

<https://doi.org/10.61308/ITHF2702>

## Американският гнилец – познат и все още непознат

Йордан Христов

Селскостопанска академия, Институт по животновъдни науки – Костинброд,

Костинброд 2232, България

Corresponding author: yvyh@lycos.com

**Резюме:** Американският гнилец е едно от най-разпространените и смъртоносни заболявания по пчелните семейства. Въпреки че заболяването е познато от векове, все още някои аспекти от него не са изяснени напълно. В настоящата обзорна статия са систематизирани и обобщени знанията относно етиологията, патогенезата, клиничните признаци, профилактиката и контрола на американския гнилец. Също така е обърнато внимание на механизмите на резистентност на пчелите към заболяването. Посочени са и новите научни открития променящи нашето разбиране за това опасно заболяване.

**Ключови думи:** Американски гнилец; *Paenibacillus larvae*; патогенеза; профилактика

## American Foulbrood – well known and still unknown

Yordan Hristov

Agricultural Academy, Institute of Animal Science – Kostinbrod, Kostinbrod 2232, Bulgaria

Corresponding author: yvyh@lycos.com

**Citation:** Hristov, Y. (2024). American Foulbrood – well known and still unknown. *Bulgarian Journal of Animal Husbandry*, 61(1), 31-40. (Bg).

**Abstract:** American Foulbrood is one of the most distributed and deadly diseases of honeybee colonies. Despite being known for centuries some aspects of the disease are still not well understood. In the present review the current knowledge about etiology, pathogenesis, prophylactics and control of American Foulbrood are systemized and generalized. Attention is also drawn to the resistance mechanisms of honeybees to the disease. The new scientific discoveries which are changing our understanding about this dangerous disease are also highlighted.

**Keywords:** American Foulbrood; *Paenibacillus larvae*; pathogenesis; prophylactics

## ВЪВЕДЕНИЕ

Американският гнилец (АГ) е заразно заболяване на запечатаното пило. Разпространено е на всички континенти без Антарктида. В същото време е едно от най-смъртоносните за пчелите като ежегодно предизвиква значителни загуби на пчелни семейства (Hansen and Brødsgaard, 1999; De Graaf et al., 2006a). Болните от АГ пчелни семейства обикнове-

но загиват като заболяването може да ликвидира всички семейства в пчелина, а ако не се вземат мерки – и в целия регион. Поради тези причини АГ е включен в листата на наблюдаваните заболявания по пчелите от Световната организация за здравето на животните в Париж (бивше Бюро по епизоотии) (ОИЕ, 2023). В България първите официални сведения за АГ датират от 1904 година когато в Закона за пчеларството се засяга въпросът за болестта

„гнилец“. Без съмнение обаче заболяването е присъствало много преди това. През 1905 година в България вече са унищожени 21 пчелни семейства болни от „гнилец“. В условията на нашата страна АГ се проявява най-често през втората половина на лятото (юли-август), но болестта може да се прояви по всяко време когато в пчелните семейства се отглежда пило (Bailey and Ball, 1991; Genersch, 2008; 2010).

### Етиология и патогенеза

Американският гнилец се причинява от Грам-положителен спорообразуващ микроорганизъм - *Paenibacillus larvae* изолиран през 1906 година от White (1906). Трябва да се отбележи, че след откриването му досега етиологичният агент на АГ е прекласифициран няколко пъти под различни имена. Първоначално причинителят на АГ е наименуван *Bacillus larvae* (White, 1906) и като негов близък роднина е определен *Bacillus pulvifaciens* (Katznelson, 1950). По-късно тези два бактериални вида са преименувани съответно на *Paenibacillus larvae* и *Paenibacillus pulvifaciens* (Ash et al., 1991; 1993). След това, тези два вида са прекласифицирани като подвидове на вида *Paenibacillus larvae* като са им дадени имена съответно *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* и *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* (Heyndrickx et al., 1996). Последното прекласифициране премахна подвидовото разделение и двата подвида бяха обединени под общото име *Paenibacillus larvae* (Genersch et al., 2006). При ДНК изследвания на палиндромни последователности в бактериалната ДНК (rep-PCR) бяха открити пет различни генотипа при вида *Paenibacillus larvae*. Тези генотипове бяха наименувани ERIC I-V (Genersch et al., 2006; Beims et al., 2020). Изясни се, че бившият подвид *P. l. larvae* отговаря на генотипове ERIC I и ERIC II, докато бившият подвид *P. l. pulvifaciens* отговаря на генотипове ERIC III, ERIC IV и ERIC V (Genersch et al., 2006; Genersch, 2010; Beims et al., 2020).

Причинителят на АГ се среща в две форми: вегетативна форма (активно размножава-

ща се пръчица) и спорова форма (спора). При това, само спорите са инфекциозни (Ebeling et al., 2016). Заразяват се изключително пчелните ларви (Bailey and Ball, 1991; Genersch, 2010). При това, ларвите на възраст до 36 часа са най-чувствителни към заболяването (Genersch et al., 2005). Приблизително 12 часа след заразяването спорите герминират (покълнват) в средното черво на ларвите и вегетативните клетки пролиферират (Yue et al., 2008). Впоследствие бактерията разрушава перитрофичната мембрана защитаваща чревните клетки (Garcia-Gonzalez and Genersch, 2013). След разрушаването на мембраната *P. larvae* прониква през чревния епителен слой и навлиза в хемоцела (ларвната телесна кухня) убивайки при този процес ларвата (Yue et al., 2008). Развитие на болестния процес продължава няколко дни, като най-често ларвите умират малко преди или след запечатването на килийката (на стадий предкакавида или какавида). Трябва да се отбележи, че петте генотипа на *P. larvae* варират по отношение вирулентността си към пчелните ларви. Така например, ларви заразени с генотип ERIC II умират за 7 дни (а при генотипове ERIC III-V само за 3 дни), докато ларвите заразени с генотип ERIC I умират в продължение на 12 дни (Genersch et al., 2005; 2006; Beims et al., 2020). Тези разлики са важни, защото при генотипове ERIC II-V по-голямата част от ларвите умират преди запечатването, вследствие на което пчелите-чистачки по-лесно и ефективно изхвърлят труповете им извън кошера преди да се образуват инфекциозни спори. Налице е обратнопропорционална зависимост между вирулентността на ниво ларва и вирулентността по отношение на пчелното семейство, при която бързо убиващите ларви генотипове ERIC II-V са по-слабо вирулентни за семействата, а бавно убиващият ларвите генотип ERIC I е по-силно вирулентен за пчелните семейства (Rauch et al., 2009). Важно е да се знае, че теренни щамове принадлежащи към генотипове ERIC III и IV не са изолирани в света в последните десетилетия, а ERIC V беше установен наскоро в Испания в проби

от мед (Veims et al., 2020). Понастоящем не е ясно дали генотип ERIC V предизвиква клинично заболяване на пчелните семейства. От клинична гледна точка, най-голямо значение имат генотипове ERIC I и ERIC II. Тези два генотипа са изолирани в много европейски страни; теренни щамове *P. larvae* принадлежащи към генотипове ERIC I и ERIC II са установени и в България (Rusenova et al., 2013).

### Клинични признаци и ход на болестта

В телата на мъртвите ларви причинителят на АГ продължава да се размножава и спорулира, като резултат ларвното тяло покафеня-

ва и се превръща в полутечна маса с лепкава консистенция и специфична миризма на туткал (точещ се стадий) (Bailey and Ball, 1991; Genersch, 2008; 2010; OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.2.2., 2023). В продължение на около месец след това ларвните останки изсъхват и се превръщат в черни корички здраво прикрепени към стените и дъното на килийките (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.2.2., 2023). Ларвите в точещия се стадий представляват най-важният клиничен (патогномичен) признак за АГ – при потапяне на кибритена клеч-



Фигура 1. Тест с кибритена клечка (оригинал)

Figure 1. Matchstick test (original)



ка в ларвната маса и внимателното ѝ издърпване ларвната маса се източва под формата на нишка. Това се нарича тест с кибритена клечка и е една от най-известните техники за теренно диагностициране на АГ (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.2.2., 2023) (Фиг. 1). Другият типичен признак на АГ е вида на восъчните капачета на килийките: капачетата съдържащи умрели от АГ ларви са тъмни, хлътнали и с дупчици (продрани) (De Graaf et al., 2006a,b). В допълнение, има и смъртност на младите ларви в незапечатаното пило, но това е по-трудно забележимо. Независимо че тези млади ларви не показват видими признаци на заболяване пчелите-чистачки обикновено ги изхвърлят, оставяйки празни килийки на мястото им (Brødsgaard et al., 2000). В болните от АГ пчелни семейства пилото придобива нехомогенен вид поради наличието едно до друго на здраво запечатано пило, незапечатани килийки съдържащи остатъци от умрели ларви, както и на празни килийки – това е така нареченото прошарено пило (De Graaf et al., 2006a,b). Счита се, че когато в едно пчелно семейство има повече от 100 килийки съдържащи умрели от АГ ларви, то това семейство няма да може да противостои на заболяването и ще загине (Woodrow and States, 1943). При прогресиране на заболяването в семейството броят на коричките съдържащи остатъци от умрели ларви постепенно се увеличава и цялото пило става прошарено. Броят на младите пчели драстично намалява и заразеното от АГ семейство загива.

От заразяването на семейството до появата на първите умрели ларви минават 10-15 дни, но на практика откриването на болестта в пчелното семейство става по-късно, тъй като отначало умират малко ларви и хода на болестта е бавен. В зависимост от външните условия (климат, сезон, наличие на паша) и устойчивостта на пчелното семейство (добро хигиенно поведение) времето от заразяването на първите ларви до откриването на клинични признаци може да бъде няколко месеца. Върху хода на развитието на болестта влияе

и генотипа на *P. larvae* – поради по-големият процент ларви умиращи преди запечатване при генотип ERIC II при него заболяването в семейството се развива по-бавно отколкото ако е причинено от генотип ERIC I.

### Епизоотология на заболяването

Американският гнилец е силно заразно заболяване. Когато бактерията спорулира само в трупа на една ларва се образуват над 1 млрд. спори (Genersch, 2010). Вегетативната форма на *P. larvae* е слабо устойчива на действието на различни физични фактори и дезинфектанти, но това което прави борбата срещу американския гнилец много трудна е изключителната устойчивост на споровата форма на причинителя – в изсъхнали остатъци от пчелни ларви спорите остават жизнеспособни повече от 35 години (Shimanuki, 1997; Hansen and Brødsgaard, 1999). Коричките от умрели ларви са силно инфекциозни и могат да пренесат заболяването както вътре в семейството, така и между пчелните семейства. Заразяването на пчелните ларви става чрез храната която приемат от пчелите. Пчелните ларви също така се заразяват при заемане на килийка, в която преди това е имало ларва загинала от АГ (Bailey and Ball, 1991). Това е хоризонтално пренасяне на заболяването на индивидуално ниво (между пчелите и ларвите в семейството). От кошер в кошер и от пчелин в пчелин заболяването се разпространява хоризонтално чрез пчелите – при пчелни кражби (Lindstrom et al., 2008) и налитане на пчели в чужди семейства (Goodwin et al., 1994). Хоризонтално пренасяне на АГ се осъществява и чрез пренасяне спорите на бацила в здравите семейства посредством използваните инструменти или чрез размяна на пити с пило или мед (Hornitzky, 1998). Доскоро АГ бе смятан за заболяване, което се пренася само хоризонтално (Fries and Camazine, 2001). По-новите проучвания (Fries et al., 2006) обаче показват, че американският гнилец не се предава само хоризонтално, но също и вертикално посредством бягството на заразените семейства от гнездата им. Бягството на пчелите от

заразеното с АГ семейство се разглежда като механизъм на резистентността към АГ, тъй като при този процес се намалява общото количество спори в новозаселеното семейство. Данните за вертикалното предаване на АГ обаче недвусмислено показват, че когато общата обсемененост със спори на семейството е висока този механизъм на резистентност не успява да предотврати повторното проявяване на заболяването в семейството заселило се на новото място (Fries et al., 2006). На големи разстояния (между райони и държави) АГ се разпространява чрез подвижното пчеларство, а също и чрез глобалната търговия с пчели и пчелни продукти (Fries and Camazine, 2001).

### Механизми на резистентност на пчелите към заболяването

Когато се говори за резистентността на пчелите към АГ трябва да се отбележи, че пчелите са социални насекоми и живеят в големи общества (пчелни семейства). Поради тази причина, пчелите имат механизми на резистентност както на индивидуално ниво, така и като пчелно семейство. На индивидуално ниво, подобно на останалите насекоми, пчелите притежават целуларни и хуморални механизми срещу патогените наред с други физиологични механизми (Lavigne and Strand, 2002; Cerenius and Soderhall, 2004; Evans et al., 2006; Schmid et al., 2008; Wilson-Rich et al., 2008). Тъй като пчелите, наред с останалите насекоми, не притежават антитета, то дълго време се смяташе, че пчелите притежават само вродени, неспецифични механизми на резистентност към патогените включително и към АГ (Hoffmann and Reichhart, 2006). Други изследвания обаче показаха, че работнички на земните пчели (*Bombus terrestris*) демонстрират специфичност след повторно заразяване с АГ, която специфичност не може да бъде обяснена с неспецифичните вродени механизми (Sadd and Schmid-Hempel, 2006). По подобен начин, когато пчелни майки бъдат заразени със спори на АГ те създават поколение (пчелни ларви), което се характеризира с повишена резистентност към АГ (Hernandez-

Lopez et al., 2014). Механизмът на това прехвърляне на имунитет от пчелната майка към пчелните ларви беше обяснен по-късно, когато беше идентифициран белтъка вителогенин като носител на имунните сигнали от хемолимфата на майката към нейните яйца (и респективно нейните ларви) (Salmela et al., 2015).

Освен механизмите на индивидуална резистентност пчелите имат механизми на резистентност и на ниво пчелно семейство, която се осъществява посредством редица физиологични и поведенчески механизми. Така например, антимицробната активност на меда, нектара и пчелния пращец е важен фактор инхибиращ развитието на много бактерии (Molan, 1992; Mandal and Mandal, 2011, Abouda et al., 2011; Morais et al., 2011). Някои от компонентите на пчелното млечице имат бактериостатичен и бактерициден ефект към голям диапазон от бактериални видове (Garcia et al., 2013). Тези компоненти изглежда играят роля и в резистентността към АГ (Bíliková et al., 2001). Прополисът, с който пчелите полират килийките и всички вътрешни повърхности на гнездото, играе важна роля поради антимицробните си свойства (Vorba and Spivak, 2017; Turcatto et al., 2018). Някои негови съставки показват активност срещу *P. larvae* (Antúnez et al. 2008; Bastos et al. 2008; Bíliková et al., 2013; Boonsai et al., 2014; Wilson et al., 2015). Друг механизъм на резистентност на ниво пчелно семейство е намаляването или премахването на спорите на *P. larvae* от храната на ларвите посредством действието на клапата на медовото стомахче при възрастните пчели (Sturtevant and Revell, 1953). Много важен поведенчески механизъм на резистентност към АГ е хигиенното поведение на пчелните семейства изразяващо се в своевременно откриване на болните и умрели ларви от пчелите работнички и изхвърлянето на тези ларви извън пчелните семейства. Чрез изхвърлянето на мъртвите и заразени ларви пчелните семейства се предпазват от бактериални и гъбични инфекции чрез намаляване на инфекциозното начало (Spivak and Gilliam 1998a,b; Spivak and Reuter, 2001). Хигиенното

поведение играе голяма роля за резистентността към американския гнилец като пчелните семейства с по-добре проявено хигиенно поведение са по-устойчиви на заболяването (Spivak and Reuter, 2001). Друг поведенчески механизъм е напускането на пчелното гнездо от пчелите когато в семейството има висока обсемененост със спори. По този начин пчелите намаляват количеството спори в новосформираното семейство (Fries and Raina, 2003).

### Диагностика, профилактика и борба

Теренната диагностика на АГ се основава на характерните клинични признаци на заболяването - източването на нишка от килийките със запечатано пило (тест с кибритена клечка), хлътването на капачетата на килийките, специфичната миризма, както и наглед здравото открито пило. Трябва да се посочи, че когато заболяването е в начална фаза тези признаци може да са слабо проявени или дори да липсват. За теренна диагностика на АГ може да се използват и готовите ELISA китове с моноклонални антители, които се предлагат и в България. Важно е да се отбележи, че в нашата страна за диагностициране на АГ задължително се прави лабораторно изследване посредством методите посочени в Наръчника на Световната организация за здравето на животните (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.2.2., 2023). За лабораторно изследване се вземат проби от запечатано пило: парче пита с размери 10/15 см изрязано от участъка в питата, където промените в пилото са най-силно изразени.

Съгласно Наредба 11 от 2 април 2015 година за профилактика, ограничаване и ликвидиране на някои заразни болести по пчелите, както и съгласно Програмата за надзор и контрол на някои болести по пчелите в Р. България през 2022-2024 година профилактиката срещу гнилцовите заболявания у нас предвижда прегледи на пчелните семейства през пролетта и есента. След лабораторното потвърждаване на диагнозата АГ участъковият

лекар пристъпва към унищожаване на болните пчелни семейства, на тяхното пило и мед, а заразеният пчелин се поставя под карантина. Собствениците се обезщетяват по съответния ред от държавата, ако пчелните им семейства са регистрирани и не са застраховани.

Понастоящем в света не съществува ефективно средство или метод за лечение на АГ. Това се дължи основно на образуването на огромно количество устойчиви и дълго живеещи спори на причинителя в болните семейства (Genersch, 2010). Поради тази причина, в много държави включително и България (съгласно Наредба 11 и Програма за надзор и контрол на някои болести по пчелите в Р. България 2022-2024 година) засегнатите от АГ пчелни семейства се унищожават чрез изгаряне, което е признато за единствената ефективна мярка срещу заболяването (Waite et al., 2003; de Graaf et al., 2006a; Genersch, 2008; 2010). Лекуването на болните от АГ семейства с антибиотици има частичен ефект, тъй като антибиотиците само подтискат клиничните признаци, но не унищожават спорите на *P. larvae* (Pettis and Feldlaufer, 2005; Genersch, 2010; Reybroeck et al., 2012). Освен това причинителя развива резистентност срещу широко използваните антибиотици като антибиотикорезистентните щамове *P. larvae* се разпространява повсеместно (Miyagi et al., 2000; Mussen, 2000; Piccini and Zunino, 2001; Evans, 2003; Lodesani and Costa, 2005). В България (съгласно Закон за пчеларството, чл. 24) е в сила забрана за използване на антибиотиците и сулфонамидите в пчеларството. Друг метод за контрол на АГ е така нареченият метод на изкуствения рой (прехвърляне на пчелите от болното семейство в друг дезинфекциран кошер върху нови рамки с основи). Този метод се прилага в някои страни (Германия, САЩ), но е ненадежден, тъй като води до рецидиви на АГ в новосформираните семейства (Hornitzky and White, 2001). Друга възможна алтернатива за профилактика и лечение на АГ е използването на специфични бактериофаги или техни ендозини срещу *P. larvae*. Трябва да се отбележи, че бактериофагите и ли-

зините също както антибиотиците действат само срещу вегетативната форма на причинителя, а не срещу спорите. Независимо от това, някои автори препоръчват използването на бактериофаги или ендолизини вместо антибиотици, тъй като бактериофагите и лизините за разлика от антибиотиците не влияят на нормалната чревна микрофлора и не оказват вредни ефекти върху пчелните ларви и пчелите (Beims et al., 2015; Ghorbani-Nezami et al., 2015; Le Blanc et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Brady et al., 2017). Данните за клиничната ефективност на бактериофагите и ендолизините срещу АГ обаче са противоречиви. Така например, изследването на Beims et al. (2015) демонстрира добра ефективност на даден бактериофаг срещу *P. larvae* ин витро, но почти никакъв ефект срещу АГ при опити ин vivo със заразени ларви. Други автори демонстрират добър профилактичен и предпазващ ефект при третиране на пчелни ларви (Ghorbani-Nezami et al., 2015; Yost et al., 2016) или пчелни семейства (Brady et al., 2017) с дадени бактериофаги или коктейли от фаги и последващо заразяване с АГ. При това, според Yost et al. (2016) предпазващият ефект на фагите е по-висок от терапевтичния при лечение. Единствено Le Blanc et al. (2015) виждат терапевтичен потенциал в използване на фагови ендолизини (75% намаляване смъртността на пчелни ларви след заразяване с АГ). Всичко това навежда на мисълта, че бактериофаги или техни ендолизини биха били по-подходящи за профилактика (недопускане заболяване на пчелните семейства), отколкото за лечение на АГ. Друга теоретична възможност за борба срещу АГ е използването на специфични за пчелите млечнокисели бактерии, нормално намиращи се в чревния тракт. Наистина, някои от тези бактерии показват добра активност срещу *P. larvae* ин витро (Forsgren et al., 2010; Lamei et al., 2019), но за съжаление нямат никаква ефективност срещу АГ при теренни опити (Stephan et al., 2019). Надежда за пробив в борбата срещу АГ даде разработването на инактивирана ваксина срещу заболяването прилагаща се чрез храната, основаваща се

на откритието, че ваксинираната с *P. larvae* пчелна майка прехвърля имунитета си върху нейните ларви (Hernandez-Lopez et al., 2014; Salmela et al., 2015). За съжаление, последните изследвания ин vivo върху пчелни ларви показаха, че такова ваксиниране има слаб до среден ефект (20 до 50% намалена смъртност на ларвите след заразяване със спори на АГ) (Dickel et al., 2022). Независимо от тези незадоволителни резултати, Министерството на земеделието на САЩ (USDA) издаде двугодишен пробен лиценз на компанията Dalan Animal Health за производство и продажба на ваксина срещу АГ съдържаща убити клетки на *P. larvae*, която се прилага чрез храната (USDA Licenses Honeybee Vaccine to Dalan Animal Health, 2023). Компанията е обявила, че има намерение през 2023 година ваксината срещу АГ да е достъпна за покупка в САЩ. Въпреки скорошното излизане на пазара на ваксината срещу АГ, основния акцент при борбата срещу АГ остават мероприятията за профилактика и контрол върху разпространението на заболяването. Трябва да се отбележи, че профилактиката на АГ освен карантинните и хигиенни мероприятия включва и селекция на пчели с високо хигиенно поведение (Palacio et al., 2000; Spivak and Reuter, 2001).

Въпреки че американският гнилец е изучаван повече от сто години, все още някои аспекти на заболяването остават недостатъчно изяснени. Необходими са нови изследвания относно патогенезата и факторите влияещи върху протичането на АГ. Необходимо е също така да се разработят нови средства и методи за борба.

### **Конфликт на интереси**

Авторът декларира, че няма конфликт на интереси по отношение на настоящата статия.

### **ЛИТЕРАТУРА**

Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faid, M. & Ahami, M. T. (2011). The Antibacterial Activity of Moroccan



- Bee Bread and Bee-Pollen (Fresh and Dried) against Pathogenic Bacteria. *Res. J. Microbiol.*, 6, 376–384.
- Antúnez, K., Harriet, J., Gende, L. B., Maggi, M. D., Eguaras, M. J. & Zunino, P.** (2008). Efficacy of natural propolis extract in the control of American foulbrood. *Vet. Microbiol.*, 131(3–4), 324–331.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. & Collins, M. D.** (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13, 202–206.
- 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. *Anton. Leeuw.*, 64, 253–260.
- Bailey, L. & Ball, B. V.** (1991). *Honey bee pathology*. Academic Press, New York, London.
- Bastos, E. M. A. F., Simone, M., Jorge, D. M., Soares, A. E. E. & Spivak, M.** (2008). In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 97(3), 273–281.
- Beims, H., Wittmann, J., Bunk, B., Spröer, C., Rohde, C., Günther, G., Rohde, M., von der Ohe, W. & Steinert, M.** (2015). *Paenibacillus* larvae-Directed Bacteriophage HB10c2 and Its Application in American Foulbrood-Affected Honey Bee Larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(16), 5411–5419.
- Beims, H., Bunk, B., Erler, S., Mohr, K. I., 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 ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American foulbrood. *Int J Med Microbiol.*, 310(2), 151394.
- Bíliková, K., Wu, G. & Šimúth, J.** (2001). Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie*, 32(3), 275–283.
- Bíliková, K., Popova, M., Trusheva, B. & Bankova, V.** (2013). New anti-*Paenibacillus* larvae substances purified from propolis. *Apidologie*, 44(3), 278–285.
- Boonsai, P., Phuwapraisirisan, P. & Chanchao, C.** (2014). Antibacterial activity of a cardanol from Thai *Apis mellifera* propolis. *Int. J. Med. Sci.*, 11(4), 327–336.
- Borba, R. S. & Spivak, M.** (2017). Propolis envelope in *Apis mellifera* colonies supports honey bees against the pathogen, *Paenibacillus* larvae. *Sci. Rep.*, 7, 11429.
- Brady, T. S., Merrill, B. D., Hilton, J. A., Payne, A. M., Stephenson, M. B. & Hope, S.** (2017). Bacteriophages as an alternative to conventional antibiotic use for the prevention or treatment of *Paenibacillus* larvae in honeybee hives. *J. Invertebr. Pathol.*, 150, 94–100.
- Brødsgaard, C. J., Hansen, H. & Ritter, W.** (2000). Progress of *Paenibacillus* larvae infection in individually inoculated honey bee larvae reared single in vitro, in micro colonies, or in full-size colonies. *J. Apic. Res.*, 39, 19–27.
- Cerenius, L. & Soderhall, K.** (2004). The prophenolox- idase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.*, 198, 116–26.
- 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., Titera, D., Tomkies, V. & Ritter, W.** (2006a). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical methods. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 583–590.
- De Graaf, D. C., De Vos, P., Heyndrickx, M., Van Trap- pen, S., Peiren, N. & Jacobs, F. J.** (2006b). Identifica- tion of *Paenibacillus* larvae to the subspecies level: An obstacle for AFB diagnosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 91, 115–123.
- Dickel, F., Bos, N. M. P., Hughes, H., Martín-Hernán- dez, R., Higes, M., Kleiser, A. & Freitak, D.** (2022). The oral vaccination with *Paenibacillus* larvae bacterin can decrease susceptibility to American Foulbrood infection in honey bees—A safety and efficacy study. *Front Vet Sci.*, 9, 946237.
- Ebeling, J., Knispel, H., Hertlein, G., Fünfhaus, A. & Genersch, E.** (2016). Biology of *Paenibacillus* larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 7387–7395.
- Evans, J. D.** (2003). Diverse origins of tetracycline resis- tance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacil- lus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 83, 46–50.
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z. & Hultmark, D.** (2006). Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15, 645–656.
- Forsgren, E., Olofsson, T. C., Vásquez, A. & Fries, I.** (2010). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacil- lus* larvae in honey bee larvae. *Apidologie*, 41, 99–108.
- Fries, I. & Camazine, S.** (2001). Implications of horizon- tal and vertical pathogen transmission for honeybee epidemiology. *Apidologie*, 32, 199–214.
- Fries, I. & Raina, S.** (2003). American Foulbrood and African honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 96, 1641–1646.
- Fries, I., Lindstrom, A. & Korpela, S.** (2006). Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus* larvae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Vet. Microbiol.*, 114, 269–274.
- Garcia, M. C., Finola, M. S. & Marioli, J. M.** (2013). Bioassay Directed Identification of Royal Jelly's Active Compounds against the Growth of Bacteria Capable of Infecting Cutaneous Wounds. *Adv. Microbiol.*, 3(2), 138–144.
- Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E.** (2013). Peritrophic matrix degradation through *P. larvae*. *Environ. Micro- biol.*, 15, 2894–2901.



- Genersch, E.** (2008). Paenibacillus larvae and American Foulbrood – long since known and still surprising. *J. Verbr. Lebensm.*, 3, 429–434.
- Genersch, E.** (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 103, 10–19.
- Genersch, E., Ashiralieva, A. & Fries, I.** (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. larvae, the causative agent of American foulbrood disease in honey bees. *Appl. Environ. Microb.*, 71, 7551–7555.
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J. & Fries, I.** (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. pulvificiens and *Paenibacillus larvae* subsp. larvae as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 56, 501–511.
- Ghorbani-Nezami, S., LeBlanc, L., Yost, D. G. & Amy, P. S.** (2015). Phage therapy is effective in protecting Honeybee Larvae from American Foulbrood disease. *J. Insect Sci.*, 15, 84.
- Goodwin, R. M., Perry, J. H. & Ten-Houten, A.** (1994). The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. *J. Apic. Res.*, 33, 209–212.
- Hansen, H. & Brødsgaard, C. J.** (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, 80, 5–23.
- Hernandez-Lopez, J., Schuehly, W., Crailsheim, K. & Riessberger-Galle, U.** (2014). Trans-generational immune priming in honeybees. *Proc. R. Soc. B*, 281, 20140454.
- 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*) pulvificiens (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later 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. pulvificiens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 270–279.
- Hoffmann, J. A. & Reichhart, J. M.** (2006). Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*, 3, 121–126.
- Hornitzky, M. A. Z.** (1998). The spread of *Paenibacillus larvae* subsp. larvae infections in an apiary. *J. Apic. Res.*, 37, 261–265.
- Hornitzky, M. A. Z. & White, B.** (2001). *Controlling American foulbrood: assessing effectiveness of shaking bees and antibiotic therapy strategies: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation*. RIRDC publication No. 01/048.
- Katznelson, H.** (1950). *Bacillus pulvificiens* (n. Sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *J. Bacteriol.*, 59, 153–155.
- Lamei, S., Stephan, J. G., Riesbeck, K., Vasquez, A., Olofsson, T., Nilson, B., de Miranda, J. R. & Forsgren, E.** (2019). The secretome of honeybee-specific lactic acid bacteria inhibits *Paenibacillus larvae* growth. *J. Apic. Res.*, 58, 405–412.
- Lavine, M. & Strand, M.** (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol.*, 32, 1295–1309.
- Le Blanc, L., Nezami, S., Yost, D., Tsourkas, P. & Amy, P. S.** (2015). Isolation and characterization of a novel phage lysin active against *Paenibacillus larvae*, a honeybee pathogen. *Bacteriophage*, 5(4), e1080787.
- Lindstrom, A., Korpela, S. & Fries, I.** (2008). Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie*, 39, 1–8.
- Lodesani, M., Costa, M.** (2005). Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. *Bee World*, 86, 102–109.
- Mandal M. D. & Mandal, S.** (2011). Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine*, 1, 154–160.
- Miyagi, T., Peng, C. Y. S., Chuang, R. Y., Mussen, E. C., Spivak, M. S. & Doi, R. H.** (2000). Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J. Invertebr. Pathol.*, 75, 95–96.
- Molan, P.C.** (1992). The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73, 5–28.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X. & Estevinho, L. M.** (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.*, 49, 1096–1101.
- Mussen, E. C.** (2000). Antibiotic-resistant American foulbrood. *Am. Bee J.*, 140, 300–301.
- OIE** (2023). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2023 (Chapter Bee diseases, infections and infestations). OIE; Paris, France.
- OIE** (2023). Chapter 3.2.2. American foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*). In OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2023. OIE; Paris, France.
- Oliveira, A., Leite, M., Kluskens, L. D., Santos, S. B., Melo, L. D. R. & Azeredo, J.** (2015). The first *Paenibacillus larvae* bacteriophage endolysin (PlyPI23) with high potential to control American Foulbrood. *PLoS One*, 10, e0132095.
- Palacio, M. A., Figini, E. E., Ruffinengo, S. R., Rodriguez, E. M., Hoyo, M. L. & Bedascarrasbure, E. L.** (2000). Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie*, 31, 471–478.

- Pettis, J. S. & Feldlaufer, M. F.** (2005). Efficacy of lincomycin and tylosin in controlling American foulbrood in honey bee colonies. *J. Apic. Res.*, 44, 106–108.
- Piccini, C. & Zunino, P.** (2001). American foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *J. Invertebr. Pathol.*, 78, 176–177.
- Rauch, S., Ashiralieva, A., Hedtke, K. & Genersch, E.** (2009). Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *Appl. Environ. Microb.*, 75, 3344–3347.
- Reybroeck, W., Daeseleire, E., De Brabander, H. F. & Herman, L.** (2012). Antimicrobials in beekeeping. *Vet. Microbiol.*, 158, 1–11.
- Ruseno, N., Parvanov, P. & Stanilova, S.** (2013). Molecular typing of *Paenibacillus larvae* strains isolated from Bulgarian apiaries based on repetitive element polymerase chain reaction (Rep-PCR). *Curr. Microbiol.*, 66, 573–577.
- Sadd, B. M. & Schmid-Hempel, P.** (2006). Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr. Biol.*, 16, 1206–1210.
- Salmela, H., Amdam, G. V. & Freitak, D.** (2015). Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLoS Pathog.*, 11(7), e1005015.
- Schmid, M. R., Brockmann, A., Pirk, C. W. W., Stanley, D. W. & Tautz, J.** (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J. Insect Physiol.*, 54, 439–444.
- Shimanuki, H.** (1997). Bacteria. In: *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases* (Morse R. A., Flottum K., eds). A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA, 35–54.
- Spivak, M. & Gilliam, M.** (1998a). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part I. Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee World*, 79, 124–134.
- Spivak, M. & Gilliam, M.** (1998b). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee World*, 79, 169–186.
- Spivak, M. S. & Reuter, G. S.** (2001). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behaviour. *Apidologie*, 32, 555–565.
- Stephan, J. G., Lamei, S., Pettis, J. S., Riesbeck, K., de Miranda, J. R. & Forsgren, E.** (2019). Honeybee-specific lactic acid bacterium supplements have no effect on American foulbrood-infected honeybee colonies. *Appl. Environ. Microb.*, 85(13), e00606-19.
- Sturtevant, A. P. & Revell, I. L.** (1953). Reduction of *Bacillus larvae* spores in liquid food of honey bees by action of the honey stopper, and its relation to the development of American foulbrood. *J. Econ. Entomol.*, 46, 855–860.
- Turcatto, A. P., Lourenco, A. P. & De Jong, D.** (2018). Propolis consumption ramps up the immune response in honey bees infected with bacteria. *Apidologie*, 49(3), 287–296.
- White, G. F.** (1906). The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. USDA, Bureau of Entomology, Technical Series. 14, 1–50.
- Waite, R., Brown, M., Thompson, H. & Bew, M.** (2003). Control of American foulbrood by eradication of infected colonies. *Apiacta*, 38, 134–136.
- Wilson-Rich, N., Dres, S. T. & Starks, P. T.** (2008). The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, 54, 1392–1399.
- Wilson, M. B., Brinkman, D., Spivak, M., Gardner, G., Cohen, J. D.** (2015). Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 124, 44–50.
- Woodrow, A. W. & States, H. J.** (1943). Removal of diseased brood in colonies infected with AFB. *Am. Bee J.*, 81, 22–26.
- Yost, D. G., Tsourkas, P., Amy, P. S.** (2016). Experimental bacteriophage treatment of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood disease. *Bacteriophage*, 6, e1122698.
- 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*). *Environ. Microbiol.*, 10, 1612–1620.
- USDA Licenses Honeybee Vaccine to Dalan Animal Health.** (2023). *Highlights/Fed Lab News* <https://federalallabs.org/fhc-highlights/federal-lab-news/usda-licenses-honeybee-vaccine-to-dalan-animal-health>.

Received: December, 04, 2023; Approved: December, 06, 2023; Published: February, 2024