5. Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Komparativno ispitivanje prisustva uzročnika i bolesti pčelinjeg legla tradicionalno i savremeno gajenih pčelinjih društava uz analizu uticaja nekih bioloških i antropogenih faktora“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerada
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____
