



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association
e-ISSN: 2667-8381

Saliha BEDİZ ŞAHİN^{1a*}
Barış SAREYYÜPOĞLU^{2b}

¹Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ORCID^a: 0000-0002-1963-8958
ORCID^b: 0000-0002-2212-2610

***Sorumlu Yazar:** Saliha BEDİZ ŞAHİN
E-Posta: salihabediz@gmail.com

Geliş Tarihi: 17.11.2023
Kabul Tarihi: 26.12.2023

14 (3): 149-161, 2023
DOI: 10.38137/vftd.1392294

Makale atf

Bediz Şahin, S. ve Sareyyüpoğlu, B. (2023). Bal Arılarının Bakteriyel Hastalıkları ve Hastalıkların Teşhisine Yönelik Güncel Metotlar, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (3), 149-161. DOI: 10.38137/vftd.1392294.

BAL ARILARININ BAKTERİYEL HASTALIKLARI ve HASTALIKLARIN TEŞHİSİNE YÖNELİK GÜNCEL METOTLAR

ÖZET. Bal arıları, diğer hayvanlardan farklı olarak binlerce bireyden oluşan bir süper-organizma olarak kabul edilir ve içinde kraliçe, işçi ve erkek arılar bulunur. Bal arılarında yavru çürüklükleri, spiroplazmoz ve septisemi gibi bakteriyel hastalıklar görülmektedir. Bu hastalıklar arasında larvaları etkileyen *Paenibacillus larvae* ve *Melissococcus plutonius* 'un neden olduğu yavru çürüklükleri ekonomik açıdan diğer bakteriyel hastalık etkenlerine kıyasla daha fazla öneme sahiptir. Bal arıları, kovan içindeki yakınlıkları ve yiyecek arama alışkanlıkları nedeniyle infeksiyonların kolayca yayılmasına katkıda bulduklarından bu hastalıkların teşhisi ve kontrolü, arıcılık sektörünün sürdürülebilirliği için kritik bir öneme sahiptir. Bu bağlamda, arı hastalıklarının doğru ve hızlı bir şekilde tespiti için araştırmacılar yeni ve güvenilir teşhis yöntemleri geliştirmeye yönelmişlerdir. Bu derlemede, arıcılık sektörü için önem taşıyan bakteriyel arı hastalıklarının teşhisi ve teşhiste güncel gelişmeler üzerine odaklanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Melissococcus plutonius*, *Paenibacillus larvae*, septisemi, *Spiroplasma* spp., tanı, yavru çürüklüğü.

BACTERIAL DISEASES of HONEY BEES and CURRENT METHODS for THE DIAGNOSIS of DISEASES

ABSTRACT. Unlike other animals, honey bees are considered a super-organism consisting of thousands of individuals, including queen, worker and drones. Bacterial diseases such as foulbrood, spiroplasmosis and septicemia are observed in honey bees. In honey bees Among the bacterial diseases of honey bees, foulbroods caused by *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*, which affect the larvae, are more economically important than others. Diagnosis and control of these diseases is critical for the sustainability of the beekeeping sector, as honey bees contribute to the easy spread of infections due to their proximity and foraging habits within the hive. In this context, researchers have been driven to develop new and reliable diagnostic methods for accurate and rapid detection of bee diseases. This review focuses on the diagnosis of bacterial bee diseases of importance for the beekeeping industry and current developments in diagnostics.

Keywords: Diagnosis, foulbrood, *Melissococcus plutonius*, *Paenibacillus larvae*, septicemia, *Spiroplasma* spp.

GİRİŞ

Bir arı kovanı, veteriner hekimler için tek tek tedavi ettikleri diğer hayvanların aksine, gelişmekte olan larvalar ve yetişkin bal arıları ile birlikte binlerce bireyin oluşturduğu bir super organizma olarak ele alınmaktadır. İçerisinde kraliçe, işçi ve erkek arılar bulunan bu süper organizmada, genellikle en çok endişe edilen ve tedavi edilmesi gereken ise larvalardır (Applegate ve Petritz, 2020). *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Serratia marcescens*, *Spiroplasma apis* ve *Spiroplasma melliferum* bal arılarında bakteriyel hastalıkların birincil nedeni olarak gösterilen etkenlerdir (Burritt ve ark., 2016). Bunlar arasında, neden oldukları hastalıklara bağlı ekonomik kayıplar açısından en önemlileri ise daha çok larvaları etkileyen *P. larvae* ve *M. plutonius*'tur (Fünfhaus ve ark., 2018).

Arıların kovan içindeki yoğunluğu, birbirine yakın yerleşimi ve yiyecek arama alışkanlıkları nedeniyle infeksiyonlar kovan içinde ve kovanlar arasında kolayca yayılır. İnfekte kovanlarda sosyal bağışıklık ile ilişkili davranışlar sergileyen ve iş birliği halinde olan yetişkin arılar bakteriyel hastalıkların göz ardı edilmesine neden olmaktadır. Bal arıları, patojenlere maruz kaldıklarında yetişkin işçiler, infekte arılara saldırmak veya dışlamak için kovan girişinin kontrolünü sağlarlar (Cremer ve ark., 2007). Bu davranış şekli ise infekte kolonilerdeki bakteriyel patojenlerin tespit edilmesini zorlaştırmaktadır (Raymann ve ark., 2018). Ayrıca, farklı patojenler genellikle aynı anda arı kovanını infekte ederek koloni sağlığını daha da azaltmakta ve diğer zorluklara karşı savunmasız hale getirmektedirler (Lannutti ve ark., 2022).

Arı ürünleri ve arıların tozlaşmadaki etkisi nedeniyle küresel düzeyde arıcılık önemli bir sektör konumundadır. Bal arılarının uluslararası ticareti, infeksiyonların küresel olarak yayılmasına neden olmakta ve bunların birçoğu arıcılık için önemli kayıplara yol açmaktadır (Lannutti ve ark., 2022). Bu nedenle bal arılarında verim kayıplarına neden olarak görülen hastalıklar ciddi önem arz etmektedir. Dolayısı ile bu hastalıklardan en önemli olanların teşhisinin doğru bir şekilde yapılabilmesi gerekmektedir. Geçmiş yıllardan beri duyulan bu gereklilik arı hastalıkları üzerinde çalışan araştırmacıları hızlı, pratik ve yüksek

güvenirlikte metot ve araçların geliştirilmesi için teşvik etmiştir. Bu derlemede bakteriyel arı hastalıklarının tanı yöntemleri ve güncel gelişmeler üzerinde durulmuştur.

AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ

Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) hastalığının etkeni ılıman ve subtropikal bölgelerdeki kolonilerde ciddi kayıplara neden olan Gram pozitif ve spor oluşturabilen *Paenibacillus larvae*'dir (Genersch, 2010). AYÇ, Avrupa Yavru Çürüklüğü (AvYÇ) ile birlikte Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (World Organisation for Animal Health; WOAAH)'nın Dünya Delegeler Meclisi (The World Assembly of Delegates) tarafından kabul edilen Karasal Kod (Terrestrial Code) içerisinde karasal hayvan hastalıkları listesinde yer alan bakteriyel hastalıklardır (WOAH, 2023a).

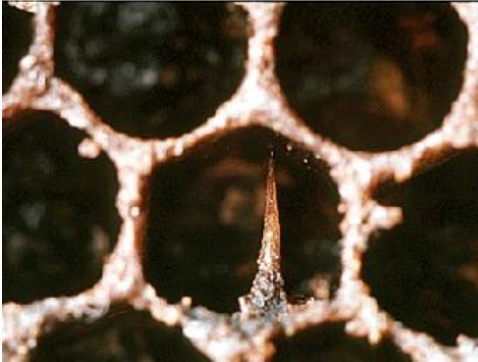
P. larvae sporları arı ürünlerinde (bal, balmumu, ölü larvalar) ve çevrede 3 ila 10 yıl, kurumuş larva kalıntılarında 35 yıl ve saflaştırılmış sporlar ise 70 yıldan fazla yaşayabilmektedirler (WOAH, 2023b). *P. larvae*'nin koloniler arasında doğal yayılımı, bakteriyel sporları taşıyan bal arılarının, koloniler arasında sürüklendiği veya zayıf kolonilerden kaynakları çaldığı, sporları topladığı ve kendi kolonilerine geri götürdüğü horizontal bulaşma yoluyla gerçekleşmektedir (Ingemar ve Scott, 2001). Bu nedenle hastalığın bulaşması koloni yoğunluğuna bağlı olmakta ve AYÇ salgınları arıcılığın fazla olduğu bölgelerde daha sık görülmektedir (Peters ve ark., 2006). Larvaların mevcut olduğu her dönemde görülebilen bu infeksiyon özellikle yumurtlamanın yoğun olduğu dönemlerde daha fazla görülmektedir (Borum, 2014).

P. larvae sporları larvalar için patojen olduğundan yetişkin arılarda hastalık oluşturmamaktadır (Uygur ve Girişgin, 2008). Genç arı larvaları, *P. larvae* sporlarını hemşire arılar tarafından kendilerine verilen yiyeceklerle oral yoldan almakta ve yumurtadan çıktıktan sonraki ilk 12 ila 36 saat boyunca infeksiyona daha yatkın olmaktadır (Hoage ve Rothenbuhler, 1966; Bamrick, 1967). *P. larvae* sporları orta bağırsak lümeninde vejetatif hale gelerek bağırsak epiteline nüfuz ettikten sonra epitel lokal olarak bozar ve hemoselde kitlesel olarak çoğalırlar. Spor üretmeye devam ettikçe hemoseli tamamen kaplar (Yue ve ark., 2008). İnfekte larva öldükten sonra *P. larvae* gelişmeye devam eder ve ölen larva tam olarak çürümüş hale dönüşene kadar ayrıştırılır. Hastalıklı bir petek gözündeki ölü tek bir larvada bir milyardan fazla endospor bulunabilmektedir. Koloni düzeyinde hastalığın seyri ilerledikçe daha fazla larva infekte

olur ve ölür. Böylece yavru sayısının azalmasıyla soyun devamı sağlanamaz ve bu durum koloninin sönmesine neden olur (Genersch, 2008; Genersch, 2010). Birçok farklı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için uğraşlar verilmesine rağmen AYÇ'nin arıcılık endüstrine büyük zararlar vermeye devam ettiği de bilinmektedir.

AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞININ TEŞHİSİ KLİNİK BULGULAR

AYÇ tanısı için birincil klinik bulgu, infekte olan larvanın öldükten sonra genellikle kahverengimsi, yarı akışkan tutkal benzeri bir kıvam almasıdır. İnfekte kolonilerin petek gözleri yamalı bir görüntü alır. Hastalıklı bal arısı larvalarını içeren kapalı yavru gözlerinde koyu-yağlı bir görünüm ve içeri doğru çöküklük görülebilir (Forsgren ve ark., 2018). Yavru gözlerine bir kibrit çöpü batırılıp çekildiğinde iplik şeklinde uzayan kremi veya koyu kahverengi tutkal benzeri larva kalıntıları en belirgin klinik bulgu olarak arıcılar tarafından kolayca teşhis edilebilmektedir. Larva, pupal dönemde çürüdüğünde ise karakteristik olarak kuluçkanın tepesine kadar uzanmış pupal dil görünümü alabilir (De Graaf ve ark., 2006) (Şekil 1).



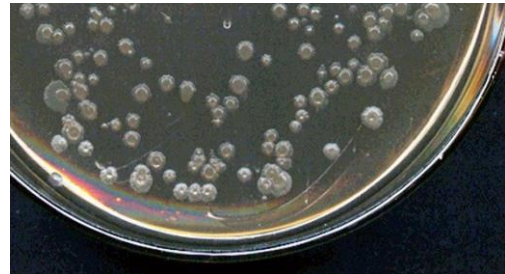
Şekil 1. Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığında karakteristik pupal dil görünümü (WOAH, 2023b).

Hastalık şüphesini doğrulamak veya *P. larvae* prevalansını izlemek için, bal arısı kovanından çeşitli ürünler (örneğin, bal, arılar, balmumu, polen) laboratuvar analizi için alınabilirler (De Graaf ve ark., 2006). Bal ve yetişkin arı örnekleri kullanılarak yapılan hastalık teşhisi balmumu, polen ve atık örneklerinde bakteri tespitine kıyasla daha yüksek bir teşhis değerine sahiptir (Adjlane ve ark., 2014; Forsgren ve Laugen, 2014).

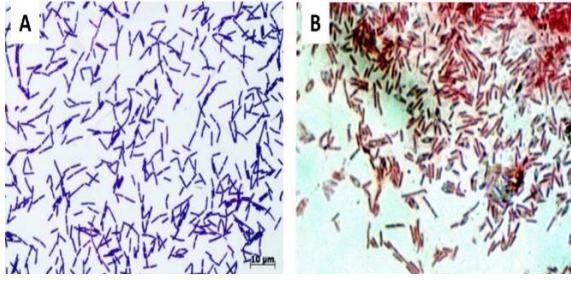
LABORATUVAR TEŞHİSİ

Direkt Mikroskopi: Hastalıklı ölü larvaların arılıklarda lama yayılarak kurutulmasıyla elde edilen preparatlar direkt mikroskopi ve kültür için kullanılabilir (De Graaf ve ark., 2006). Sürüntü üzerine 1-2 damla steril su eklenerek yapılan Gram boyamada mikroskopta tek veya üzüm salkımı halinde elipsoidal pembe renkli, karbol fuksin ile boyama da ise kırmızı-mor renkli kalın kenarlı elipsoidal $0.6 \times 1.3 \mu\text{m}$ boyutlarındaki sporlar görülür (WOAH, 2023b).

Etken İzolasyonu: *P. larvae* izolasyonu için *Paenibacillus larvae* agar (PLA), MYPGP (Mueller-Hinton broth, maya ekstraktı, potasyum fosfat, glukoz ve piruvat içeren besiyeri) agar, tiamin eklenmiş Beyin kalp infüzyon agar (BHIT), J-agar (tripton, maya ekstraktı, K_2HPO_4 , glikoz, agar içeren besiyeri) ve Columbia koyun kanlı agar (CSA) gibi katı besiyerleri önerilmektedir ve bu ortamlara mantar üremesini engellemek için amfoterisin B eklenebilir. Diğer bakterilerin vejetatif formlarını öldürmek için *P. larvae* sporlarını içeren homojenize edilen larval sulu çözeltiye 80°C 'de 10 dk veya $95-96^\circ\text{C}$ 'de 3-5 dk ısı şoku uygulaması yapılabilir (Forsgren ve ark., 2008). Ekim yapılan agarlar 37°C 'de 2-4 gün boyunca %5-10 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakılırlar. PLA'da koloniler opak, pürüzlü yüzeyle, küçük yeşil-sarı renkli, MYPGP ve J-agarda ise küçük, düzenli, çoğunlukla pürüzlü, beyazımsı bej renklidir (Şekil 2). Üreyen kolonilerden yapılan Gram boyamada etken Gram pozitif çomaklar olarak görülür (Şekil 3A). Schaeffer & Fulton yöntemi kullanılarak yapılan boyamada ise bakteri kırmızı renkte endosporlar ise yeşil boyalı olarak görülürler (WOAH, 2023b) (Şekil 3B).



Şekil 2. MYPGP agar üzerinde *P. larvae*'nin koloni görünümü (WOAH, 2023b).



Şekil 3. *P. larvae*'nin Gram boyama yöntemi ile boyandığında Gram pozitif mikroskopik görüntüsü (Rieg ve ark., 2010) (A). *P. larvae*'nin Schaeffer & Fulton boyama yöntemi ile endosporların yeşil, etkenin kırmızı boyandığı mikroskopik görüntüsü (WOAH, 2023b) (B).

Biyokimyasal Testler: *P. larvae* genotipleri arasında farklılık göstermekle birlikte glukoz ve trehalozdan asit üretimi ile tipik bir karbonhidrat fermantasyon profiline sahiptirler ancak arabinoz ve ksilozdan asit üretmezler. Ayrıca katalaz negatif olup, etkenler kazein veya sütü hidrolize edebilirler (WOAH, 2023b) Holst süt testi, *P. larvae*'nin sporulasyonunda kazeini hidrolize eden proteolitik enzimlerinin saptanmasına dayanan basit laboratuvar testlerinden biridir (Schuch ve ark., 2001). Yaklaşık %5'lik süt çözeltisi hazırlanır, iki cam tüpe alınır ve birine hastalıklı larva eklenir. 1 saat bekletildikten sonra larva konulan sıvının berrak kahverengiye dönmesi pozitif olarak kabul edilir (López-Urbe, 2022).

Antijen Saptanmasına Dayalı Testler: AYÇ'nin hızlı tanısı için ticari olarak "The Vita American Foulbrood Diagnostic Test Kit" geliştirilmiştir. Şüpheli larva örneği ekstraksiyon şişesine konularak 20 saniye boyunca çalkalanır. Bakteri süspansiyonundan yatay olarak tutulan test aparatına 2 damla konur ve 1-3 dakika sonucunda görülen çift mavi çizgi pozitif olduğunu gösterir (Vita Bee Health, 2023a).

Geleneksel ELISA, bakterinin subklinik seviyelerinin tespiti için yeterince hassas değildir. Pastucha ve ark. (2021) tarafından *P. larvae* için spesifik bir antikor hazırlanmış ve bunu upconversion-linked immunosorbent assay (ULISA) geliştirmek için kullanmışlardır. Bu amaçla Foton-upconversion nanopartiküller (UCNP) bakır katalizli klik kimyası kullanılarak bir PEG-bağlayıcı aracılığıyla streptavidine konjuge edilmiştir. Geliştirilen bu yöntem düşük çapraz reaktivite göstermiş ve ELISA'ya kıyasla

22 kat daha duyarlı $2,9 \times 10^3$ CFU (Colony-forming unit)/mL'lik bir tespit limiti sağlamıştır.

Moleküler Tanı (PCR ve PCR Tabanlı Tanı Testleri): *P. larvae*'nin tanımlanması için ilk PCR testi Govan ve ark. (1999) tarafından geliştirilmiştir ve 16S rRNA genine dayanmaktadır. Dobbelaere ve ark. (2001) benzer bir test tanımlamışlar ve ilkinde göre özgüllüğü daha iyi bulunmuştur. Sonraki yıllarda birçok PCR protokolü geliştirilmiştir (De Graaf ve ark., 2006). Lauro ve ark. (2003)'nin geliştirdiği nested PCR protokolü, bal ve kovan örneklerinin doğrudan analizine izin vermekte ve patojenik seviyenin altındaki *P. larvae* seviyelerini de tespit edebilmektedir.

Beims ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada *P. larvae* genotipleri ERIC I ve ERIC II'yi ayırt etmek için yeni bir çoklu tanı yöntemi olan multipleks qPCR'ı geliştirmişlerdir. CSA agar üzerindeki kültür ve multipleks qPCR birleştirilerek 4 gün içinde genotipler tespit edilmiştir. Bu yöntemle DNA'nın saflaştırılması, jel elektroforezi ve fragman paternlerinin yorumlanması gibi zaman alıcı yöntemler gerekli olmadığından, mevcut çalışma süresi yarıya indirilerek daha hızlı müdahalede bulunma ve daha fazla örnek işlenmesine katkı sağlanmaktadır.

Kuşar ve ark. (2021)'nin geliştirdiği TaqMan tabanlı qPCR ise dijital PCR kullanılarak kalibre edilmiştir. Alınan örneklerin tespit ve kantifikasyon sınırları sırasıyla bal için 8-58 spor/g ve kovan döküntüleri için 188-707 spor/mL bulunmuştur.

Erbay ve ark. (2017) 16S rRNA metabarkodlama analizi kullanarak bal arılarının total vücut mikrobiyotasındaki *P. larvae*'nin rölatif oranlarını değerlendirmişlerdir. Bu değerlendirme sonucunda AYÇ'nin öncelikli olarak işçi arıların patojenik/çevresel bakteri topluluklarını etkilediğini göstermişlerdir.

Diğer Tanı Yöntemleri: Stamereilers ve ark. (2018) *P. larvae*'nin 48 adet faj genomunun tamamını sekanslamışlardır ve tüm fajların endolizin görevi gören N-asetilmuramoil-l-alanin amidazı kodladığını bildirmişlerdir. *P. larvae* saha suşundan izole edilen PPL1c fajı *P. larvae* suşlarını lize etmektedir. *Bacillus*, *Brevibacillus* ve *Paenibacillus* (*P. larvae* hariç) cinsinden türlerin PPL1c ile indüklenen lizise dirençli olduğu kanıtlandığından, PPL1c'ye karşı faj duyarlılığı *P. larvae*'nin tanımlanması için kullanılan tamamlayıcı bir araç olduğu bulunmuştur. (Stahly ve ark., 1999).

Lee ve ark. (2020) infekte larvalarda gaz kromatografisi - kütle spektrometresi aracılığı ile tespit edilen propiyonik asit, valerik asit ve 2-nonanone adlı bileşiklerin volatil hastalık belirteçleri (Volatil disease markers, VHB) olarak kullanılabilmesini belirtmişlerdir. Bu VHB'lerin kovandaki işçi arılar tarafından infekte larva tespitinde etkili olduğunu ve hastalığın belirlenerek koloni kayıplarının önüne geçilebilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi adına umut vadettiği vurgulanmıştır.

Bikaun ve ark. (2022) kovan havasında katı faz mikroekstraksiyonu ve gaz kromatografisi Kütle Spektrometresi kullanarak AYÇ enfeksiyonları için biyosensör olarak 40 uçucu bileşik belirlemişlerdir. Bunlar arasında en hassas uçucu biyosensör olan 2,5-dimetilpirazini yalnızca *P. larvae* ile infekte kovanlarda tespit etmişlerdir. Bu biyosensörlerin AYÇ'nin hızlı teşhisi için taşınabilir sensör cihazları ile tespitinde uygun parametreler olacağını bildirmişlerdir.

AVRUPA YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ

AvYÇ bal arısı kolonilerinin ekonomik olarak önemli bir hastalığıdır ve ciddi vakalar arı kovanlarında ağır hasarlara, hatta tamamen kaybına neden olabilmektedir (Tomkies ve ark., 2009). Hastalığın etkeni *Melissococcus plutonius* Gram-pozitif, genelde mekik şekilli bazen de pleomorfik ve çomak benzeri görünümündedir. Mikroskopta tek tek, çiftler halinde veya çeşitli uzunluktaki zincirler şeklinde görünürler. Optimum üreme sıcaklığı 35°C olup anaerobik olarak da üreyebilen mikroaerofilik bir bakteri olup üremek için karbondioksit ihtiyacı duymaktadır. (Bailey ve Collins, 1982; Forsgren, 2010). AvYÇ mühürlenmemiş yavru gözlerinde bulunan genellikle 4-5 günlük bal arısı larvalarını etkileyerek ölümüne sebep olmaktadır (Forsgren, 2010). Larva, *Enterococcus faecalis* ve *Paenibacillus alvei* gibi sekonder etkenlerden dolayı kötü veya ekşi bir koku yaymaktadır (Arai ve ark., 2012).

Hastalığın görülme sıklığı kış ve ilkbahar aylarında düşüken, yaz aylarında artmaktadır. İnfeksiyondaki ilk adım asemptomatik kolonizasyondur. Kontamine yiyeceklerle alınan *M. plutonius* larvaların orta bağırsağında çoğalmaktadır. Bulaşma sonrası *M. plutonius*'la infekte larvalar yavru gözleri kapatılmadan tespit edilerek hemşire arılarca

uzaklaştırılırlar. Yavru gözleri kapatılmadan önce hemşire arılarca tespit edilemeyen infekte larvalar ölümler ve sekonder etkenler hızla çoğalırlar. Mühürlenmiş yavru gözlerindeki pupaya dönüşen larvalar ise bağırsak içeriğinde etken bulduran güçsüz veya normal erişkinlere dönüşebilirler. Bu durumda *M. plutonius* dışkı ile atılarak yavru gözünde birikmektedir (Bailey ve Ball, 1991).

Rutin arıcılık uygulamaları da *M. plutonius*'un koloniler arasında kolayca taşınmasına neden olur. Bu nedenle AvYÇ genellikle hızlı bir şekilde yayılmakta ve acil bir önlem alınmadıkça ortadan kaldırılması zor olmaktadır (Thompson ve Brown, 2001).

AVRUPA YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞININ TEŞHİSİ

KLİNİK BULGULAR

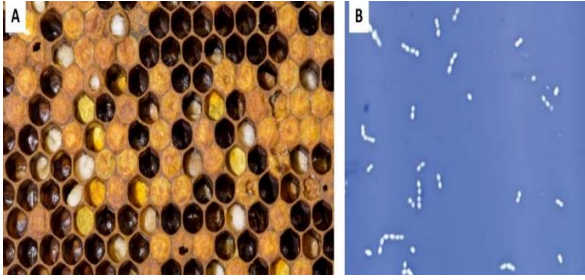
AvYÇ'nin saha tanısı, peteğin görsel muayenesine ve hastalıklı larvaların tespitine dayanmaktadır. Kolonideki genel belirtiler kuluçkadaki kapaklı ve kapaksız gözlerin düzensiz bir şekilde dağılmış olmasıdır. Semptomatik yavru gözlerinin bulunduğu alandan kesilen 10x10 cm'lik parça, yavru gözlerinden sorumlu hemşire arılar, bal ve polen gibi materyaller teşhis için kullanılabilirler (Forsgren ve ark., 2013).

İnfeksiyondan ölen genç larvalar hücrenin dibini kaplar ve neredeyse trakea görünecek kadar şeffaf görünümündedirler (Forsgren ve ark., 2013). Yaşlı larvalar ise yavru gözlerinde larvanın normal olan sarmal pozisyonu yerine, duvarlar etrafında bükülmüş veya uzanmış bir şekil alarak ölmektedirler. Larvanın rengi inci beyazından sarıya daha sonra kahverengiye ve en sonunda siyaha dönüşmektedir. Bazı larvalar yavru gözü mühürlendikten sonra ölebilmektedir ve AYÇ semptomlarına benzer şekilde kapak içeri doğru çökük bir görünümde olmaktadır. Larvaların büyük çoğunluğunda ölüm gerçekleşmiş ise petek düzensiz görünür ve bazen kötü ekşi bir koku hissedilmektedir (Forsgren, 2010; Forsgren ve ark., 2013) (Şekil 4A).

LABORATUVAR TEŞHİSİ

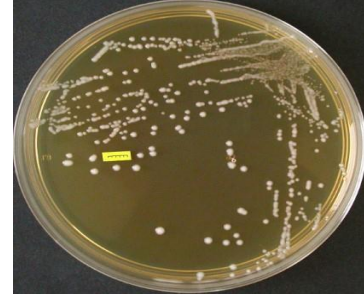
Direkt Mikroskopi: Mikroskopik muayenede infekte larvaların orta bağırsak içeriğinden hazırlanan sulu süspansiyon lam üzerine alınır ve %5 sulu nigrosin ile karıştırılır. Lam üzerine yayıldıktan sonra ateşte kurutularak mikroskopta direk incelenir. Yaklaşık 0,5 × 1,0 µm boyutlarında, tek tek veya kümeler halinde meydana gelen ve çiftler veya kısa zincirler halinde uç uca dizilmiş çok sayıda

mekik şeklinde koklar AvYÇ'nin tanısıdır (WOAH, 2023c) (Şekil 4B). Bir diğer boyama yönteminde lamda hazırlanan smear % 0,2'lik karbol fuksin ile 30 saniye boyanır ve yaklaşık 0,5x1,0 µm büyüklüğündeki boyayı eşit şekilde almış mekik şeklinde koklar *M. plutonius* şüpheli olarak kabul edilir (Forsgren ve ark., 2013).



Şekil 4. Yavru gözlerinin düzensiz, delikli kapaklanması ve infekte larvaların görünümü (WOAH, 2023c) (A). Basal mediumda üreyen etkenin %5 nigrosin boyama ile görüntülenmesi (Arculeo ve ark., 2005) (B).

Etken İzolasyonu: *M. plutonius* baldan ve hastalıklı kuluçkadan örnekleme yoluyla izole edilebilse de, bakteri kültürü yöntemleri mikroskopik olarak sayılan bakterilerin % 0.2'sinden daha azını tespit ettiği için çok düşük duyarlılığa sahiptirler (Hornitzky ve Smith, 1998). Etken izolasyonu için Bailey (1957)'den modifiye edilmiş Basal medium (maya ekstraktı, L-sistein, glukoz, çözünür nişasta, KH₂PO₄, agar içeren besiyeri), M110 agar (pepton, glukoz, çözünür nişasta, maya ekstraktı, neopepton, triptikaz, fosfat tamponu, agar içeren besiyeri) (Forsgren ve ark., 2013) ve KSBHI agar (KH₂PO₄, çözünür nişasta, BHI broth ve agar içeren besiyeri) (Arai ve ark., 2012) kullanılabilir. Bu besiyerlerine ikincil bakterilerin büyümesini önlemek için isteğe bağlı olarak otoklavlamadan sonra ml başına 3 µg nihai konsantrasyona kadar filtre ile sterilize edilmiş nalidiksik asit (0,1 M NaOH içinde çözülmüş) eklenebilir. Anaerobik koşullarda 35°C'de 7 gün inkübe edilir (Forsgren ve ark., 2013) (Şekil 5).



Şekil 5. Basal mediumda üreyen 1 mm boyutundaki *M. plutonius* kolonilerinin görüntüsü (Forsgren ve ark., 2013).

Antijen Saptanmasına Dayalı Testler: İmmunoloji bazlı metot olarak Tomkies ve ark. (2009) tarafından AvYÇ'nin sahada tanısı için infekte doku ekstraktlarındaki biyolojik antijenleri saptayan Yanal Akış Cihazı (Lateral Flow Device, LFD)'na *M. plutonius* için spesifik olan bir monoklonal antikor üretilerek optimize edilmiştir. Böylece optimize edilen bu antikorlar ile yeni bir AvYÇ LFD geliştirilmiştir. Spesifik ve hassas olan bu saha kitlerinin hem hastalık olmayan hem de semptomatik arı kovanlarında latent infeksiyonların araştırılmasında etkili bir araştırma aracı olma potansiyeli taşıdıkları belirtilmiştir. AvYÇ'nin hızlı tanısı için ticari "The Vita European Foulbrood Diagnostic Test Kit" olarak kullanıma sunulmuştur. Uygulanması AYÇ'de uygulanan test kiti ile aynı şekildedir (Vita Bee Health, 2023b). Dezavantaj olarak tek bir larva ile test yapıldığından doğru numune seçimi saha bilgisi gerektirmektedir (Forsgren ve ark., 2013).

ELISA, antikor bazlı bakteri tespiti için kullanılan en iyi yöntemlerden biri olmasına rağmen erken dönemdeki AvYÇ infeksiyonunu ortaya çıkaracak kadar yüksek duyarlılığa sahip değildir. ELISA yöntemindeki bu eksikliğin giderilmesi adına Poláčková ve ark. (2019) Foton-upconversion nanopartiküllerinin (UCNPs) spesifik biyolojik tanıma molekülleri ile konjügasyonundan sonra immünoanalizlerde ultrasensitif etiketler olarak kullanılabilirliği bir yöntem geliştirmişlerdir. Araştırmacılar ULISA adı verilen bu yöntemin geleneksel ELISA

yöntemine göre 400 kat daha duyarlı olduğunu ve hem hastalığın erken dönemde teşhisi hem de yayılmasının engellenmesi için büyük bir potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Moleküler Tanı (PCR ve PCR Tabanlı Tanı Testleri): AvYÇ'nin tanısı için klasik PCR (Govan ve ark., 1998), hem nested PCR (Djordjevic ve ark., 1998), real-time PCR (Roetschi ve ark., 2008) gibi moleküler yöntemler kullanılabilmektedir (WOAH, 2023c). Arai ve ark. (2014) tarafından geliştirilen dubleks PCR ise tipik ve atipik suşlar arasındaki ayrımı sağlamaktadır. Milbrath ve ark. (2021) mikroskopik inceleme ve qPCR ile saha teşhisi için geliştirilen yanıl akış cihazını (Lateral Flow Device, LFD) saha örneklerinde karşılaştırmışlardır. Bu üç teşhis tekniği arasında yüksek düzeyde uyum bulmuşlardır.

Diğer Tanı Yöntemleri: Mikušová ve ark. (2019) tarafından geliştirilen amperometrik immunosensörün ELISA veya PCR'a göre daha hızlı olduğu ve 2 saat gibi kısa bir sürede teşhis sağladığını bildirmişlerdir. Anti-*Melissococcus* antikoru yüksek affinite ve düşük çapraz reaktiviteye sahip olması için horseradish peroksidaz (HRP) ile etiketlenerek hazırlanmıştır. Böylece diğer bakterilerin elektrot yüzeyine bağlanması engellenerek elektrokimyasal dönüştürücüye dayalı hızlı bir test geliştirmişlerdir. Bu yöntemin tespit limiti 6.6×10^4 CFU mL⁻¹ olup, 10^5 - 10^9 CFU mL⁻¹ aralığında geniş bir tespit imkânı sunmaktadır.

SPİROPLASMOZ

Spiroplasma apis ve *Spiroplasma melliferum* bal arısı patojenleridir. Spiroplasmalar küçük, sarmal, hareketli, hücre duvarından yoksun Gram-pozitif bakterilerdir. Bağırsak bariyerini geçerek çoğalırlar ve hemolenfe ulaşarak arının ölümüne neden olurlar (Regassa ve Gasparich, 2006). Bu hastalık mayıs ve haziran aylarında görülmesi nedeniyle "Mayıs hastalığı" olarak da adlandırılmaktadır. Hastalığa neden olan etken *S. apis* Mouches ve ark. (1983) tarafından izole edilerek tanımlanmıştır. *S. melliferum* ise Clark ve ark. (1985) tarafından bir tarama çalışması sırasında bal arılarının bağırsak ve hemolenfinden izole edilerek tanımlanmıştır. Nörolojik semptomlarla

seyreden spiroplazmoz, özellikle ilkbahar aylarında görülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar *S. apis* ve *S. melliferum*'un tipik bal arısı mikrobiyotasının bir parçası olmayan fakültatif simbiyotlar olduğunu ancak geçici ve bölgesel olarak yaygın olması nedeniyle bal arısı sağlığını etkilediğini göstermektedir (Schwarz ve ark., 2014). Bazı spiroplasma suşları arıların temas ettiği çiçeklerden izole edilmiş ve bunlar yetişkin arılara injeksiyon veya gıda yoluyla verildiğinde patojenik oldukları gözlemlenmiştir (Mouches ve ark., 1984).

Spiroplazma infeksiyonları, bal arılarını tek başına etkileyebilir veya parazitler, virüsler, yetersiz beslenme ve kimyasal kalıntılar gibi diğer faktörlerle etkileşimi veya kombinasyonu ile savunmasızlığını artırabilir (Zheng ve Chen, 2014). *S. apis* infeksiyonlarının, *S. melliferum* infeksiyonlarından daha yüksek ölüm oranlarıyla ilişkili olduğu deneysel olarak gösterilmiştir, ancak ikincisi coğrafi olarak daha yaygın görünmektedir (Schwarz ve ark., 2014).

SPİROPLASMOZ HASTALIĞININ TEŞHİSİ

KLİNİK BULGULAR

İşçi arıların etkilendiği *S. apis* infeksiyonunda kovan içerisinde birçok can çekişen ya da ölmüş arı bulunmaktadır ve infekte arıların uçamadıkları yalnızca kovan önünde titreşme hareketi yapabildikleri gözlemlenmiştir (Mouches ve ark., 1984). Karınları sert ve şişkin, bağırsaklar ise sindirilmemiş polen ile doludur. Bireysel olarak arılar ölümlerinde, koloni zamanla kendiliğinden iyileşmektedir (Bailey ve Ball, 1991).

LABORATUVAR TEŞHİSİ

Direkt Mikroskopik ve Etkin İzolasyonu: Diğer bakteriyel bal arısı patojenlerinin aksine *Spiroplasma* spp. ile infekte arıların klinik belirtiler ile tanımlanması imkansızdır (Schwarz ve ark., 2014). İnspektörlerde spiroplazmaları tespit etmek için mevcut teknikler, hemolenf veya yumuşatılmış dokuların kültürüne bağlı olmaktadır (Meeus ve ark., 2012). Spiroplasmalar sindirim sistemi içeriğinde ve hemolenfte karanlık saha mikroskopisi ile kolayca saptanabilirler (Daniels, 1983). Spiroplasmaların kültürasyonu için SP4 agar (Trypton, maya ekstraktı, pepton, karbon kaynağı olarak glukoz, PPLO broth temeli, yeastolate içeren besiyeri) hızlı izolasyon sağlaması açısından önerilmektedir (Whitcomb, 1983).

Moleküler Tanı: Meeus ve ark. (2012) tarafından *S.*

melliferum spiralinin ve *S. apis* rpoB genlerini çoğaltmak için türe özgü primerlere dayalı multipleks PCR tasarlanmış ve bunlar *Spiroplasma* spp.'ye karşı evrensel primerlerle birleştirilerek bakterilerin izolasyonu sonrası her iki türün tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Bu yöntem spiroplasmayı DNA ekstraksiyonuna ihtiyaç duyulmadan kültürlerden ve 3 saat gibi kısa bir sürede tanımlayabilmektedir. Böylelikle hemolenfin doğrudan kültürlenmesi ile DNA ekstraksiyonu adımı ortadan kalktığından daha düşük maliyetli olmaktadır. Schwarz ve ark. (2014) ise *S. melliferum* spiralinin primerleri ve *S. apis* 16S rRNA primerleri kullanılarak yapılan bir qPCR testi ile türe özgü yüksek hassasiyette tespit yapılmasına olanak sağlamışlardır.

SEPTİSEMİ

Hastalığın etkeni *Serratia marcescens*, insanlar ve böcekler de dahil olmak üzere çeşitli hayvanların Gram-negatif fırsatçı bir patojendir. Çoğu hayvanda, *S. marcescens* sadece kan dolaşımında bulunduğu öldürücü olmaktadır (Grimont ve Grimont, 1978). *Serratia* generisi genellikle karakteristik kırmızı veya pembe pigment olan prodigiosin üreten çomaklardır. Ayrıca *S. marcescens*, hastalıklı bal arısı larvalarından da izole edilmiştir (El Sanousi ve ark., 1987). Diğer *Enterobacteriaceae* ile birlikte, arılardaki atipik mikrobiyom bileşiminin bir göstergesi olarak kabul edilen *S. marcescens*, bal arısı bağırsaklarında düşük frekanslarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bal arılarından izole edilmiş *S. marcescens* kz11 suşu tetrasikline yüksek direnç gösterdiğinden tetrasiklin ile tedavi edilen arılarda mortalitenin artmasına neden olduğu gözlemlenmiştir (Raymann ve ark., 2017).

S. marcescens infeksiyonlarının insektlerdeki patogenezi, bakterilerin bitkilerden alınmasını takiben hemosele penetrasyonu ve hemolenfte proliferasyonun ölümcül bir şekilde ortaya çıkmasını içermektedir (Grimont ve Grimont, 2006).

SEPTİSEMİ HASTALIĞININ TEŞHİSİ

KLİNİK BULGULAR

Semptom gösteren işçi arılar ve erkek arıların hareketlerinde azalma ve aktif olan diğer kovan üyelerinden ayrı kaldığı görülmüştür. Aralık ve Ocak aylarında, semptom gösteren işçiler canlılıklarını

sürdüremelerine rağmen iç kapağın üstünde hareketsiz bir şekilde bulunmuşlardır. Ayrıca, semptom gösteren erkek arılar ise sıcak aylarda uçmamışlardır. İnfeksiyona rağmen infekte arıların gardiyanlar ve kovan temizliğinden sorumlu işçiler tarafından zorla uzaklaştırıldığı gözlenmemiştir. Ancak kendilerini serbest bırakarak kovandan ayrılmaları, hastalık bulaşmasını sınırlandırdığı düşünülen hijyenik davranışı desteklemektedir (Burritt ve ark., 2016).

LABORATUVAR TEŞHİSİ

Etken İzolasyonu: Bakterinin kültürasyonu seyreltilmiş hemolenf kültürü steril LB broth'ta seri seyreltmeye tabi tutulduktan sonra LB agar (sodyum klorür, pepton, agar, maya ekstraktı içeren besiyeri) üzerine ekim yapılarak 3 gün boyunca 22°C'de inkübe edilerek yapılabilir (Burritt ve ark., 2016).

Moleküler Tanı (PCR ve PCR Tabanlı Tanı Testleri):

Burritt ve ark. (2016) işçi arıların hemolenfinden izole edilen Gram-negatif bir bakterinin 16S rRNA sekansının yorumlanması ve tam genom dizisi analizi ile yeni bir suş olan *S. marcescens* sicaria suşu (Ss1)'nü tanımlamışlardır. Bu yeni suş daha önce *Serratia* genomlarında bulunmayan 65 gen dahil çeşitli fenotipik ve genotipik farklılıklar göstermiştir. *S. marcescens* Ss1 suşu özellikle kışlak kovanlardaki Varroa akarlarından ve hareketsiz ya da ölü arıların hemolenfinden izole edilmiştir. Raymann ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada *S. marcescens* Ss1'in sadece bal arılarının hemolenfinden bulunduğu virülans sergilediği gözlemlenmiştir. Bu durumda bağırsak izolatlarından farklı virülans ve infeksiyon mekanizmalarına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca *S. marcescens*'in bal arılarının bağışıklık mekanizmalarını indüklediğini ve bu sonuçlara dayanarak etkenin gözden kaçan bir tehdit olduğu gösterilmiştir.

Diğer Tanı Yöntemleri: Son yıllarda kütle spektrometresinde, matris destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyonu (MALDI-MS) profili rutin mikrobiyolojik organizmaların identifikasyonunda gerçek zamanlı klinik teşhiste oldukça kullanışlı bir yöntem olarak uygulanmaktadır. *Apis mellifera*'nın bakteriyel infeksiyonlardaki sağlık durumunu takip etmek ve hemolenfteki önemli moleküler değişiklikleri izlemek için MALDI BeeTyping geliştirilmiştir. Bu yöntemde bal arılarından elde edilen ve yaygın bir patojen olduğu bilinen

S. marcescens suşu kullanılarak deneysel bir model geliştirilmiş ve doğrulanmıştır (Arafah ve ark., 2019).

ÇOKLU TANI İÇİN GELİŞTİRİLEN BAZI YÖNTEMLER

Garrido-Bailón ve ark. (2013) tarafından *P. larvae* ve *M. plutonius*'un 16S rRNA genini ve de *A. apis*'in 5.8S rRNA genini eş zamanlı tanısı için çoklu patojeniteleri tespit edebilen multipleks PCR yöntemi geliştirilmiştir.

Lim ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada hem bakteriyel hem de fungal hastalıkların multipleks tespiti için PCR-chip tabanlı ultra hızlı PCR sistemi geliştirilmiştir. Bal arısının başlıca infeksiyöz patojenleri *P. larvae*, *M. plutonius*, *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus*, *Nosema apis* ve *Nosema ceranae*'yi içeren 6 patojenin tespiti için spesifik primer çiftleri seçilmiştir. Ultra hızlı PCR sistemi ile tek PCR-chip'te sırasıyla *P. larvae* 10³, *M. plutonius* 10³-10², *A. apis* 10², *A. flavus* 10³, *N. ceranae* 10², *N. apis* 10¹'e kadar çoğaltılmış ve minimum çalışma süresi 10 dakika kadar sürmüştür. Lim ve ark. (2017) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise geliştirilen PCR-chip tabanlı ultra hızlı multipleks PCR 'da da aynı etkenlerin tüm PCR saptaması 12 dakika 57 saniye olarak hesaplanmıştır. Standart DNA substratlarının kullanıldığı bu yöntem % 100'e yakın doğruluk göstermiştir. Bu yöntemlerin yalnızca laboratuvarda değil arılıklarda da patojenlerin hızlı bir şekilde tespit edilmesi için uygulanması beklenmektedir.

Dainat ve ark. (2018), *P. larvae*, *M. plutonius* ve bal arısı *Apis mellifera*'nın genomunu aynı anda tespit etmek için ilk DNA tabanlı yöntem olan Tripleks RT-PCR geliştirmişlerdir.

Okamoto ve ark. (2022) ise tek bir reaksiyonda ana yavru çürüklüğü patojen tipleri hem *P. larvae* ERIC I ve II'yi hem de tipik ve atipik *M. plutonius*'u kesin olarak ayırt eden yeni bir multipleks PCR testi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada ilk kez ERIC II tipi *P.larvae* suşları için spesifik hedef dizi seçmişlerdir.

Ehrenberg (2022) tarafından ise iki ana *P. larvae* genotipinin (ERIC I ve ERIC II) dahil olduğu, Amerikan ve Avrupa yavru çürüklükleri etkenleri farelere verilmesiyle spesifik monoklonal antikolar elde edilerek bu etkenlerin tespiti ve ayırımı için tanısallık bir sandviç ELISA ve bir yanallık akış cihazı (Lateral

Flow Device) geliştirilmiştir.

SONUÇ

Bakteriyel arı hastalıklarının teşhisi, geleneksel mikroskopik incelemeler, kültür yöntemleri ve moleküler teknikler gibi çeşitli yöntemler kullanılarak yapılır. Ancak, bu yöntemlerin bazıları koloni içindeki arıların davranışları nedeniyle veya alınan numunelerin laboratuvar koşullarında analiz edilmesinin zorluğu nedeniyle pratikte uygulanabilirliği sınırlı olabilmektedir. Bu nedenle, sahada kullanılabilir hızlı teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi, hastalıkların erken teşhisi ve kontrolü için kritik öneme sahiptir. Sonuç olarak, bal arısı bakteriyel hastalıklarının teşhisinde ve kontrolünde çalışmaların artırılması arı hastalıklarının daha etkili bir şekilde yönetilmesine ve arı kolonilerinin sağlığının korunmasına yardımcı olabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bal arısı bakteriyel hastalıklarının teşhisi konusunda ilginin arttığını göstermektedir. Araştırılan yöntemlerin öncelikle sahada uygulanabilirliği konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Özellikle hijyenik davranış nedeniyle tespit zorlaştığı bu hastalıklarda yeni yöntemlerin geliştirilmesi hastalıkların önlenmesi için yapılacak çalışmalara veri sağlayabilecektir.

KAYNAKÇA

- Adjlane, N., Haddad, N. & Kechih, S. (2014). Comparative study between techniques for the diagnosis of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honeybee colony. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 13, 970-973.
- Applegate, J. R. Jr. & Petritz, O. A. (2020). Common and emerging infectious diseases of honeybees (*Apis mellifera*). *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 23, 285-297.
- Arafah, K., Voisin, S. N., Masson, V., Alaux, C., Le Conte, Y., Bocquet, M. & Bulet, P. (2019). MALDI-MS profiling to address honey bee health status under bacterial challenge through computational modeling. *Proteomics*, 19, 1900268.
- Arai, R., Miyoshi-Akiyama, T., Okumura, K., Morinaga, Y., Wu, M., Sugimura, Y., Yoshiyama, M., Okura, M., Kirikae, T. & Takamatsu, D. (2014). Development of duplex pcr assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76, 491-498.
- Arai, R., Tominaga, K., Wu, M., Okura, M., Ito, K., Okamura, N., Onishi, H., Osaki, M., Sugimura, Y.,

- Yoshiyama, M. & Takamatsu, D. (2012). Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *Plos One*, 7, e33708.
- Arculeo, P., Carpana, E., Di Noto, A. M. & Ferro, A. (2005). *Melissococcus plutonius* isolation from honeybee brood samples with European foulbrood in some Italian regions. Paper presented at the Apimondia 2005, Dublin.
- Bailey, L. (1957). The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*. *Microbiology*, 17, 39-48.
- Bailey, L. & Ball, B. V. (1991). Bacteria. In, L. Bailey & B. V. Ball Eds. Honey Bee Pathology (Second Edition). London: Academic Press; 1991. pp. 35-52.
- Bailey, L. & Collins, M. D. (1982). Reclassification of 'Streptococcus pluton' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *Journal of Applied Bacteriology*, 53, 215-217.
- Bamrick, J. F. (1967). Resistance to American foulbrood in honey bees: VI. Spore germination in larvae of different ages. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9, 30-34.
- Beims, H., Janke, M., Von der Ohe, W. & Steinert, M. (2020). Rapid identification and genotyping of the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae* by combining culturing and multiplex quantitative PCR. *Open Veterinary Journal*, 10, 53-58-53-58.
- Bikaun, J. M., Bates, T., Bollen, M., Flematti, G. R., Melonek, J., Praveen, P. & Grassl, J. (2022). Volatile biomarkers for non-invasive detection of American foulbrood, a threat to honey bee pollination services. *Science of The Total Environment*, 845, 157123.
- Borum, E. (2014). Arıların yavru çürüklüğü infeksiyonlarında doğru teşhis, mücadele ve korunma yöntemleri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 14, 44-55.
- Burritt, N. L., Foss, N. J., Neeno-Eckwall, E. C., Church, J. O., Hilger, A. M., Hildebrand, J. A., Warshauer, D. M., Perna, N. T. & Burritt, J. B. (2016). Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. *Plos One*, 11, e0167752.
- Clark, T. B., Whitcomb, R. F., Tully, J. G., Mouches, C., Saillard, C., Bové, J. M., Wróblewski, H., Carle, P., Rose, D. L., Henegar, R. B. & Williamson, D. L. (1985). *Spiroplasma melliferum*, a new species from the honeybee (*Apis mellifera*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35, 296-308.
- Cremer, S., Armitage, S. A. & Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current Biology*, 17, R693-R702.
- Dainat, B., Grossar, D., Ecoffey, B. & Haldemann, C. (2018). Triplex real-time PCR method for the qualitative detection of European and American foulbrood in honeybee. *Journal of Microbiological Methods*, 146, 61-63.
- Daniels, M. (1983). Mechanisms of *Spiroplasma* pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*, 21, 29-43.
- De Graaf, D. C., Alippi, A. M., Brown, M., Evans, J. D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S. F., Schuch, D. M. T., Titěra, D., Tomkies, V. & Ritter, W. (2006). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 583-590.
- Djordjevic, S. P., Noone, K., Smith, L. & Hornitzky, M. A. Z. (1998). Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research*, 37, 165-174.
- Dobbelaere, W., C. de Graaf, D. & E. Peeters, J. (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, 363-370.
- Ehrenberg, S. (2022). Establishment of an ELISA and a lateral flow device for detection of European and American foulbrood including genotype-differentiation of the American foulbrood causing agent (ERIC I & ERIC II) in honey bees. Greifswald, Germany. Thesis of PhD, UG.
- El Sanousi, S. M., El Sarag, M. S. A. & Mohamed, S. E. (1987). Properties of *Serratia marcescens* isolated from diseased honeybee (*Apis mellifera*) larvae. *Microbiology*, 133, 215-219.

- Erban, T., Ledvinka, O., Kamler, M., Nesvorna, M., Hortova, B., Tyl, J., Titera, D., Markovic, M. & Hubert, J. (2017). Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. *Scientific Reports*, 7, 5084.
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S5-S9.
- Forsgren, E., Budge, G. E., Charrière, J.-D. & Hornitzky, M. A. Z. (2013). Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1-14.
- Forsgren, E. & Laugen, A. T. (2014). Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie*, 45, 10-20.
- Forsgren, E., Locke, B., Sircoulomb, F. & Schäfer, M. O. (2018). Bacterial diseases in honeybees. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 18-25.
- Forsgren, E., Stevanovic, J. & Fries, I. (2008). Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. *Veterinary Microbiology*, 129, 342-349.
- Fünfhaus, A., Ebeling, J. & Genersch, E. (2018). Bacterial pathogens of bees. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 89-96.
- Garrido-Bailón, E., Higes, M., Martínez-Salvador, A., Antúnez, K., Botías, C., Meana, A., Prieto, L. & Martín-Hernández, R. (2013). The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microbial Biotechnology*, 6, 731-739.
- Genersch, E. (2008). *Paenibacillus larvae* and American foulbrood – long since known and still surprising. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3, 429-434.
- Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S10-S19.
- Govan, V. A., Allsopp, M. H. & Davison, S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2243-2245.
- Govan, V. A., Brözel, V., Allsopp, M. H. & Davison, S. (1998). A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1983-1985.
- Grimont, F. & Grimont, P. A. D. (2006). The Genus *Serratia*. In, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt Eds. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. New York, NY: Springer New York; 2006. pp. 219-244.
- Grimont, P. A. & Grimont, F. (1978). The genus *Serratia*. *Annual Reviews in Microbiology*, 32, 221-248.
- Hoage, T. R. & Rothenbuhler, W. C. (1966). Larval honey bee response to various doses of *Bacillus larvae* spores. *Journal of Economic Entomology*, 59, 42-45.
- Hornitzky, M. A. & Smith, L. (1998). Procedures for the culture of *Melissococcus pluton* from diseased brood and bulk honey samples. *Journal of Apicultural Research*, 37, 293-294.
- Ingemar, F. & Scott, C. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, 32, 199-214.
- Kušar, D., Papić, B., Zajc, U., Zdovc, I., Golob, M., Žvokelj, L., Knific, T., Avberšek, J., Očepek, M. & Pislak Očepek, M. (2021). Novel TaqMan PCR assay for the quantification of *Paenibacillus larvae* spores in bee-related samples. *Insects*, 12.
- Lannutti, L., Gonzales, F. N., Dus Santos, M. J., Florin-Christensen, M. & Schnittger, L. (2022). Molecular detection and differentiation of arthropod, fungal, protozoan, bacterial and viral pathogens of honeybees. *Veterinary Sciences*, 9, 221.
- Lauro, F. M., Favaretto, M., Covolo, L., Rassa, M. & Bertoloni, G. (2003). Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 195-201.
- Lee, S., Lim, S., Choi, Y.-S., Lee, M.-I. & Kwon, H. W. (2020). Volatile disease markers of American foulbrood-infected larvae in *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 122, 104040.

- Lim, S.-J., Min, S.-H., Wang, J.-H. & Yoon, B.-S. (2016). The development of ultra-rapid multiplex detection method for 6 species major pathogens of honeybee. Proceedings of the Korean society of apiculture conference, 102-102.
- Lim, S., Kim, J., Lee, C. & Yoon, B. (2017). Development of ultra-rapid multiplex PCR detection against 6 major pathogens in honeybee. *Korean Journal of Apiculture*.
- López-Urbe, M. & Robyn, U. (2022). Honey bee diseases: American foulbrood Retrieved 19.10.2023 <https://extension.psu.edu/honey-bee-diseases-american-foulbrood>.
- Meeus, I., Vercruyse, V. & Smaghe, G. (2012). Molecular detection of *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma melliferum* in bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109, 172-174.
- Mikušová, Z., Farka, Z., Pastucha, M., Poláková, V., Obořilová, R. & Skládal, P. (2019). Amperometric immunosensor for rapid detection of honeybee pathogen *Melissococcus plutonius*. *Electroanalysis*, 31, 1969-1976.
- Milbrath, M. O. G., Fowler, P. D., Abban, S. K., Lopez, D. & Evans, J. D. (2021). Validation of diagnostic methods for European foulbrood on commercial honey bee colonies in the united states. *Journal of Insect Science*, 21, 6.
- Mouches, C., Bové, J. M. & Albisetti, J. (1984). Pathogenicity of *Spiroplasma apis* and other spiroplasmas for honey-bees in Southwestern France. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, 135, 151-155.
- Mouches, C., Bové, J. M., Tully, J. G., Rose, D. L., McCoy, R. E., Carle-Junca, P., Garnier, M. & Saillard, C. (1983). *Spiroplasma apis*, a new species from the honey-bee *Apis mellifera*. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, 134, 383-397.
- Okamoto, M., Furuya, H., Sugimoto, I., Kusumoto, M. & Takamatsu, D. (2022). A novel multiplex PCR assay to detect and distinguish between different types of *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*, and a survey of foulbrood pathogen contamination in Japanese honey. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84, 390-399.
- Pastucha, M., Odstrčilíková, E., Hlaváček, A., Brandmeier, J. C., Vykoukal, V., Weisová, J., Gorris, H. H., Skládal, P. & Farka, Z. (2021). Upconversion-linked immunoassay for the diagnosis of honeybee disease American foulbrood. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 27, 1-11.
- Peters, M., Kilwinski, J., Beringhoff, A., Reckling, D. & Genersch, E. (2006). American foulbrood of the honey bee: Occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 53, 100-104.
- Poláková, V., Pastucha, M., Mikušová, Z., Mickert, M. J., Hlaváček, A., Gorris, H. H., Skládal, P. & Farka, Z. (2019). Click-conjugated photon-upconversion nanoparticles in an immunoassay for honeybee pathogen *Melissococcus plutonius*. *Nanoscale*, 11, 8343-8351.
- Raymann, K., Coon Kerri, L., Shaffer, Z., Salisbury, S. & Moran Nancy, A. (2018). Pathogenicity of *Serratia marcescens* strains in honey bees. *mBio*, 9.
- Raymann, K., Shaffer, Z. & Moran, N. A. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *Plos Biology*, 15, e2001861.
- Regassa, L. B. & Gasparich, G. E. (2006). Spiroplasmas: Evolutionary relationships and biodiversity. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 11, 2983-3002.
- 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. *Emerging Infectious Disease Journal*, 16, 487.
- 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, 362-371.
- Schuch, D. M. T., Madden, R. H. & 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, 59-64.
- Schwarz, R. S., Teixeira, É. W., Tauber, J. P., Birke, J. M.,

- Martins, M. F., Fonseca, I. & Evans, J. D. (2014). Honey bee colonies act as reservoirs for two *Spiroplasma* facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. *Microbiology Open*, 3, 341-355.
- Stahly, D. P., Alippi, A. M., Bakhiet, N., Campana, C. F., Novak, C. C. & Cox, R. (1999). PPL1C, a virulent mutant bacteriophage useful for identification of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74, 295-296.
- Stamereilers, C., Fajardo, C. P., Walker, J. K., Mendez, K. N., Castro-Nallar, E., Grose, J. H., Hope, S. & Tsourkas, P. K. (2018). Genomic analysis of 48 *Paenibacillus larvae* bacteriophages. *Viruses*, 10, 377.
- Thompson, H. M. & Brown, M. A. (2001). Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood? *Bee World*, 82, 130-138.
- Tomkies, V., Flint, J., Johnson, G., Waite, R., Wilkins, S., Danks, C., Watkins, M., Cuthbertson, A. G. S., Carpana, E., Marris, G., Budge, G. & Brown, M. A. (2009). Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. *Apidologie*, 40, 63-72.
- Uygur, Ş. Ö. & Girişgin, A. O. (2008). Bal arısı hastalık ve zararlıları. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 8, 130-142.
- Vita Bee Health (2023a). AFB Diagnostic Test Kit. Retrieved 19.10.2023. <https://www.vita-europe.com/beehealth/products/afb-diagnostic-test-kit/>.
- Vita Bee Health (2023b). EFB Diagnostic Test Kit. Retrieved 25.10.2023. <https://www.vita-europe.com/beehealth/products/efb-diagnostic-test-kit/>.
- Whitcomb R.F. (1983). Culture Media for Spiroplasmos. In, S. Razin, Tully, J.G., Ed. *Methods in Mycoplasma*. New York: Academic Press; 1983. pp. 147-158.
- WOAH (2023a). Chapter 1.3. Diseases, infections and infestations listed by WOA. Retrieved 16.10.2023. https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chaptre_oie_listed_disease.htm.
- WOAH. (2023b). Chapter 3.2.2. American foulbrood of honey bees (Infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*). Retrieved 18.10.2023 https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf
- WOAH. (2023c). Chapter 3.2.3. European foulbrood of honey bees (Infection of honey bees with *Melissococcus plutonius*). Retrieved 24.10.2023 https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.02.03_EUROPEAN_FOULBROOD.pdf
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L. H., & 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, 1612-1620.
- Zheng, H.-Q., & Chen, Y. P. (2014). Detection of *Spiroplasma melliferum* in honey bee colonies in the US. *Journal of invertebrate pathology*, 119, 47-49.