

Neue Forschungsergebnisse zu *Paenibacillus larvae larvae*, dem Erreger der Amerikanischen Faulbrut.

Elke Genersch

Länderinstitut für Bienenkunde, Friedrich-Engels-Str. 32, 16540 Hohen Neuendorf

elke.gensch@rz.hu-berlin.de

Vortrag am 08.06.2005, Berliner Veterinärmedizinische Gesellschaft

Die Amerikanische Faulbrut (AFB), eine bakterielle Erkrankung der Honigbienenlarven, ist weltweit verbreitet, hoch ansteckend und führt in der Regel zum Zusammenbruch der erkrankten Völker. In Deutschland ist die AFB eine anzeigepflichtige Tierseuche.

Vor bald 100 Jahren wurde der Erreger der Amerikanischen Faulbrut identifiziert und als *Bacillus larvae* beschrieben (White, 1906). 1950 isolierte Katznelson *Bacillus pulvifaciens*, einen nahen Verwandten von *Bacillus larvae*, als Erreger einer weiteren bakteriellen Bruterkrankung der Honigbienen, der seltenen „powdery scale disease“ (Katznelson, 1950). *Bacillus larvae* und *Bacillus pulvifaciens* wurden 1993 dem neuen Genus *Paenibacillus* zugeordnet (Ash et al., 1993). Eine detaillierte Untersuchung dieser beiden Spezies mit z.T. molekularen Methoden ergab, dass sie sich so ähnlich sind, dass sie lediglich als zwei Subspezies (*larvae* und *pulvifaciens*) innerhalb der Spezies *Paenibacillus larvae* klassifiziert werden können (Heyndrickx et al., 1996).

Zur Unterscheidung zwischen den beiden Subspezies hat Heyndrickx et al. (1996) u.a. folgende Charakteristika für *Paenibacillus larvae larvae* (*P. l. larvae*) beschrieben:

- die Koloniepigmentierung ist ausschließlich grau-weiß,
- der API Test ergibt eine positive Reaktion für Salicin und eine negative Reaktion für Mannitol,
- eine wiederholte Subkultivierung in Nährmedium ist nicht möglich.

Desweiteren gilt nach Heyndrickx et al. (1996), dass *Paenibacillus larvae* als Subspezies *pulvifaciens* (*P. l. pulvifaciens*) zu identifizieren ist, wenn

- die Kolonien orange-rot pigmentiert sind,
- die Bakterien im API Test Salicin-negativ und Mannitol-positiv reagieren,
- und eine wiederholte Subkultivierung in Nährmedium möglich ist.

Die Unterscheidung der beiden Subspezies ist tierseuchenrechtlich relevant, da nur *P. l. larvae* der Erreger der anzeigepflichtigen Tierseuche „Amerikanische Faulbrut“ ist.

Bei AFB-Ausbrüchen in Deutschland, Schweden und Finnland werden - regional unterschiedlich häufig - orange-pigmentierte *P. l. larvae*-Stämme isoliert, die außerdem im API-Test Salicin-negativ und Mannitol-positiv reagieren. Unsere Untersuchungen zeigten, dass diese Stämme zu einem morphologisch und biochemisch von den „normalen“ *P. l. larvae*-Stämmen unterscheidbaren Genotyp gehören (Genersch & Otten, 2003; Neuendorf et al., 2004). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass dieser Genotyp virulenter ist als die „normalen“ *P. l. larvae*-Genotypen (Genersch et al., 2005, bei Appl. Environ. Microbiol. akzeptiert), da er die infizierten Larven innerhalb von maximal 10 Tagen tötet, während die anderen Genotypen mindestens 10 bis 13 Tage brauchen, um 100% der infizierten Larven zu töten.

Da die orange Pigmentierung dieser *P. l. larvae*-Stämme immer wieder dazu führte, dass sie, obwohl aus klinisch kranken Larven isoliert, als *P. l. pulvifaciens* diagnostiziert wurden, haben wir die die beiden *P. larvae*-Subspezies, *P. l. larvae* und *P. l. pulvifaciens*, näher untersucht. Unsere biochemischen und genetischen Analysen des DSMZ-Typstamms für *P. l. pulvifaciens* (DSM 3615) ergaben, dass dieser mit dem DSMZ-Typstamm für *P. l. larvae* (DSM 7030) identisch ist (Kilwinski et al., 2004). Die anschließende Untersuchung mehrerer Typ- und Referenzstämme für beide Subspezies (*P. l. larvae* und *P. l. pulvifaciens*) aus verschiedenen Stammsammlungen sowie etlicher Feldisolate aus Deutschland, Schweden und Finnland ergab keinen Hinweis auf die Existenz einer Subspezies *pulvifaciens*. Wir konnten sogar zeigen, dass die Vertreter der sog. Subspezies *pulvifaciens* pathogen für Bienenlarven sind, der zeitliche Verlauf der Erkrankung dem einer Infektion mit dem orange-pigmentierten *P. l. larvae*-Genotyp ähnelt und die toten Larven sich zu einer fadenziehenden Masse zersetzen (Genersch et al., eingereicht bei Int. J. Syst. Evol. Microbiol.).

Unsere Untersuchungen zeigen, dass sich die Spezies *P. larvae* nicht in zwei Subspezies mit unterschiedlicher Pathologie einteilen lässt. Vielmehr gibt es innerhalb der Spezies *P. larvae* mehrere, unterschiedlich virulente Genotypen, die jedoch alle bienenpathogen sind und infizierte Larven zu fadenziehender Masse zersetzen. Die bisherigen Kriterien bei der mikrobiologischen Differenzierung innerhalb der Spezies *P. larvae* (Koloniepigmentierung, API-Test) kann zu falsch-negativen Labor-Diagnosen führen und so eine sinnvolle Bekämpfung der AFB durch den Amtstierarzt erschweren.

Literatur

Ash, C., Priest, F. G. & Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**, 253-260.

Genersch, E. & Otten, C. (2003). The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie* **34**, 195-206.

Genersch, E., Ashiralieva, A. & Fries, I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease of honey bees. *Appl Environ Microbiol*, **in press**.

Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J. & Fries, I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int J Syst Evol Microbiol*, **submitted**.

Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N., Ali, N., & Berkeley, R. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 270-279.

Katznelson, H. (1950). *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honey bee larvae. *J Bacteriol* **59**, 153-155.

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. *Vet Microbiol*, **104**, 31-42.

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**, 2381-2390.

White, G. F. (1906). The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. In *Bureau of Entomology, Special Series 14*, 50 pp. Washington DC: US Department of Agriculture.