

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ
ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО–ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО–САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР «ІНСТИТУТ БДЖІЛЬНИЦТВА
ІМЕНІ П.І. ПРОКОПОВИЧА»**



**АМЕРИКАНСЬКИЙ ГНИЛЕЦЬ МЕДОНОСНИХ
БДЖІЛ (*Paenibacillus larvae*).
ВІДБІР ЗРАЗКІВ ТА ДІАГНОСТИКА**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Методичні рекомендації схвалено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (Протокол № 3 від «19» травня 2026 р.) та розглянуто Вченою радою ННЦ «Інститут бджільництва імені П.І. Прокоповича» (Протокол № 5 від «14» травня 2026 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою при Державній службі України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 24 від «15» липня 2026 р.).

Розробники: Піщанський О.В., Карпуленко М.С., Постоєнко В.О., Алексєєва Г.Б., Курята Н.В., Романько М.Є., Уховський В.В., Корнієнко Л.Є., Матвієнко О.В., Київська А.В., Куликова В.В., Лисюк О.М., Мусієць І.В., Кравцова О.Л., Ординська Д.О., Придюк О.В., Гордієнко О.І., Коваленко В. Л., Сторчак Ю. Г., Ігнатовська М.В.

Рецензенти:

Галка І. В. – кандидат ветеринарних наук, завідувач відділу – керівник Агентства ветеринарних імунобіологічних препаратів ДНДІЛДВСЕ;

Радзиховський М. Л. – доктор ветеринарних наук, професор кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин НУБіП України;

Тарасов О. А. – кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії зоонозних інфекцій та оцінки ризиків Інституту ветеринарної медицини НААН.

Американський гнилець медоносних бджіл (*Paenibacillus larvae*). Відбір зразків та діагностика: метод. рекомендації; Піщанський О.В., Карпуленко М.С., Постоєнко В.О., Алексєєва Г.Б., Курята Н.В., Романько М.Є., Уховський В.В., Корнієнко Л.Є., Матвієнко О.В., Київська А.В., Куликова В.В., Лисюк О.М., Мусієць І.В., Кравцова О.Л., Ординська Д.О., Гордієнко О.І., Придюк О.В., Коваленко В.Л., Сторчак Ю.Г., Ігнатовська М.В. ; Київ: ДНДІЛДВСЕ; 2026; 32 с.

Методичні рекомендації призначені для лікарів ветеринарної медицини, фахівців державних лабораторій Держпродспоживслужби, науково-дослідних установ та спеціалістів ветеринарної медицини.

У методичних рекомендаціях описано вимоги щодо відбору зразків та лабораторної діагностики американського гнильця медоносних бджіл збудником якого є бактерія *Paenibacillus larvae* відповідно до вимог Регламентів ЄС та рекомендацій WOAH (Всесвітня організація охорони здоров'я тварин).

© ДЕРЖПРОДСПОЖИВСЛУЖБА, 2026

© ДНДІЛДВСЕ, 2026

© ННЦ «ІНСТИТУТ БДЖІЛЬНИЦТВА
ІМЕНІ П. І. ПРОКОПОВИЧА», 2026

ЗМІСТ

	ВСТУП	4
1.	ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА КЛІНІЧНІ ОЗНАКИ	5
2.	ВІДБІР ЗРАЗКІВ ТА ПАКУВАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	8
3.	КУЛЬТУРАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НА АМЕРИКАНСЬКИЙ ГНИЛЕЦЬ	12
3.1	Підготовка зразків до дослідження	12
3.2	Виділення збудника	14
3.3	Ідентифікація виділених культур	15
3.4	Характер росту <i>P. larvae</i> на поживних середовищах	18
3.5	Оцінка біохімічних властивостей	19
4	ВСТАНОВЛЕННЯ ДІАГНОЗУ	23
5	БІОБЕЗПЕКА ПІД ЧАС РОБОТИ ЗІ ЗБУДНИКОМ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ	23
	ДОДАТОК 1	24
	ДОДАТОК 2	26
	ДОДАТОК 3	27
	ДОДАТОК 4	28
	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	29

ВСТУП

Американський гнилець (англ. *American foulbrood (AFB)*) – хвороба розплоду медоносних бджіл *Apis mellifera* та інших видів роду *Apis*, збудником якої є стійка спороутворювальна бактерія – *Paenibacillus larvae*. Спори бактерії можуть зберігатися упродовж багатьох років у лусочках (залишках ураженого мертвого розплоду), продуктах бджільництва та обладнанні.

Враховуючи клінічні особливості *AFB* та поширеність на п'яти континентах упродовж XIX ст. в літературних джерелах зустрічалися такі назви: у Швейцарії – «*nichtstinkende Faulbrut*», в Австрії та Австралії – «*Faulbrut*», в Німеччині, Англії та Ірландії – «*Brutpest*».

Збудник *P. larvae* має форму прямої або іноді вигнутої палички з округлими кінцями, розміри якої варіюють (ширина (0,5-0,8) мкм, довжина (1,5-6) мкм), в мазках розташований поодиноким чи у вигляді ланцюжків, генотипи ERIC I та ERIC II рухливі. Спори еліпсоїдні, розміром $0,6 \times 1,3$ мкм, розташовані центрально або субтермінально, можуть розширювати клітину, часто зустрічаються поза ними.

До 1993 року збудником хвороби вважали представника роду *Bacillus*, але згодом за низкою ознак рекласифікували та відокремили в окремий рід *Paenibacillus larvae*. Грампозитивна бактерія *P. larvae* є етіологічним агентом *AFB* медоносних бджіл – хвороби, що підлягає повідомленню в багатьох країнах. Збудник утворює спори, які є стійкими до зовнішнього середовища, а також до фізичних і хімічних факторів. У патологічному матеріалі, залишках висохлих личинок, луски, старому стільнику ендоспори залишаються інфекційними до 35 років, а ендоспори, що виділяються з воску, прополісу, меду та інших продуктів бджільництва, зберігають інфекційну здатність понад 70 років.

Спори *P. larvae* проявляють інфекційність лише до личинок робочих бджіл, натомість личинки трутнів і маток та дорослі бджоли не заражаються при проковтуванні спор. Личинки найбільш сприйнятливі до інфекції на ранніх стадіях, тобто через (12-36) год після виходу з яєць. Мінімальною інфекційною дозою вважається поглинання близько десяти спор через заражену личинкову їжу. На інфікованій личинці збудник може накопичуватись кількістю у понад 10^9 спор спор. У запечатаних комірках збудник проникає до гемолімфи личинки крізь стінку кишківника і упродовж двох діб розповсюджується по всьому тілу. Личинки гинуть, а збудник ще упродовж (10-12) год продовжує розмножуватися, через (7-10) діб відбувається спороутворення. У середині сім'ї збудник поширюється бджолами-годувальницями та бджолами-прибиральницями комірок. Факторами передачі є: мед, перга, стільники, вулики, вощина, віск, пасічний інвентар та обладнання.

Важливим є раннє виявлення *AFB* і запровадження відповідних заходів ліквідації, контролю та профілактики з метою запобігання подальшому поширенню хвороби.

1. ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА КЛІНІЧНІ ОЗНАКИ

AFB поширений у всьому світі, випадки були зареєстровані майже в усіх регіонах, де займаються утриманням та розведенням *Apis mellifera* чи інших видів бджіл.

У Південній Африці запідозрили наявність *AFB* після того, як у липні 1996 року влада Зімбабве отримала повідомлення про те, що бджолородини, які були завезені з Йоганнесбурга, можуть бути ураженими *P. larvae* (Beeline, 1996). Однак, після лабораторних досліджень 57 зразків меду з 57 пасік підтвердити наявність спор *P. larvae* не вдалось. Так було до 2009 року, доки Міністерство сільського господарства Південної Африки не провело інспекцію бджолородин та мережу з роздрібної торгівлі медом, у результаті було підтверджено наявність *AFB* у Західному Кейпі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (ВООЗТ), починаючи з 2005 року періодично реєструються спалахи *AFB* у Північній та Східній Африці. Низький рівень поширення американського гнильцю на території Африки та на південь від Сахари, ймовірно, пов'язано з примітивним бджільництвом та фізіологічною чутливістю африканських бджіл. Однак, у країнах з помірно-континентальним кліматом, де хвороба широко розповсюджена, ситуація дещо інша.

В останні роки ХХ століття на Європейському континенті *AFB* набув досить широкого поширення. Його реєстрували в 34 країнах. За даними *WOAH*, на території Західної Європи, кількість зареєстрованих спалахів значно змінювалась з року в рік. Найбільше зареєстрованих випадків спостерігали у 1998 р. – 211 та у 1999 р. – 383. У період 2010–2024рр. простежується позитивна тенденція до зниження кількості спалахів і, відповідно, станом на 2024 рік було зареєстровано лише 19 випадків. З метою ліквідації захворювання на території Австрії в період з 2010 по 2024 рр. було знищено 1181 бджолородину. Зокрема в Бельгії з 1997 по 1999 рік було зафіксовано лише 23 випадки серед приблизно 10000 бджологосподарств. Однак, після виявлення в 1999 році спор *P. larvae* у зразках меду від родини бджіл, які не мали клінічних ознак захворювання, низьку поширеність *AFB* в Бельгії було поставлено під сумнів. А за період 2010–2024 рр. було зареєстровано 101 новий спалах хвороби та знищено 301 бджолородину.

У Німеччині з 1950 по 2001 рр. кількість спалахів варіювала від 100 до 400 уражених пасік щороку. За даними Отена та інших упродовж 1980–2001 рр. найменша кількість спалахів була виявлена в Баден-Вюртемберзі, Баварії та Саксонії-Ангальті (0,2 уражених пасік на 1000 родин), тоді як, наприклад, у Північній Рейні-Вестфалії – 0,8 пасік на 1000 родин. У дослідженнях дійшли висновку, що щільність колоній незначно впливає на поширення хвороби, оскільки в землях Баден-Вюртемберг і Баварія була найвища щільність колоній (5,1 і 4,9 колоній на квадратний кілометр), але при цьому було зареєстровано найменшу кількість спалахів. З іншого боку, в Північній Рейн-Вестфалії з низькою щільністю колоній спостерігали набагато більше спалахів, в результаті чого припустили, що кліматичні умови, бджолині міграції та різні штами *Paenibacillus* можуть бути причиною цих регіональних відмінностей. У 2010–2024 рр. ситуація щодо спалахів *AFB* на території Німеччини зберігалась. Всього за цей період зареєстровано 2913 випадків. У Швейцарії в цей же період спостерігали всього 660 спалахів; з метою ліквідації хвороби було знищено 1424 бджолородини. Досить складна ситуація спостерігається і у Франції, де збудника виявляють щороку. На території Східної

Європи, зокрема в Болгарії, у 1989 році зареєстровано 350 спалахів, під час яких довелося знищити 4800 бджолиних родин. В 1992 році зареєстровано 271 спалах. При цьому було знищено 1910 сімей. Наступні 1993–2008 рр. характеризувалися значним зменшенням кількості спалахів – у межах 32–76, із збільшенням до 102 у 2013 році. З 2019 року ситуація стала контрольованою, збудник час від часу виявляють, але захворювання не носить масового характеру. У Молдові з 2010 по 2024 рік було зареєстровано 182 спалахи та знищено 49178 бджолородин. Натомість у Польщі за даний період було зареєстровано 142638 випадки (про кількість знищених родин не повідомляється), в Румунії – 225 спалахів, під час яких знищено 4025 бджолородин, у Словаччині – 958 спалахів та знищено 3054 бджолородини відповідно. Руденко Є.В. з колегами в 2023 році, досліджуючи 18 зразків товарного меду, отриманого на території України, виявили негативні тенденції загального мікробного забруднення, зокрема збудниками гнильців *P. larvae* та *P. alvei*. Складна ситуація щодо *AFB* простежується також на території південної (Боснія та Герцоговина, Греція, Італія, Північна Македонія, Португалія, Сербія, Словенія, Чорногорія) та північної Європи (Велика Британія, Данія, Естонія, Ірландія, Ісландія, Латвія, Норвегія, Фінляндія, Швеція).

Відповідно до сучасної класифікації *P. larvae* має п'ять генотипів ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus). Усі п'ять генотипів відрізняються за морфологією колоній і спор, метаболізмом джерела вуглецю, вірулентністю. Переважна більшість спалахів *AFB*, особливо в США, спричинені генотипом ERIC I. Він відзначається повільним перебігом, викликає 100 % загибель заражених личинок через 10–12 днів. Уражає личинок переважно після запечатування комірок (на стадії лялечки). Повільно росте на поживних середовищах. Генотип ERIC II обмежений Європою. Клінічна картина може бути виражена слабо через те, що личинки гинуть раніше і бджоли встигають очистити комірки. Має вищу летальність, ніж інші генотипи – загибель личинок спостерігається через 6–7 днів. Генотипи ERIC III і ERIC IV не реєструвались упродовж останнього часу. Нещодавно Hannes Beims з колегами описав генотип ERIC V, який був виділений із зразків іспанського меду.

Поширеність генотипів ERIC відрізняється в різних країнах і на континентах. Genersch та ін. у Німеччині, Фінляндії та Швеції встановили поширення лише генотипів ERIC I та II. На території Австрії та Італії також підтвердили наявність лише генотипів ERIC I і II. У дослідженні країн Південної та Північної Америки генотип ERIC I був виявлений серед аргентинських та уругвайських штамів.

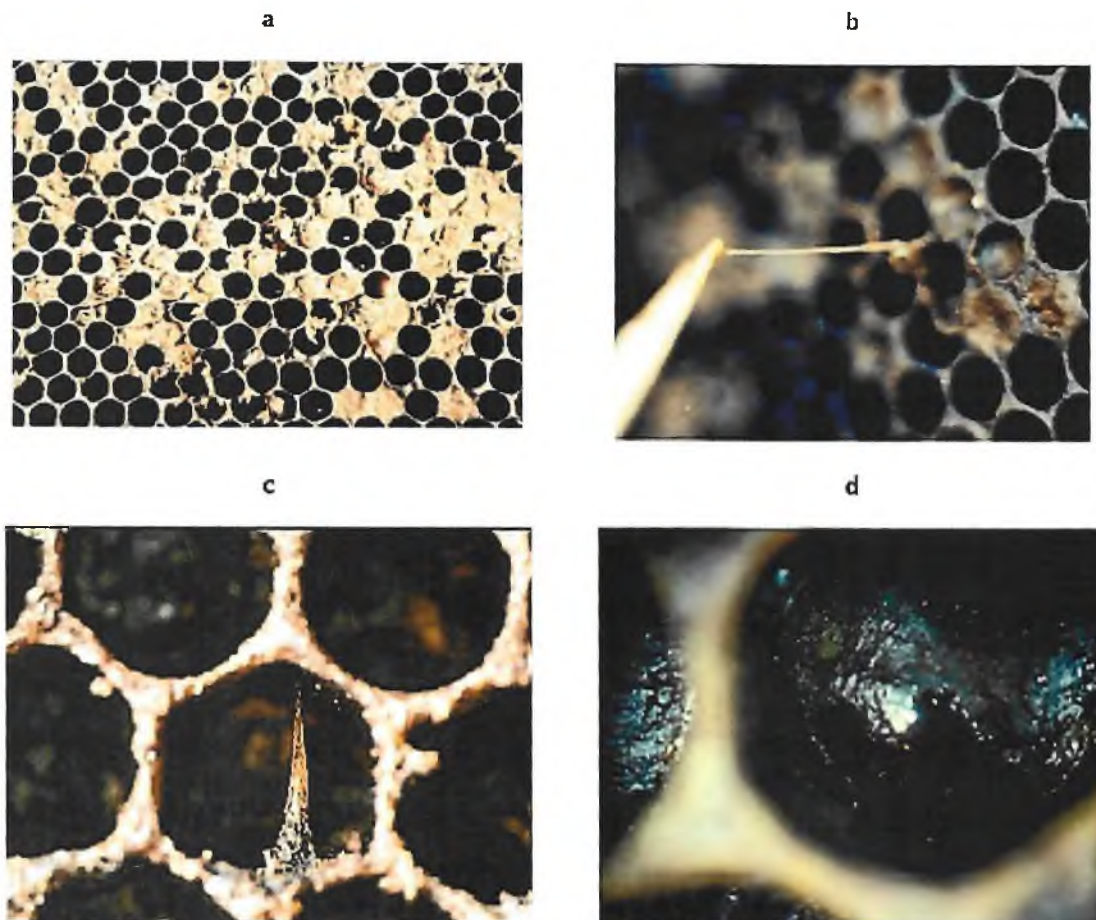


Рис. 1. Клінічні ознаки американського гнильцю: а) Стільники мають «строкатий» вигляд; б) За допомогою сірника можна витягнути коричневі, напіврідкі залишки личинок у вигляді тягучої нитки; с) Утворення «язичка» лялечки є дуже характерною ознакою, але спостерігається рідко; д) Залишки лусочки, що прилипли до дна комірки. (Фотографії а, б і д отримані від: А.М. Alippi; с) від: MAAREC–Mid Atlantic Apiculture and Extension Consortium)

Клінічні ознаки *AFB* дуже різноманітні й залежать від генотипу збудника, стадії захворювання та сили бджолоїної родини (а також, можливо, і її резистентності). Личинки можуть гинути швидко в ранньому віці, під час скручування на дні незапечатаних розплідних комірок. Інші личинки гинуть пізніше в процесі свого розвитку, перебуваючи у вертикальному положенні та заповнюючи більшу частину розплідної комірки. Личинки або лялечки можуть гинути після запечатування розплідної комірки. На початок захворювання спостерігається ураження окремих личинок. З часом кількість хворих і загинувших личинок збільшується. Виявлення нових випадків захворювання у пасіках відбувається, як правило, із запізненням, особливо якщо бджоляр ніколи не спостерігав дану хворобу. Ознаки захворювання виявляють під час огляду стільників із розплодом. Зазвичай хворіють дорослі бджолоїні личинки, вже запечатані восковими кришечками. Гинучи та піддаючись процесу розкладання, вони осідають ближче до дна в напрямку нижньої бічної стінки комірки, набуваючи в'язкої та тягучої консистенції, нагадуючи напіввисохлий гумовий клей. Характерною ознакою для них у цей період є тягучість і липкість. Колір

уражених личинок змінюється від сірувато-білого до кавово-молочного і темно-коричневого (Рис. 1).

Загиблі личинки мають запах перепаленого столярного клею. Воскові кришечки комірок із загиблими личинками просідають, темніють і перфоруються. Вдавлювання кришечок відбувається через прилипання голівок личинок, які, підсихаючи, втягують кришечки всередину комірок. Через 20–30 днів гнильна маса висихає і міцно прилипає до нижньої бічної стінки комірки. Кірочки важко видаляються пінцетом з комірки. Під час виймання кірочок відбувається руйнування стінок комірок. Бджоли не можуть очистити комірки з загиблими личинками і новий розплід виводять поруч із цими комірками. Тому розплід стає «строкатим», тобто розкиданим серед здорових личинок. Бджоли в хворій сім'ї стають млявими, із зниженою працездатністю і передчасно зношуються (Рис.2).

Кількість молодих бджіл різко зменшується або вони повністю зникають. Без надання допомоги сильно уражені бджолині сім'ї гинуть у середині або наприкінці літа. Частина хворих сімей гине взимку або ранньою весною внаслідок того, що вони йдуть на зимівлю з недостатньою кількістю бджіл. При слабкому зараженні хворі сім'ї можуть перезимувати, але хвороба в них вже починає проявлятися з ранньої весни. Ослаблені сім'ї легко піддаються нападу бджіл інших сімей.

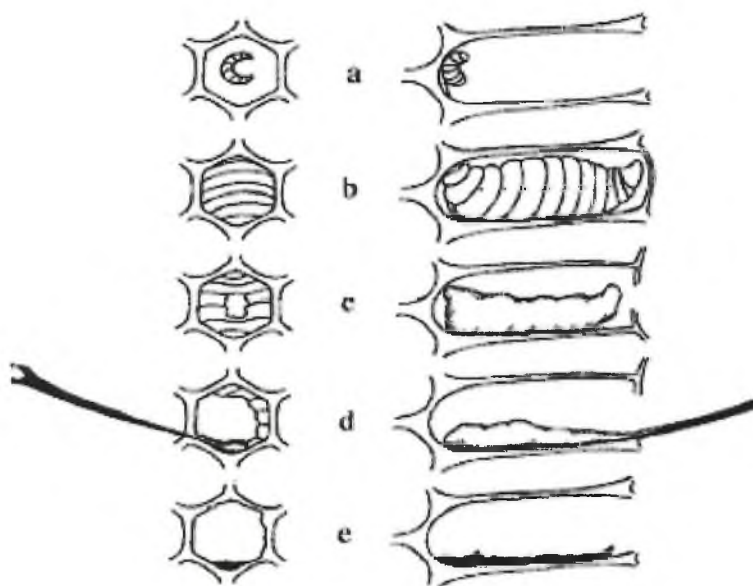


Рис. 2. Перебіг хвороби: (а) Момент зараження. (б) Розвиток личинки до стадії передлялечки. (с) Вміст комірки висихає, а кришечка втиснута всередину або перфорована. (d) Вміст комірки стає в'язким. (е) Залишки скоринок міцно прилипають до дна комірки

2. ВІДБІР ЗРАЗКІВ ТА ПАКУВАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Зразки для дослідження відбирають стерильними інструментами. Кожен зразок повинен відбиратися окремим інструментом.

З метою встановлення/підтвердження діагнозу або моніторингових досліджень на *AFB* в лабораторію надсилають:

- *зразки розплоду* – відбирають шляхом відрізання частини стільника розміром близько 20 см² (має містити не менше 10 личинок). Якщо ураження спостерігається на окремих ділянках стільника, то зразок відбирають таким чином, щоб він містив уражені і не уражені ділянки;

УВАГА! Зразок не має містити мед.

– *гнильна маса* – відбирають стерильною паличкою у пластикову одноразову пробірку (еппендорф) (Рис.3) або стерильним аплікатором (свабом) у транспортну пробірку;

– *кірочки від мертвих личинок* – відбирають за допомогою пінцета у одноразові пробірки;



Рис. 3. Відбирання гнильної маси

– *мазки-відбитки* – із комірки виймають личинку або її залишки (гнильну масу) та наносять на попередньо промарковане предметне скельце. Стерильною паличкою розминають личинку. Далі готують тонкий мазок, для цього паличку притискають до утвореної маси та виштовхують залишки личинки до немаркованого кінця предметного скельця, а потім видаляють їх з поверхні скла (Рис. 4).

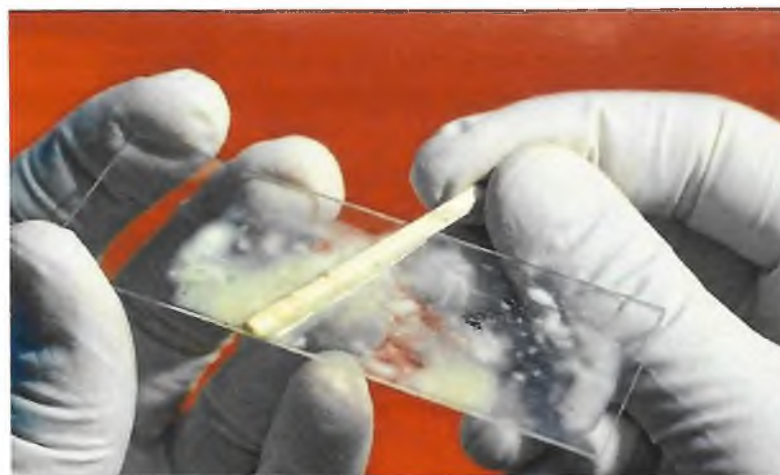


Рис. 4. Виготовлення мазка-відбитка

Мазок підсушують на повітрі, упаковують у стерильний контейнер/чашку Петрі відповідно до правила «потрійного пакування», маркують та відправляють в лабораторію для дослідження;

- змив із стільника – змоченим у стерильному фізіологічному розчині (дистильованій воді) аплікатором (свабом) протирають поверхню стільника, особливо там, де є уражені ділянки. Під час протирання тампон також занурюють у комірочки. Тампон закладають у транспортну пробірочку.

Для дослідження на американський гнилець в лабораторію також надсилають продукти харчування (мед, пилок, маточне молочко), дорослих робочих бджіл, сміття з дна вулика:

- зразки меду – для уникнення перехресного забруднення між зразками за допомогою окремих одноразових ложок відбирають з комірок, розташованих близько до підозрілого в ураженні розплоду збудником *P. larvae*. Для більш достовірних результатів зразок меду краще збирати з усіх вуликів на пасіці (з медогонки або відстійника, де змішується мед). Мінімальна кількість меду для виявлення життєздатних спор *P. larvae* становить 50 г. Мед має бути чистим (без домішок воску, бруду, частин тіла бджіл);

- дорослі робочі бджоли (не менше 100) – витрушують або знімають щіткою зі стільників розплідної частини гнізда. З метою консервації використовують 70% спирт або заморожування. Для дослідження придатні сухі бджоли;

- залишки воску (сміття) – збирають з дна вулика упродовж усього року.

Бджолині родини, що межують з підтвердженим випадком *AFB*, вважаються підозрілими та підлягають лабораторному дослідженню.

Зразки повинні бути чітко ідентифікованими за допомогою відповідних методів. Маркування повинне витримувати умови транспортування (вологість). Необхідно використовувати водостійкий маркер. На матеріал, який відправляється в лабораторію, заповнюють супровідний документ з урахуванням вимог чинного законодавства. Супровідну документацію переносять у пластиковий конверт (файл) ззовні контейнера для транспортування. Під час пакування використовується базовий принцип «потрійного пакування» біологічного зразка.

Пакування передбачає три рівні (шари) захисту:

- первинний – контейнер, що містить безпосередньо зразки;
- другий (вторинний) – міцне водонепроникне герметичне пакування, яке захищає і захищає первинний контейнер;
- зовнішнє пакування з достатньою кількістю амортизуючого матеріалу, куди переносять вторинне пакування (Рис. 5).

Матеріал на дослідження в лабораторію надсилають упродовж 24 год за температури $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Основними методами дослідження зразків на американський гнилець є культуральний і метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Вибір методу діагностики на американський гнилець залежить від мети дослідження (табл. 1), клінічного стану сім'ї, доступного бюджету та вимог до швидкості отримання результату.

Культуральний метод – дозволяє проводити виділення та ідентифікацію культур. Це традиційний метод, який може виконувати будь-яка лабораторія за

наявності відповідних середовищ та діагностичних тестів. Недоліком є тривалість дослідження.

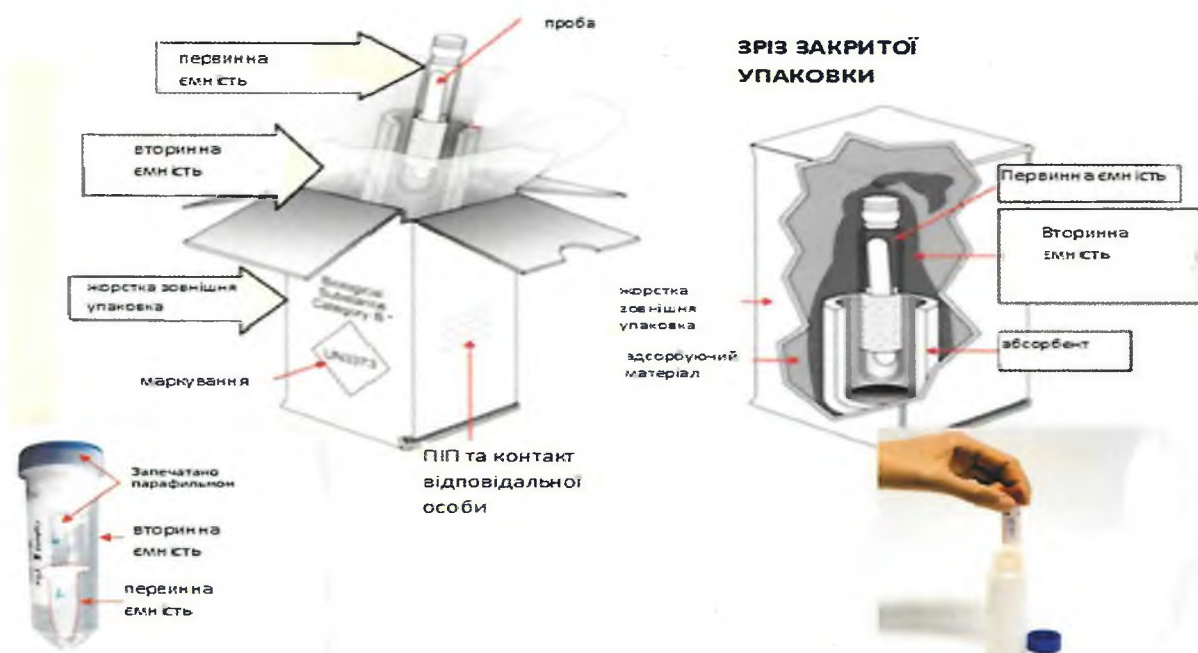


Рис. 5. Схема пакування матеріалу для проведення лабораторних досліджень

Полімеразна ланцюгова реакція – високочутливий метод, забезпечує швидке підтвердження, не вимагає етапу виділення культури. Основним недоліком є наявність складного обладнання.

Таблиця 1

Методи діагностики американського гнильця

Метод дослідження	Мета дослідження					Зразки для дослідження
	Дослідження популяції вільної від інфекції	Перед перевезенням	При ліквідації захворювання	За наявності клінічних ознак	Епіднагляд	
Культуральний	Використовується	Використовується	Використовується	Використовується	Використовується	Розплід, мед, дорослі бджоли, віск, сміття
Мікроскопічний	Малоефективний	Малоефективний	Малоефективний	Використовується	Використовується	Личинки
ПЛР	Використовується	Використовується	Використовується	Використовується	Використовується	Розплід, мед, дорослі бджоли

Мас-спектрометрія – найчастіше у формі MALDI-TOF MS або газової хроматографії GC-MS використовується для екстреної ідентифікації виділених культур, якщо необхідно визначити генотип.

Мікроскопічний метод – дозволяє виявляти спори збудника, використовується при вивченні морфологічних властивостей виділених культур, є допоміжним методом при культуральному дослідженні. Малоефективний за відсутності клінічних ознак.

3. КУЛЬТУРАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НА АМЕРИКАНСЬКИЙ ГНИЛЕЦЬ

Культуральний метод дослідження включає такі етапи: пробопідготовка, виділення культури (посів на поживні середовища), ідентифікація.

3.1. Підготовка зразків до дослідження.

Підготовка зразків до дослідження залежить від виду матеріалу, який надходить до лабораторії, включає:

- приготування суспензії;
- термічну обробку.

За даними Forsgren, 2008 р., різні генотипи *P. larvae* не однаково реагують на термічну обробку. Саме тому, виготовлену суспензію висівають на поживні середовища не прогрітою і прогрітою за двома температурними режимами (п. 3.1.1.4).

3.1.1 Підготовка зразків личинок.

3.1.1.1 Личинки (не менше 10), кірочки виймають із комірок, поміщають у стерильну ступку, заливають теплим (температура 35 - 40°C) фізіологічним розчином та розмочують упродовж 20-30 хв. В першу чергу відбирають хворих личинок (матові, пожовтівші, збільшені в розмірі).

3.1.1.2 Розмочені личинки/кірочки перетирають до утворення однорідної суспензії.

3.1.1.3 Суспензію висівають на поживні середовища, готують мазки, а далі її переносять у дві пробірки для прогрівання.

3.1.1.4 Першу пробірку прогривають за температури 80°C на протязі 10 хвилин, а другу – за температури 95°C на протязі 3 хвилин.

3.1.1.5 Вміст пробірок після прогрівання охолоджують та висівають на середовища.

3.1.1.6 Якщо кірочки важко видаляються, тоді фізіологічний розчин наливають безпосередньо у комірки для відмочування.

3.1.1.7 Гнильну масу перед посівом розводять/розмочують у фізіологічному розчині. Матеріал висівають до прогрівання та після прогрівання за двох температурних режимів (п. 3.1.1.4).

3.1.2 Підготовка до дослідження зразків дорослих бджіл.

3.1.2.1 Бджіл-годувальниць заливають фізіологічним розчином. Якщо бджоли консервовані у спирті, то його зливають і декілька разів промивають теплим фізіологічним розчином. Після відмивання від спирту, їх заливають 20 мл фізіологічного розчину і подрібнюють. Пробу гомогенізують упродовж 30 с.

Гомогенат фільтрують через фільтрувальний папір № 1, центрифугують, висівають на середовища.

3.1.3 Підготовка до дослідження змиву із стільника.

3.1.3.1 Зволожений тампон аплікатора висівають на поживні середовища шляхом занурювання у рідке середовище або штриховим методом на щільне. Якщо тампон сухий, то його попередньо змочують у стерильному фізіологічному розчині.

3.1.4 Підготовка до дослідження мазків-відбитків.

3.1.4.1 З мазків-відбитків, що надійшли до лабораторії проводять посів на середовища. Для цього, на предметне скло наносять декілька крапель стерильного фізіологічного розчину.

3.1.4.2 Тампон емульгують у краплі стерильного фізіологічного розчину, нанесеного на предметне скельце і проводять змив шляхом протирання поверхні предметного скельця (поверхні мазка). Змив висівають на поживні середовища. Процедура проводять обережно, таким чином, щоб не зняти весь мазок. Після відбору змиву, мазок підсушують, фіксують, досліджують мікроскопічним методом (п. 3.3.1).

3.1.5 Підготовка до дослідження сміття та бджолиного воску.

Існує декілька способів підготовки сміття/бджолиного воску до дослідження:

3.1.5.1 Матеріал розбавляють водою у співвідношенні 1:10 та прогрівають на водяній бані за температури 90°C 6 хв. Після охолодження додають органічний розчинник (хлороформ, толуол) у співвідношенні 1:9. Ретельно перемішують і відстоюють 2 хв. Після відстоювання утворюється осад, який висівають на поживні середовища.

3.1.5.2 Підготовка до дослідження сміття та бджолиного воску за використання Твін-80.

3.1.5.2.1 Перед початком дослідження Твін 80 переносять у стерильну пробірку і прогрівають на водяній бані за температури 70±2°C 30 хв.

3.1.5.2.2 Один грам сміття або воску вносять у пробірку з герметичною пробкою. Віск попередньо подрібнюють розміром до 3 мм. До матеріалу додають 8,5 см³ стерильної дистильованої води та 0,5 см³ Твіну 80, ретельно перемішують.

3.1.5.2.3 Отриману суспензію поміщають на водяну баню за температури 70±2°C, прогрівають 30 хв. Якщо віск розчиняється повільно, то прогрівання можна проводити до 1 год. В процесі прогрівання пробірку періодично струшують (інтервал 5-10 хв).

3.1.5.2.4 Пробірку виймають з водяної бані та відстоюють за кімнатної температури на протязі 2-4 год так, щоб на дні пробірки утворилась достатня кількість рідини.

3.1.5.2.5 Відбирають 2-5 см³ рідини, до якої додають таку саму кількість дистильованої води. Ретельно струшують у поздовжньому напрямку на протязі 5 хв.

3.1.5.2.6 Суміш прогрівають на водяній бані за температури 90±2°C 10 хв.

3.1.5.2.7 Охолоджують суспензію до кімнатної температури та струшують.

3.1.4.5.8 Висівають по 0,2 см³ на 3 – 5 чашок МҮРҖР агар та на кров'яний агар з налідиксовою кислотою. Інкубують за температури 37°C 5 – 8 днів.

3.1.6 Підготовка до дослідження зразків меду.

3.1.6.1 Проби меду для виявлення спор підігрівають на водяній бані до температури (45-50) °C і струшують. Пробу розводять фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1, переносять у центрифужні пробірки і центрифугують при 6000 об впродовж 40 хв. Надосадову рідину видаляють, залишаючи приблизно 3 см³ суспензії, перемішують впродовж 1 хв і додають органічний розчинник (п. 3.1.6.1) у співвідношенні 1:9. Ретельно перемішують, відстоюють 2 хв, висівають на поживні середовища.

3.2 Виділення збудника.

3.2.1 *P. larvae* погано росте на звичайних поживних середовищах. Для культивування були розроблені різні види середовищ. З метою виділення збудника, підготовлені до дослідження зразки (п. 3.1) висівають на щільні середовища рекомендовані WOAH Terrestrial Manual (Табл. 2). Для дослідження достатньо використовувати 1-2 види середовищ. Вибір середовищ залежить від мети дослідження.

Таблиця 2

Перелік середовищ для виділення *P. larvae* рекомендованих WOAH Terrestrial Manual та їх призначення

Скорочення	Повна назва	Призначення
<i>MYPGP</i>	Mueller–Hinton Yeast Extract Potassium Phosphate Glucose Pyruvate agar	Багате на поживні речовини поживне середовище, використовується для ізоляції та культивування <i>P. larvae</i> . Забезпечує високий відсоток виходу спор за даними Schuch et al., 2001. Готують в лабораторіях із окремих компонентів відповідно до стандартної рецептури
<i>PLA</i>	<i>Paenibacillus larvae</i> agar	Забезпечує високий відсоток проростання вегетативних клітин. Пригнічує більшість сторонніх мікроорганізмів. Культивування посівів на цьому середовищі можна проводити в аеробних умовах
<i>J-agar</i>	<i>J-agar</i>	Сприяє проростанню спор та вегетативних клітин, але є мало ефективним для дослідження меду. Зазвичай використовується в наукових дослідженнях
<i>CSA</i>	<i>Columbia sheep blood agar</i>	Використовують для виділення <i>P. larvae</i> , особливо із зразків меду, для визначення ступеня інфікованості пасік, шляхом підрахунку КУО. Для пригнічення сторонньої мікрофлори додають налідиксову кислоту 25 мг/л. Стимулює споруляцію, дозволяє виявляти джгутикові пучки при мікроскопії.
<i>BHIT</i>	Середовище з серцево-мозковим екстрактом, збагачене тіаміном).	Стимулює ріст вегетативних клітин, але стримує перехід у ендоспори. Підходить для підтримання музейних культур

3.2.3 Посіви інкубують за температури 37°C упродовж (3-5) днів у мікроаерофільних умовах (в атмосфері з вмістом (5-10) % CO₂).

3.2.4 У випадку відсутності комерційних середовищ, лабораторія може використовувати для виділення збудника вітчизняну методику, згідно якої: попередньо підготовлені зразки (п. 3.1) висівають на рідкі та тверді поживні середовища Томашеца або Уайта (Додаток 1).

3.2.5 Посіви культивують за температури (37-38) °C упродовж (24-72) год в умовах з 5–10% CO₂.

При появі росту на бульйоні, проводять пересів на тверді середовища Томашеца або Уайта. Посіви інкубують за температури (37-38) °C упродовж (24-72) год в умовах з (5-10) % CO₂.

3.2.6 За наявності росту на твердих середовищах, з підозрілих колоній виготовляють мазки (не менше 3 колоній), фарбують згідно п. 3.3.2, мікроскопують, проводять ідентифікацію підозрілих колоній.

3.3 Ідентифікація виділених культур.

Ідентифікація виділених культур проводиться шляхом комплексного аналізу морфологічних, культуральних і біохімічних властивостей.

3.3.1 Мікроскопія мазків.

3.3.1.1 Мазки-відбитки, що надійшли на дослідження та мазки, виготовлені в лабораторії, фарбують за методом Грама (Додаток 3) та одним із методів для виявлення спор (п. 3.3.2). При фарбуванні за Грамом *P. larvae* має вигляд грампозитивних паличок із закругленими кінцями, розташованих поодинокі та ланцюжками. Спори рожевого кольору, еліпсоїдної форми, зазвичай розташовані субтермінально, розміром близько 0,6 × 1,3 мкм (Рис. 6, 7а).

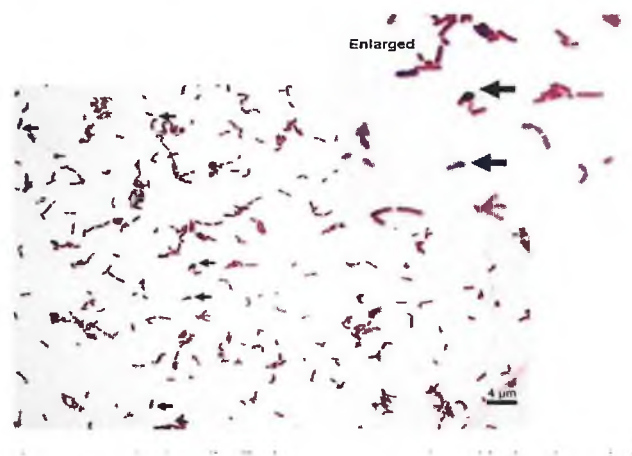


Рис. 6. Мазок *P. larvae* пофарбований за Грамом. Спори розташовані субтермінально (збільшення: ×1000)

3.3.2 Виявлення спор.

3.3.2.1 Характерною ознакою для спор *P. larvae* є Броунівський рух. З метою виявлення Броунівського руху, краплю бульйонної культури або змиву з агарового середовища наносять на предметне скло, краплю покривають покривним склом. Суспензію можна підфарбувати фуксином. Розглядають під малим збільшенням мікроскопа. Спостерігають Броунівський (хаотичний) рух спор (можна використовувати метод «висячої краплі»).

3.3.2.2 Не завжди при фарбуванні мазків за методом Грама, можна виявити спори. Для виявлення спор використовують спеціальні методи фарбування, які базуються на попередньому протравлюванні міцної оболонки спор при інтенсивному нагріванні, щоб барвник проник усередину. Вегетативні клітини фарбуються в інший колір контрастним барвником.

3.3.2.3 *Метод Пешкова.* На фіксований мазок наносять розчин метиленового синього за Льюфлером і підігрівують до появи пари, після чого промивають водою і додатково фарбують 0,5% водним розчином нейтрального червоного упродовж 30 с, препарат промивають водою, висушують і мікроскопують. Спор фарбуються в синій колір, молоді спори – у темно-синій, а вегетативні форми – у рожевий.

3.3.2.4 *Метод Меллера.* Мазок фіксують абсолютним метанолом (або етанолом) і на (2-3) хв наносять 5% розчин хромової кислоти, промивають водою, висушують, накривають смужкою фільтрувального паперу і наносять фуксин Ціля на (5-7) хв, підігрівують до появи пари. Папір знімають, мазок знебарвлюють упродовж (5-7) сек 5% водним розчином сірчаної кислоти, промивають водою і дофарбовують 2–3 хв метиленовим синім за Льюфлером. Ретельно промивають водою, висушують і мікроскопують. Спор фарбуються у червоний колір, а вегетативні клітини – в синій.

3.3.2.5 *Метод Златогорова.* Відрізняється від попереднього тим, що препарат не обробляють розчином хромової кислоти. Спор фарбуються у червоний колір, а вегетативні клітини – в синій.

3.3.2.6 *Фарбування малахітовим зеленим.* На фіксований препарат наносять 5% розчин малахітового зеленого на 45 хв та фарбують за кімнатної температури (18-25) °С. Час фарбування можна зменшити, якщо застосувати нагрівання до випаровування, залишають препарат за кімнатної температури на 3 хв. Промивають. Наносять 2% розчин сафраніну на 1 хв. Знову промивають водою. Спор збудника світлі зелено-сині.

3.3.2.7 Окрім перерахованих методів фарбування спор, відповідно до рекомендацій *Manual* можна використовувати:

– *Фарбування карболфуксином.* Використовують метод гарячого фарбування. Спор розміром (0,6-1,3) мкм, еліпсоїдної форми з товстим обідком. Мають червоно-фіолетовий колір, центр прозорий.

– *Метод Шеффера–Фултона.* Спочатку фарбують малахітовим зеленим з прогріванням упродовж (3-6) хв, а потім підфарбовують сафраніном упродовж 30 сек. Спор забарвлюються в зелений колір, мають еліпсоїдну форму (Рис.7b).

– *Фарбування Нігрозіном.* На предметне скло наносять краплю 5% розчину нігрозіну і змішують з дослідною колонією (одна бактеріологічна петля). Ребрами іншого предметного скельця розтягують краплю по поверхні скла, утворюючи широкий, тонкий мазок. Мазок підсушують на повітрі, продивляються під мікроскопом. Спор *P. larvae* пурпурно-червоні, вегетативні форми сіруваті.

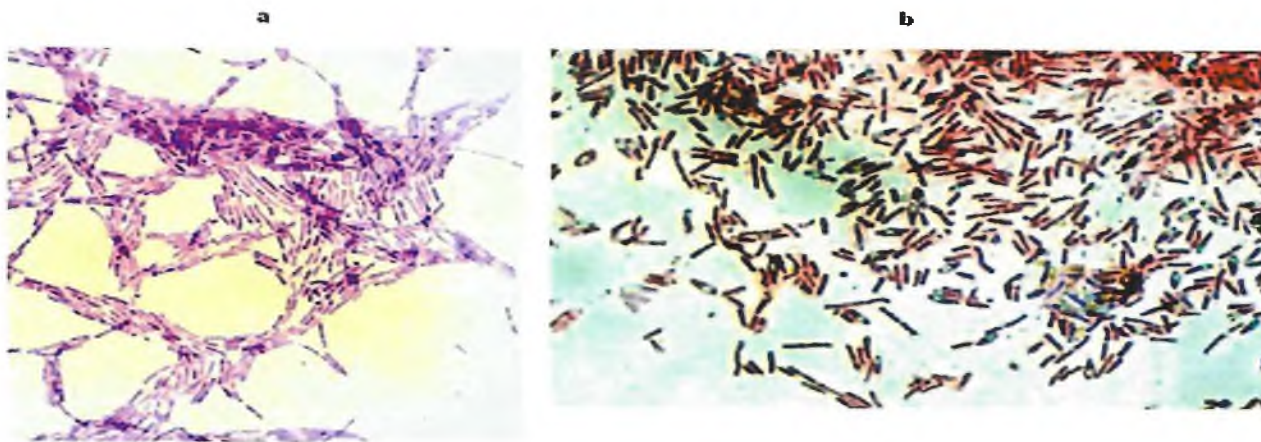


Рис. 7. а) мазок пофарбований за Грамом – грампозитивні палички, розташовані поодинокі та ланцюжками (збільшення: $\times 1000$); б) мазок забарвлений методом Schaeffer–Fulton – палички забарвлені в червоний колір, набухають під дією спор. Спори забарвлені у зелений колір, розташовані центрально, термінально та субтермінально (збільшення: $\times 1000$, фотографії: А.М. Alipri).

При дослідженні молодого розплоду (віком менше 10 днів) в мазках з личинок спостерігають вегетативні палички, для яких характерною особливістю є коагуляція (склеювання) між собою джгутиків, яка відбувається перед споруляцією. Джгутики формуються у джгутикові пучки. Пучки можна роздивитися під світловим мікроскопом.

Для того щоб побачити пучки, застосовують спеціальні методи протравлювання (наприклад, мазок обробляють таніном), після чого інтенсивно зафарбовують водним або карболовим фуксином. Пучки джгутиків стають товстішими за рахунок осідання барвника та набувають інтенсивного червоного кольору, що є стовідсотковим маркером американського гнилицю.

За допомогою світлового мікроскопа можна також роздивитися поверхню ендоспор. Генотипи ERIC I і II мають гладку поверхню, а генотипи ERIC III–V мають поздовжні перетинки.

3.4 Характер росту *P. larvae* на поживних середовищах.

3.4.1 На сироватковому бульйоні вже через добу збудник утворює помутніння, через (48-72) год середовище просвітлюється, з'являється осад подібний до вати, при струшуванні осад легко розбивається, утворюючи рівномірне помутніння.

3.4.2 Початковий ріст на щільних середовищах з'являється через 48 год, але остаточний розвиток спостерігається на (4-5)-ту добу. Характер росту залежить від генотипу *P. larvae*. Генотип ERIC I (Рис. 8а, 9а) утворює пласкі, гранульовані, сірі або білі, шорсткі колонії, з нерівними краями, мають розгалуження, які можна роздивитися під малим збільшенням мікроскопу. Генотипи ERIC II і ERIC III утворюють пігмент (Табл. 1). Більшість представників Генотипу ERIC II утворюють концентричні кола. Зовнішні кола завжди коричневі, а внутрішні – білі (Рис. 8) (за даними А.М. Alipri). Генотип ERIC IV є варіабельним щодо утворення

пігменту. Колонії чітко виражені, мають гладку поверхню, забарвлюються у коричневий або помаранчевий колір (Рис. 9, 10).

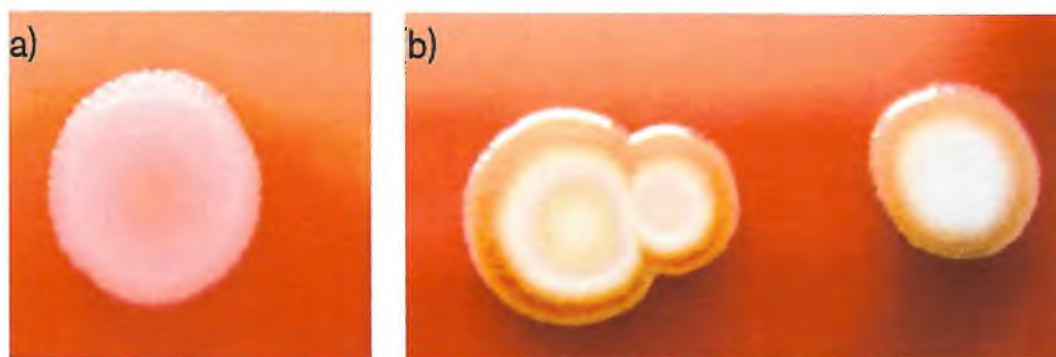


Рис. 8. Морфологія колоній *P. larvae*. Колонії *P. larvae* Генотипу ERIC I а) білі, гранульовані. Колонії *P. larvae* Генотипу ERIC II – наявність оранжево-коричневого кола по краю колоній. Вік колоній – 6 діб б). Фотографії Sandra Neuendorf et al.).

3.4.3 На *MYPGP agar* – представники генотипу ERIC I утворюють колонії невеликі, правильної форми, здебільшого з шорсткою поверхнею, плоскі або опуклі, білувато-бежевого або сірого кольору (Рис. 9а), Генотип ERIC II утворює помаранчеві колонії.

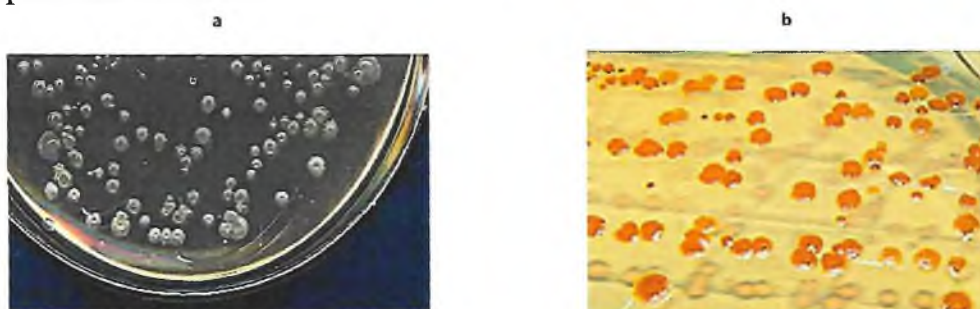


Рис. 9. Колонії *P. larvae*, вирощені на агарі MYPGP а) Еталонний штам ATCC 9545T (ERIC I) та б) Штам PL SAG m290 (ERIC II) (Фотографії: А.М. Alippi)

3.4.4 *Agar P. larvae* (PLA) – колонії *P. larvae* невеликі, від світло-зеленого до жовтого кольору (кольору середовища), мають матову, шорстку поверхню, центр колонії може бути опуклим.

3.4.5 *Columbia sheep blood agar (CSA)* – генотип ERIC I – не дає гемолізу, колонії сірого кольору (Рис. 10а), генотип ERIC II також не дає гемолізу, колонії помаранчеві. Генотип ERIC III утворює колонії помаранчевого кольору та β -гемоліз. Генотип ERIC IV утворює слабкий β -гемоліз, колонії сірого кольору.

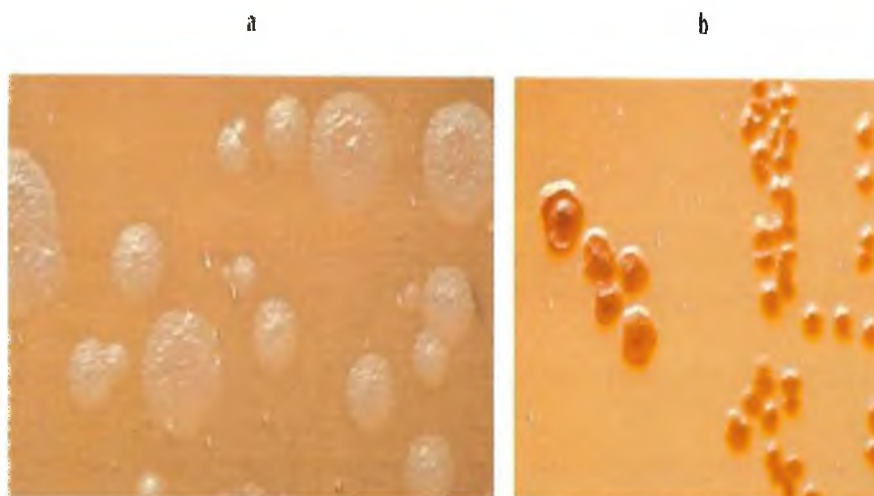


Рис. 10. Ріст *P. larvae* на колумбійському агарі: а) еталонний штам ATCC 9545T (ERIC I); б) штам PL SAG m290 (ERIC II) (Фотографії: А.М. Alippi).

3.4.6 На *J-agar* – не пігментовані колонії діаметром 2-3 мм, круглі, маслянисті, сірі. За даними Yuko Hirai, при культивуванні *P. larvae* на *J-agar*, не пігментовані колонії (ERIC I) в мазках пофарбованих за Грамом мали вигляд довгих паличок, розташованих ланцюжками; а в мазках виготовлених з пігментованих колоній (ERIC II) спостерігали короткі палички.

3.5 Оцінка біохімічних властивостей.

Біохімічні властивості *P. larvae* залежать від генотипу. Основні біохімічні відмінності генотипів *P. larvae* надані в Табл. 3.

3.5.1 *Проба на каталазу*. Краплю 3% перекису водню наносять на предметне скло, бактеріологічною петлею відбирають культуру з агаризованого середовища та вносять її у краплю 3% перекису водню і перемішують. Аеробні бактерії розкладають перекис на воду та кисень, при цьому утворюють піну (пухирці).

Реакція на каталазу дає можливість відрізнити генотипи ERIC I і ERIC II (дають негативну реакцію на каталазу) від генотипів ERIC III та ERIC IV (дають позитивну реакцію, але вона слабо виражена, уповільнена).

3.5.2 *Гідроліз казеїну*. Визначають гідроліз шляхом висіву підозрілих колоній на молочний агар з тіаміном. Посіви витримують 5 днів за температури 36 ± 1 C°. Бактерії, що виробляють казеїназу, здатні гідролізувати казеїн, тому навколо колоній утворюється прозора зона.

Всі генотипи *P. larvae* гідролізують казеїн, але уповільнено, на 3-5 день.

3.5.3 *Визначення лужної фосфатази*. Культуру вирощують на диференційно-діагностичному середовищі, яке містить 0,01% фенолфталеїнфосфату натрію, інкубують, перед переглядом обробляють парами аміаку. Для цього в кришку чашки Петрі поміщають фільтрувальний папір і наливають (1-2) см³ 25% розчину аміаку. Чашку з посівом перевертають дном догори та на декілька секунд ставлять у кришку з аміаком.

Колонії спороутворюючих сапрофітів набувають рожевого або червоного кольору. Для *P. larvae* реакція варіабельна, залежно від генотипу.

3.5.4 *Визначення кислої фосфатази*. Для визначення кислої фосфатази використовують хромогенний субстрат BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl

phosphate), який додають до ацетатного буферу з рН ~5–6 для кислої фосфатази та вносять дослідну культуру, інкубують за температури 37 °С 60 хв. Поява синього або синьо-фіолетового забарвлення, утворення локального нерозчинного осаду свідчить про позитивну реакцію. Негативна реакція – відсутність забарвлення. Для *P. larvae* реакція варіабельна, залежно від фенотипу.

Ферментація вуглеводів. Біохімічні властивості вивчають шляхом висіву дослідної культури на середовища з вуглеводами. Під час вивчення біохімічних властивостей до приготовлених стерильних середовищ з вуглеводами і багатоатомними спиртами додають 10% стерильної інактивованої нормальної сироватки крові коня. Посіви інкубують впродовж 10 діб за температури 36±1 °С.

Основним маркером, який відрізняє генотип ERIC I від ERIC II є фруктоза. ERIC I не ферментує фруктозу, а ERIC II – ферментує. Саліцин є маркером, який відрізняє ERIC III (ферментує) від ERIC IV (не ферментує). За манітом можна відрізнити генотипи ERIC I та ERIC II (не ферментують) від ERIC III та ERIC IV (ферментують)

Гемолітична активність. Визначають шляхом висіву дослідної культури на кров'яний агар. Посіви інкубують за температури (37-38) °С упродовж (24-72) год в умовах з (5-10) % CO₂.

Гемолітичні властивості залежать від генотипу збудника (Табл. 3). Генотип ERIC I і ERIC II під час росту не утворюють гемоліз, генотип ERIC III – утворює β-гемоліз, ERIC IV є варіабільним.

Повторне субкультивування у поживному бульйоні. Субкультивування (пасажування) у поживному бульйоні є фенотиповою ознакою. Здатність адаптуватися до росту у звичайному поживному бульйоні та підтримувати життєздатність вегетативних клітин під час повторних пересівів безпосередньо залежить від ERIC-типу.

Після першого або другого пересіву у звичайний бульйон, ріст представників генотипу ERIC I повністю припиняється. Вони втрачають здатність до поділу та не утворюють спори у таких умовах. Інші генотипи при повторних пересівах у звичайний поживний бульйон, дають стабільний ріст.

Визначення гідролізу тиразину. Для тесту використовують поживний агар (наприклад, MYPG-агар або м'ясо-пептонний агар з додаванням сироватки) до яких додають 0,5% або 1% L-тирозин. Посіви інкубують 10 днів або до появи видимого росту за температури за температури (37-38) °С. Позитивна реакція – наявність прозорої зони навколо колоній. *P. larvae* гідролізує казеїн повільно, на протязі (3-5) діб.

Ідентифікацію виділених культур можна проводити за використання комерційних наборів для біохімічної ідентифікації або приладів для ідентифікації (імуноаналізатор VITEK Compact 2 та ін.).

Під час проведення ідентифікації американський гнилець важливо диференціювати від вторинних патогенів європейського гнильця, а саме від спорових представників, таких як: *P. alvei*, *B. laterosporus*. Вони самі не здатні викликати захворювання, а проникають в організм личинок після первинного проникнення основного збудника – *M. plutonius* та спотворюють клінічну картину. Основні диференційні ознаки *P. larvae* надані в Табл. 4.

Таблиця 3

Генотип-специфічні відмінності *P. larvae*

Характеристика	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
Морфологія колоній	Пласкі, сіруваті, шорсткі	Чітко виражені з гладкою поверхнею	Чітко виражені, шорсткі	пласкі, сіруваті, шорсткі
Утворення пігменту	Не утворює	Коричневий або помаранчевий. Можуть утворювати концентричні кола. Зовнішні кола завжди коричневі, а внутрішні білі	Помаранчевий	Не утворює
Поверхня спор (за даними SEM) (виявляються при електронній мікроскопії)	Гладка	Звивиста	З гребенями (наявність поздовжніх перетинок)	З гребенями (наявність поздовжніх перетинок)
Повторне субкультивування в поживному бульйоні*	Не росте	Утворює ріст	Утворює ріст	Утворює ріст
Ферментація маніту	Не ферментує	Не ферментує	Ферментує	Ферментує
Ферментація саліцину	Не ферментує	Не ферментує	Ферментує	Не ферментує
Ферментація фруктози	Не ферментує	Ферментує	Ферментує	Не ферментує
Лужна фосфатаза	Позитивна	Негативна	Позитивна	Позитивна
Кисла фосфатаза	Позитивна	Негативна	Позитивна	Позитивна
Каталаза	Негативна	Негативна	Слабка, уповільнена реакція	Слабка, уповільнена реакція
Гемоліз/Ріст на кров'яному агарі	Не утворює/Сірі колонії	Не утворює/Помаранчеві колонії	β-гемоліз/Помаранчеві колонії	Слабкий β-гемоліз/Колонії сірі
Прояв клінічних ознак хвороби	Виражені	Виражені	Стерті	Стерті
Вірулентність	Викликає загибель личинок через 7-13 днів	Викликає загибель личинок через 5-7 днів	Викликає загибель личинок через 5-7 днів	Викликає загибель личинок через 5-7 днів
Значення для клінічної патології	Виділяється часто	Виділяється часто	Останні роки не виділяється	Останні роки не виділяється

Таблиця 4

Основні диференційні ознаки *P. larvae*

Діагностичні тести	<i>P. larvae</i>	<i>P. alvei</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>B. laterosporus</i>
Спори	Менші за розміром: 0,5-0,7 x 1,3 – 1,5 мкм, еліпсоїдні. Зазвичай розташовані субтермінально. Для спор притаманний Броунівський рух. Слабо забарвлюються фуксином.	Спори розміром 0,8-1,0 x 1,5-2,0 мкм. розташовані центрально або субтермінально. Інтенсивніше забарвлюються фуксином. При вегетативному дозріванні в мазках розташовані паралельними рядами, а материнська клітина сильно роздувається перед виходом спори	Спори великі, 1,0-1,5x1,5-2,5 мкм, овальні, еліпсоїдні, розташовані субтермінально або термінально. Клітина може набувати вигляд веретена або барабанної палички	Має пароспоральне тіло подібне до каное, спора розташована латерально
Рухливість	Не рухливий	Рухливий	Рухливий	Слабо виражена або відсутня
Швидкість росту	Повільно, до 3-4 діб	Швидко, через 24 год, Притаманне роїння	Повний ріст з'являється через 48-72 год	Через 24-48 год
Морфологія колоній	Пласкі, сіруваті, шорсткі або чітко виражені з гладкою поверхнею, наявність помаранчевого пігменту	Тонка, рухлива плівка	Колонії великі, округлі або амебоподібної форми, краї не рівні. Колонії швидко розростаються, можуть зливатися	Шорстка, матова
Каталаза	Негативна	Позитивна	Позитивна	Позитивна
Індол	Негативна	Позитивна	Негативна	Негативна
Ферментація глюкози	Кислота – позитивна. Газ – не утворює	Негативно	Кислота – позитивна. Газ - утворює	Кислота – позитивна. Газ – не утворює
Реакція Фогеса-Проскауера	Негативна	Позитивна	Негативна	Негативна
Гідроліз тирозину	Гідролізує	Не гідролізує	Не гідролізує	Не гідролізує
Маніт	Негативна	Негативна	Кислота – позитивна. Газ – утворює	Кислота – позитивна. Газ – не утворює
Гідроліз казеїну	Гідролізує повільно 3-5 діб	Гідролізує	Гідролізує	Гідролізує
Значення для клінічної патології	Збудник американського гнильця	Вторинний збудник при європейському гнильці	Умовно-патогенна мікрофлора	Вторинний збудник при європейському гнильці

4. ВСТАНОВЛЕННЯ ДІАГНОЗУ

За наявності характерних клінічних ознак (хворіє розплід після запечатування; гнильна маса – кавового кольору, тягуча, нитки тягнуться до 2,5 см; воскові кришечки – шоколадно-коричневі, перфоровані; колір личинки – від коричневого до чорного, крихкі) діагноз вважається встановленим якщо:

- отримано позитивні результати бакпосіву: виділено чисту культуру, яку ідентифіковано за основними біохімічними маркерами: каталаза – негативна, тирозин – позитивна, кезеїн – позитивна або за результатами MALDI-TOF. В первинних мазках-відбитках виявлено характерні за морфологією спори *Paenibacillus larvae* (розміром 0,5-0,7 x 1,3 – 1,5 мкм, еліпсоїдні, розташовані субтермінально);

- в первинних мазках-відбитках не виявлено характерних за морфологією спор *Paenibacillus larvae*, але отримано позитивні результати бакпосіву: виділено чисту культуру, яку ідентифіковано за основними біохімічними маркерами: каталаза - негативна, тирозин - позитивна, кезеїн - позитивна або за результатами MALDI-TOF.

За відсутності клінічних ознак (прихована форма), при проведенні планового моніторингу або перевірки меду перед експортом – діагноз вважається встановленим лише за умови: позитивного результату ПЛР-дослідження або бакпосіву.

5. БІОБЕЗПЕКА ПІД ЧАС РОБОТИ ЗІ ЗБУДНИКОМ В ЛАБОРАТОНИХ УМОВАХ

P. larvae є патогеном, що підлягає офіційному контролю через економічне значення, тому при роботі із збудником важливим є запобігання забрудненню довкілля та випадковому поширенню збудника серед бджолиних сімей.

Робота з *P. larvae* вимагає дотримання заходів безпеки відповідних рівню біологічної безпеки 1 (BSL-1), у разі роботи з концентрованими спорами - рівень біологічної безпеки 2 (BSL-2). Під час роботи слід уникати утворення пилу або аерозолів. Для дезінфекції слід використовувати деззасоби, які володіють спороцидною активністю. У разі розливу, ділянку накривають паперовим рушником і змочують дезінфекційним засобом. Експозицію проводять згідно інструкції виробника на деззасіб. Після експозиції за допомогою пінцета прибирають паперовий рушник та бите скло у контейнер для відходів. Забруднену поверхню дезінфікують повторно.

Приготування середовищ

MYPGP agar: бульйон Мюллера–Хінтона – 10 г, м'ясний екстракт – 15 г, фосфорнокислий калій двозаміщений (K_2HPO_4) – 3 г, глюкоза – 2 г, натрію піруват – 1 г, агар – 20 г, рН середовища доводять до 7,1. Для підвищення селективності до середовища додають налідіксову та піпемідову кислоту.

PLA agar – середовище поєднує три різних середовища, до яких додають антибіотики та яєчний жовток. Рівну кількість (по 100 мл) стерильної розплавленої основи *Bacillus cereus* агар (Oxoid CM617), триптиказо–соевого агару (Merck 5458) та збагаченого поживного агару (SNA) змішують. SNA готують із розрахунку на 1 л: 23 г поживного агару, 6 г екстракту дріжджів, 3 г м'ясного екстракту, 10 г NaCl, 2 г Na_2HPO_4 ; рівень рН доводять до $(7,4 \pm 0,2)$. Усі тверді середовища стерилізуються при температурі 121 °С упродовж 15 хв. Після об'єднання трьох середовищ і охолодження до температури $(45-50)$ °С, додають 3 мл вихідного розчину налідіксової кислоти, 3 мл вихідного розчину піпемідової кислоти та 30 мл 50% суспензії яєчного жовтка

MYPGP agar (бульйон Мюллера–Хінтона, екстракт дріжджів, фосфат калію, глюкоза та піруват). Агар MYPGP із розрахунку на 1 л готують: 10 г бульйону Мюллера–Хінтона (Oxoid CM0405), 15 г екстракту дріжджів, 3 г K_2PO_4 , 2 г глюкози, 1 г Na–пірувату та 20 г агару. Додавання налідіксової кислоти та піпемідової кислоти здійснюється, як описано вище.

J-agar із розрахунку на 1 л: 5 г триптон, 15 г екстракту дріжджів, 3 г K_2PO_4 , 20 г агару. Доводять рівень рН до $(7,3-7,5)$ (Gordon et al., 1973). Автоклавують при температурі 121°C 15 хв. Додають 20 мл 10% стерильної глюкози.

Columbia sheep blood agar (CSA) готують із розрахунку на 1 л: 39 г основи колумбійського агару крові овець з рН 7,3, після автоклавування та охолодження до температури 50 °С додають 5 % стерильної дефібринованої крові овець. Додавання налідіксової кислоти та піпемідової кислоти здійснюється, як описано вище.

Agar BHIT (середовище з серцево–мозковим екстрактом, збагачене тіаміном). Агар BHIT готують із розрахунку на літр: 47 г агару на основі серцево–мозкового екстракту (рН 6,6). Після автоклавування та охолодження до температури 50 °С додають стерильний розчин тіаміну гідрохлориду для отримання кінцевої концентрації в обсязі 1 мг на літр.

До середовищ антибіотики додають в кінцевих концентраціях. Середовище охолоджують до температури $(45-50)$ °С і розливають у стерильні чашки Петрі.

Tomashec medium (сироватковий поживний бульйон та агар) до МПБ/МПА (охолодженого до температури $(45-50)$ °С), рН 6,8–7,0 додають 10% сироватки коней, яку попередньо прогрівають за температури 56°C 20 хвилин.

Egg agar and White's broth – до жовтка додають 70 см³ стерильної дистильованої води, добре перемішують. Можна використовувати жовткову емульсію від виробника без телурита. Жовткову емульсію додають із розрахунку: на кожні 5 см³ МПА/МПБ додають 1 см³ жовткової емульсії та перемішують.

Перед використанням, середовища перевіряють на стерильність.

Milk agar with thiamine – на 1 л: 20 г агару, 10 г екстракту дріжджів (стерилізованого при 121 °С упродовж 15 хв). До 70 мл охолодженого середовища додають 30 мл знежиреного молока та 1,5 мл 0,1% розчину тіаміну, стерилізованого шляхом фільтрації.

Nalidixic acid являє собою синтетичний антибіотик групи хінолонів, який використовується в лабораторіях як селективна добавка. Готують шляхом розчинення 0,1 г у 2 мл 0,1 М NaOH та розводять до 100 мл 0,01 М фосфатним буфером, рН 7,2. Початкова концентрація 1000 мкг/мл. Стерилізують фільтруванням. Кінцева концентрація: 10 мкг/мл для зразків личинок і 20 мкг/мл для зразків меду. Додається до середовищ у разі дослідження личинок.

Pipemidic acid – антибактеріальний препарат, що належить до уроантисептиків групи хінолонів. Готують шляхом розчинення 0,2 г у 2 мл 0,1 М NaOH та розводять до 100 мл 0,01 М фосфатним буфером, рН 7,2. Початкова концентрація 2000 мкг/мл. Стерилізують фільтруванням. Кінцева концентрація: 10 мкг/мл для проб меду. Використовують при дослідженні проб меду та інших зразків.

Приготування середовища з тирозином – для тесту використовують поживний агар (наприклад, MYPG-агар або сироватковий м'ясо-пептонний агар) з додаванням 0,5% або 1% L-тироzinу. У гарячий розплавлений агар додають порошок L-тироzinу (з розрахунку 5–10 г на 1 л середовища), ретельно перемішують. Стерилізують в автоклаві при 121 °С протягом 15 хв. Розливають в чашки. Під час автоклавування тирозин частково розчиняється. Коли середовище виймають, його потрібно активно збовтати, щоб кристали рівномірно розподілилися, і відразу розлити в чашки Петрі. Після застигання агар стає матово-білим, каламутним і непрозорим.

Приготування барвників за методом Грама

Розчин кристалічний фіолетовий (генціанвіолету). Зважити 1 г кристалічного фіолетового, додати 10 см³ етилового спирту та 2 г карболової кислоти. В кінці до суміші додати 100 см³ дистильованої води. Розчин перенести до посуду, який щільно закривається та залишити у термостаті на добу для розчинення компонентів. Потім фільтрувати через паперовий фільтр. Для фарбування мазків використовувати 10% розчин генціанвіолету, який необхідно приготувати безпосередньо перед використанням (*ex tempore*).

Розчин Люголя. У мірну колбу ємністю 100 см³, в якій є 10 см³ дистильованої води, помістити наважки йодиду калію масою 2 г та кристалічного йоду масою 1 г. Залишити на кілька годин до повного розчинення йоду. Додати дистильовану воду до 100 см³.

Карболовий фуксин Ціля. 1 г основного фуксину зважити та додати 10 см³ етилового спирту та 5 г фенолу. В кінці до суміші додати 100 см³ дистильованої води. Розчин перенести до посуду, який щільно закривається та залишити у термостаті на добу. Потім профільтрувати через паперовий фільтр. Готовий розчин перед використанням розвести у співвідношенні 1:5 (*ex tempore*), яким і фарбувати зразки.

Фарбування за Грамом

Фіксовані мазки-відбитки (мазки) фарбують за методом Грама. При цьому бактерії поділяються на дві групи: грампозитивні та грамнегативні. Грампозитивні бактерії після обробки спиртом залишають фіолетове забарвлення генціанвіолету, а грамнегативні – після обробки спиртом втрачають первинне забарвлення (фіолетовий колір) та забарвлюються у червоний колір після додаткового фарбування фуксином. Для фарбування мазків-відбитків за методом Грама використовують такі барвники: генціанвіолет, розчин Люголя, розчин фуксину. Вони доступні в готовому вигляді, або готуються з компонентів. Приготування барвників наведено в додатку 2.

Техніка фарбування. На фіксований препарат-відбиток накладають смужку фільтрувального паперу, на який наносять розчин генціанвіолету. Через (1-2) хв видаляють барвник, паперову смужку прибирають, а на препарат наносять розчин Люголя, який через (1-2) хв зливають і знебарвлюють мазок 96 % етиловим спиртом протягом 30 сек. Мазок-відбиток промивають водою, покривають фільтрувальним папером та фарбують робочим розчином фуксину протягом (1-2) хв. Препарат промивають водою і просушують фільтрувальним папером.

Приготування барвників для виявлення спор

Малахітовий зелений. Готують 5 % розчин малахітового зеленого: розчиняють 5 г малахітового зеленого у 100 см³ деіонізованої води.

Малахітовий зелений є світлочутливим барвником, зберігають його у темному місці.

УВАГА! Барвник малахітовий зелений є токсичним, вдихання його парів або контакт із шкірою може бути небезпечним.

Приготування 5% розчину хромової кислоти або розчину хромового ангідриду (CrO₃) – розчиняють 5 г сухої речовини в 95 мл дистильованої води. Оскільки хромовою кислота є потужним окисником та сильним токсином, обов'язково використовуйте захисні окуляри, гумові рукавички та витяжну шафу.

Приготування 5% розчину нігрозину – додають 10 г барвника до 100 мл дистильованої води (демінералізованої), кип'ятять 10 хв. Охолоджують та додають 0,5 мл 37 % формальдегіду. Фільтрують.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. BAKONYI T., DERA KHSHIFAR I, GRABENSTEINER E. & NOWOTNY N. (2003). Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus* larvae in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (3), 1504–1510.
2. BZDIL J. (2007): Detection of *Paenibacillus* larvae spores in the debris and wax of honey bee by the Tween 80 method. *Acta Vet. Brno*, 76, 643–648.
3. DE GRAAF D.C., ALIPPI A.M., ANTÚNEZ K., ARONSTEIN K.A., BUDGE G., DE KOKER D., DE SMET L., DINGMAN D.W., EVANS J.D., FOSTER L.J., FÜNFHAUS A., GARCIA GONZALEZ E., GREGORC A., HUMAN H., MURRAY K.D., NGUYEN B.K., POPPINGA L., SPIVAK M., VAN ENGELSDORP D., WILKINS S. & GENERSCH E. (2013). Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *J. Apicult. Res.*, 52 (1)
4. DE GRAAF D.C., ALIPPI A.M., ANTÚNEZ K., ARONSTEIN K.A., BUDGE G., DE KOKER D., DE SMET L., DINGMAN D.W., EVANS J.D., FOSTER L.J., FÜNFHAUS A., GARCIA GONZALEZ E., GREGORC A., HUMAN H., MURRAY K.D., NGUYEN B.K., POPPINGA L., SPIVAK M., VAN ENGELSDORP D., WILKINS S. & GENERSCH E. (2013). Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *J. Apicult. Res.*, 52 (1)
5. DJUKIC M., BRZUSZKIEWICZ E., FÜNFHAUS A., VOSS J., GOLLNOW K., POPPINGA L., LIESEGANG H., GARCIA-GONZALEZ E., GENERSCH E. & ROLF D. (2014). How to kill 22 the honey bee larva: Genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus* larvae. *PLoS One*, 9 (3): e90914. Doi: 10.1371/journal.pone.0090914
6. MORRISSEY B.J., HELGASON T., POPPINGA L., FÜNFHAUS A., GENERSCH E. & BUDGE G.E. (2015). Biogeography of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood using a new multilocus sequence typing scheme. *Environ. Microbiol.*, 17, 1414–1424
7. RIEG S., BAUER T.M., PEYERL-HOFFMANN G., HELD J., RITTER W., WAGNER D., KERN W.V. & SERR A. (2010). *Paenibacillus* larvae bacteremia in injection drug users. *Emerg. Infect. Dis.* 16 (3), 487–489.
8. SCHÄFER M.O., GENERSCH E., FÜNFHAUS A., POPPINGA L., FORMELLA N., BETTIN B. & KARGER A. (2014). Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus* larvae, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Vet. Microbiol.*, 170, 291–297.
9. BEIMS H, BUNK B, ERLER S, MOHR KI, SPRÖER C, PRADELLA S, GÜNTHER G, ROHDE M, VON DER OHE W, STEINERT M. (2020). Discovery of *Paenibacillus* larvae ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I–IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *Int J Med Microbiol.*, 310(2):151394. Doi: 10.1016/j.ijmm.2020.151394. Epub 2020 Jan 16. PMID: 31959580.
10. HAMDI C, ESSANAA J, SANSONNO L, CROTTI E, ABDI K, BARBOUCHE N, BALLOI A, GONELLA E, ALMA A, DAFFONCHIO D, BOUDABOUS A, CHERIF A. (2013) Genetic and biochemical diversity of

Paenibacillus larvae isolated from Tunisian infected honey bee broods. Biomed Res Int. 2013; 2013:479893. doi: 10.1155/2013/479893. Epub 2013 Sep 2. PMID: 24073406; PMCID: PMC3774041

11. SANDRA NEUENDORF, KATI HEDTKE, GERHARD TANGEN AND ELKE GENERSCH (2004) Biochemical characterization of different genotypes of Paenibacillus larvae subsp. larvae, a honey bee bacterial pathogen. Microbiology Society. Volume 150, Issue 7., P.2381–2390.

12. POHORECKA, K., SKUBIDA, M., BOBER, A. & ZDAŃSKA, D. (2012). Screening of Paenibacillus Larvae Spores in Apiaries from Eastern Poland. Nationwide Survey. Part I. Journal of Veterinary Research, 56(4), 539-545.

13. LAHO, M., ŠEDIVÁ, M., MAJTÁN, J., & KLAUDINY, J. (2021). Fructose and Trehalose Selectively Enhance In Vitro Sporulation of Paenibacillus larvae ERIC I and ERIC II Strains. Microorganisms, 9(2), 225.

14. HIRAI, Y., SUZUKI, T., INABA, N., MINOGUCHI, N., & TAKAMATSU, D. (2016). Existence of Paenibacillus larvae genotypes ERIC I-ST2, ERIC I-ST15 and ERIC II-ST10 in the western region of Aichi prefecture, Japan. The Journal of Veterinary Medical Science, 78, 1195–1199.

15. BASSI, S., FORMATO, G., MILITO, M., TREVISIOL, K., SALOGNI, C., & CARRA, E. (2015). Phenotypic characterization and ERIC–PCR based genotyping of Paenibacillus larvae isolates recovered from American foulbrood outbreaks in honey bees from Italy. Veterinary Quarterly, 35(1), 27–32.

ПЩАНСЬКИЙ Олександр Вікторович

кандидат ветеринарних наук, директор Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (далі – ДНДІЛДВСЕ)

КАРПУЛЕНКО Максим Сергійович

кандидат ветеринарних наук, старший дослідник, старший науковий співробітник науково-дослідного відділу епізоотології та інфекційних хвороб ДНДІЛДВСЕ

ПОСТОЄНКО Володимир Олексійович

доктор сільськогосподарських наук, професор, член-кореспондент НААН України, директор ННЦ «Інститут бджільництва ім. П.І. Прокоповича»

АЛЕКСЕЄВА Галина Борисівна

кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, заступник директора з наукового забезпечення лабораторної діагностики заразних хвороб тварин ДНДІЛДВСЕ

КУРЯТА Наталія Володимирівна

заступник директора – керівник випробувального центру ДНДІЛДВСЕ

РОМАНЬКО Марина Євгенівна

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, заступник директора з наукової роботи ДНДІЛДВСЕ

УХОВСЬКИЙ Віталій Вікторович

доктор ветеринарних наук, професор, заступник директора з контролю якості ветеринарних імунобіологічних засобів ДНДІЛДВСЕ

КОРНІЄНКО Леонід Євгенович

доктор ветеринарних наук, професор, головний науковий співробітник науково-дослідного відділу епізоотології та інфекційних хвороб ДНДІЛДВСЕ

МАТВІЄНКО Олена Володимирівна

завідувач науково-дослідного відділу епізоотології та інфекційних хвороб ДНДІЛДВСЕ

КИЇВСЬКА Ганна Валеріївна

кандидат ветеринарних наук, старший дослідник, старший науковий співробітник науково-дослідного відділу епізоотології та інфекційних хвороб ДНДІЛДВСЕ

КУЛИКОВА Влада Вячеславівна

кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, молодший науковий співробітник науково-дослідного відділу епізоотології та інфекційних хвороб ДНДІЛДВСЕ

ЛИСЮК Олександр Миколайович

провідний лікар ветеринарної медицини науково-дослідного відділу епізоотології та інфекційних хвороб ДНДІЛДВСЕ

МУСІЄЦЬ Ірина Володимирівна

завідувач науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

КРАВЦОВА Оксана Леонідівна

завідувач лабораторії діагностики захворювань бактеріальної етіології науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

ОРДИНСЬКА Діана Олександрівна

науковий співробітник лабораторії діагностики захворювань бактеріальної етіології науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

ГОРДІЄНКО Ольга Іванівна

кандидат ветеринарних наук, науковий співробітник лабораторії бактеріологічних досліджень з контролю якості ветеринарних імунологічних препаратів та виготовлення поживних середовищ науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

ПРИДЮК Олена Василівна

провідний лікар ветеринарної медицини лабораторії діагностики захворювань бактеріальної етіології науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

КОВАЛЕНКО Вячеслав Леонідович

доктор ветеринарних наук, професор, головний науковий співробітник науково-дослідного відділу організації наукової та міжнародної роботи ДНДІЛДВСЕ

СТОРЧАК Юлія Георгіївна

кандидат ветеринарних наук, старший викладач кафедри епізоотології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, старший науковий співробітник науково-дослідного відділу контролю кормів, кормових добавок та продуктів рослинного і тваринного походження ДНДІЛДВСЕ

ІГНАТОВСЬКА Маріанна Володимирівна

кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України

Американський гнилець медоносних бджіл (*Paenibacillus larvae*).

Відбір зразків та діагностика

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

В авторській редакції

Підписано до друку _____. р. Формат _____
Папір друк. №2. Друк офсетний. Ум. друк. арк. ____
Тираж ____ прим. Зам. №__

Видавець: (назва підприємства)
(поштова адреса видавця)
Тел.: (телефони видавця)
E-mail: (електронна пошта видавця)