



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2023; 37 (3): 245 - 250
http://www.fusabil.org

Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesindeki Bal Arılarında ve Temel Petekte Amerikan Yavru Çürüklüğünün Teşisi

Rahşan AKPINAR^{1, a}
Arif BOZDEVECİ^{2, b}
Semanur ÇELİK^{1, c}

¹ Samsun Veteriner Kontrol
Enstitüsü,
Arı Hastalıkları
Laboratuvarı,
Samsun, TÜRKİYE

² Recep Tayyip Erdoğan
Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü
Rize, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0003-0075-9247

^b ORCID: 0000-0002-0729-9143

^c ORCID: 0000-0001-5657-1273

Arıcılık, bal arılarının (*Apis mellifera* L.), bitkisel kaynakları kullanarak bal, polen, propolis, arı sütü gibi çeşitli ürünleri elde edebildiği bir yetiştiricilik faaliyetidir. Arılar, doğadaki bitki tozlaşmasındaki rolleri ve arı ürünlerinin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle hayati öneme sahip canlılardır. Arıcılıktaki en önemli problemlerin başında arı hastalıkları ve zararlıları gelmektedir. Bu hastalıklardan biri olan Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB), bal arısı larvalarının ölümüne neden olan çok tehlikeli ve oldukça bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalığın etkeni olan *Paenibacillus larvae*, Gram-pozitif bir bakteri olup vejetatif ve spor formu olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Bu çalışmada 2020-2023 yılları arasında Orta ve Doğu Karadeniz bölgelerindeki arıcılık işletmelerinden alınan 207 örnekte AFB varlığı araştırıldı. Örneklerde AFB'ye neden olan *P. larvae* bakterisinin izolasyonu, identifikasyonu ve PCR analizi yapıldı. Çalışma sonucunda 207 bal arısı işletmesinden 10'unun (%4.83) *P. larvae* ile enfekte olduğu belirlendi. AFB hastalığının hızlı tespit yöntemleriyle etkin bir şekilde izlenmesi, arıların erken ve etkili kontrol önlemleri almalarına ve hastalığın daha fazla yayılmasını önlemelerine yardımcı olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Amerikan yavru çürüklüğü, *Apis mellifera* L., karadeniz, *Paenibacillus larvae*, PCR

Diagnosis of American Foulbrood in Honey Bees and Honeycomb in the Central and Eastern Black Sea Region

Beekeeping is a breeding activity in which various products such as honey, pollen, royal jelly and propolis can be obtained by using honey bees (*Apis mellifera* L.) and plant sources. Bees have vital importance due to their role in plant pollination in the nature and the positive effects of bee products on human health. Bee diseases and pests are among the most important problems in beekeeping. One of these diseases, American foulbrood (AFB), is a very dangerous and highly contagious disease that causes the death of honey bee larvae. The causative agent of the disease, *Paenibacillus larvae*, is a Gram-positive bacterium that has two forms: vegetative and spore form. In this study, the presence of AFB was investigated in 207 samples taken from beekeeping enterprises in the Central and Eastern Black Sea regions between 2020-2023. Isolation, identification, and PCR analysis of *P. larvae* bacteria, the causative agent of AFB performed on the samples. As a result of the study, it was determined that 10 (4.83%) of 207 honey bee enterprises were infected with *P. larvae*. Effective monitoring of AFB disease with rapid detection methods can help beekeepers to take early and effective control measures and prevent the further spread of the disease.

Key Words: American foulbrood, *Apis mellifera* L., black sea, *Paenibacillus larvae*, PCR

Giriş

Amerikan Yavru Çürüklüğü (AFB), bal arısı (*Apis mellifera* L.) başta olmak üzere diğer *Apis* türlerinin larvalarında görülen ve tüm dünyada yaygın olan bulaşıcı bir enfeksiyondur. AFB hastalığının etkeni olan *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*), Gram-pozitif oldukça bulaşıcı ve tehlikeli bir bakteridir. Vejetatif formu ergin arı ve larvalarda enfeksiyon meydana getirmemektedir. Arı larvaları için patojen olan spor formu ergin arılarda hastalık oluşturmamaktadır. Spor formu çevresel koşullar, ısı ve kimyasal maddelere karşı oldukça dirençlidir(1).

Hastalık etkeninin bulaşması yumurtadan çıkmış larvaların spor bulaşmış bir gıdayı aldıktan bir gün sonra sporlar orta barsak'ta gelişerek septisemiye neden olmaktadır (2, 3). *P. larvae*'nin yapışkan özelliğinden dolayı ölen larvaların uzaklaştırılması oldukça zordur. İşçi arılar tarafından, bulaşık larvalar uzaklaştırılmadıkları takdirde kovan içinde daha çok probleme sebep olurlar. İşçi, erkek ve ana arıların larva evreleri enfeksiyona duyarlı olsa da, ana arı ve erkek arı larvalarında enfeksiyon nadiren görülür (4, 5). AFB'ye karşı larvalarda yaşa bağlı direnç söz konusudur. Larva yaşı 32. saate ulaştığında, AFB'ye karşı duyarlılıkta azalma meydana gelmekte ve 53. saate ulaştığında yaşa bağlı enfeksiyon oluşturmamaktadır (6). Hastalığın bulaşmasında; *P. larvae* sporu ile bulaşık bal veya arı ekmeği, temel petekler, enfekte kolonilerdeki ana arı ve işçi arılar, *P. larvae* sporu ile bulaşık arıcılık alet ve ekipmanlarının kullanılması, hastalıklı ve sağlıklı kovanların birleştirmeleri, yağmacılık ve bazı akarlar bakterisi sporlarının taşınmasında etkilidir (7).

Geliş Tarihi : 09.07.2023
Kabul Tarihi : 09.08.2023

Yazışma Adresi Correspondence

Rahşan AKPINAR
Samsun Veteriner Kontrol
Enstitüsü,
Arı Hastalıkları Laboratuvarı
Samsun – TÜRKİYE

rahsankoc23@hotmail.com

P. larvae ilk defa 1906 yılında Amerikalı bir araştırmacı olan Dr. G.F. White tarafından bulunmuş ve *Bacillus larvae* (White) olarak isimlendirilmiştir. *Bacillus larvae*, *Paenibacillus larvae subsp. larvae* (Pll), *B. pulvificiens* ise *Paenibacillus larvae subsp. pulvificiens* (Plp) olarak adlandırılmıştır. İki türün ayırımında ERIC1R-ERIC2R primerleri kullanılarak yapılan repetitive element PCR (rep-PCR) ile 4 farklı genotip (ERIC I, ERIC II, ERIC III ve ERIC IV) ayırt edilmiştir. ERIC I ve ERIC II genotipleri, *P.l. larvae*'yi, ERIC III ve ERIC IV genotipleri ise *P.l. pulvificiens*'i belirler (8). *P. larvae* genotipi ERIC I en sık görülen genotiptir, ERIC II genotipi daha sınırlı görünmektedir, ancak her ikisi de dünya çapında rapor edilmiştir (8-11). ERIC III ve IV genotipleri sahada tespit edilmemiştir, ancak kültür koleksiyonlarında az sayıda izolat olarak bulunmaktadır. Dört genotipin de koloni ve spor morfolojisi, hemoliz özelliği, karbon kaynağı metabolizması ve özellikle virülansları farklılık göstermektedir (5, 8). ERIC I suşları enfekte larvaların 12 gün içinde %100 ölümüne yol açarken, ERIC II suşları enfekte larvaları yaklaşık 7 günde öldürmektedir (8, 11).

Türkiye genelinde yapılan çeşitli çalışmalarda (Ege, Marmara, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz) AFB şüpheli petek ve bal örneklerinden yapılan laboratuvar teşhis çalışmalarında *P. larvae* oranı %8-38 arasında olduğu bildirilmiştir (7, 12-15). AFB klinik belirtileri ilgili genotipe, hastalığın evresine ve arı kolonisinin gücüne ve muhtemelen AFB karşı direncine bağlıdır (10). Enfekte olmuş kolonilerde kapalı yavru gözlerinin kapaklarının renkleri solmuş, içeri doğru çukurlaşmış, kuluçka kapağı nemli ve kararmış ve kapalı petek gözlerinin üzerinde delik bulunmaktadır. Ayrıca enfekte olmuş larvalar morfolojik yapısını kaybetmekte ve larvaların rengi önce donuk beyaz, daha sonra açık kahve, koyu kahve ve sonunda siyah renkte görünmektedir. Ölü larva başlangıçta sulu ve hafif yapışkan iken hastalık ilerledikçe bu yapışkanlık artmaktadır. Hastalıklı larva tutkalımsı kıvamda olup ölmüş larvalar çikolata renginde ve larva gözüne bir kibrit çöpü sokulup gözden çıkarıldığında 2.5-10 cm kadar uzamış iplik halinde dışarı çekilebilir ve bu durum AFB'ü işaret etmektedir. Pupa döneminde ölüm gerçekleştiğinde petek gözü kapağının altında pupanın dilinin yukarıya doğru kalkık ve gözün alt üst iç yüzeyine degecek biçimde sertleşmiş bir vaziyette görülmektedir. Pupanın bu görünümü "pupa dili" olarak adlandırılmakta ve nadiren gözlenmektedir (16, 17).

AFB teşhisinde klinik tanı, mikroskopik inceleme, Holst süt testi, kültür, bakteri izolasyonu ile identifikasyonu ve PCR gibi moleküler testler kullanılmaktadır. Bu hastalıkla mücadelede koruma ve kontrol önlemlerine uyulması gereklidir. Ülkemizde

hastalıkla kesin ve etkili mücadele yöntemi, hastalık görülen kolonilerin yakılarak imha edilmesidir. Hastalığın yayılmaması için kovan gövdesi pürmüzle alevden geçirilmelidir. Arıcılıkta kullanılan k örük, maske, el demiri, yemlik, ana arı izgarası gibi ekipmanlar ve malzemeler dikkatli şekilde dezenfekte edilmelidir. Hastalıklı kolonilerin karantina altına alınması, hastalıklı kovan ve balın imhası, bir koloniden diğer koloniye petek, arı ve ekipman transferininin yapılması hastalığın yayılmasını önlemektedir (5, 7).

Bu çalışma; koloni kaybı gözlenen Amasya, Giresun, Ordu, Rize, Samsun, Sinop, Tokat ve Trabzon illerindeki bal arısı işletmelerinden alınan numunelerde *P. larvae*'nin varlığını araştırmak amacıyla yapıldı. Çalışmada numune alınan işletmelerde *P. larvae* oranının belirlenmesi için izolasyon ve identifikasyonu ile moleküler yöntemler kullanıldı.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Arı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı rutin tanı faaliyetlerinden elde edilen veriler değerlendirildi. Çalışma için etik izin gerektiren hiçbir hayvan veya insan çalışması yapılmadı. Ancak AFB hastalığı ihbari mecburi bir hastalık olduğundan Tarım ve Orman Bakanlığından gerekli izinler alınmıştır.

Bu çalışma; Amasya, Giresun, Ordu, Rize, Samsun, Sinop, Trabzon ve Tokat illerindeki koloni kayıpları gözlenen arı işletmelerindeki kovanlardan alınan numunelerle yapıldı (Şekil 1).

Koloni kaybı gözlenen arı işletmelerinde toplanan numuneler 2020 yılında 34, 2021 yılından 40, 2022 yılında 45 ve 2023 yılında 88 olmak üzere toplam 207 adet işletmeden numuneler alındı. Numunelerin illere göre dağılımı Tablo 1'de yer almaktadır.



Şekil 1. Türkiye'nin Avrupa kıtasındaki konumu ve numunelerin alındığı arı işletmelerinin bulunduğu iller

Tablo 1. 2020-2023 yılları arasında *P. larvae* yönünden incelenmesi yapılan numunelerin illere göre dağılımı ve sonuçları

Numune Gelen İller	Koordinatlar (E:B)	Örnek Sayısı	%	2020		2021		2022		2023	
				P	N	P	N	P	N	P	N
Amasya	40.6565 : 35.8373	8	25	0	1	0	1	2	3	0	1
Giresun	40.9175 : 38.3927	4	0	0	1	0	1	0	1	0	1
Ordu	40.9862 : 37.8797	61	0	0	15	0	15	0	20	0	11
Rize	41.0255 : 40.5177	11	36.4	0	4	1	1	2	2	1	0
Samsun	41.2797 : 36.3361	99	4.04	0	6	3	13	1	6	0	70
Sinop	42.0280 : 35.1517	5	0	0	2	0	1	0	1	0	1
Tokat	40.3235 : 36.5522	5	0	0	1	0	2	0	1	0	1
Trabzon	41.0027 : 39.7168	14	0	0	4	0	2	0	6	0	2
Toplam	-	207	4.83	0	34	4	36	5	40	1	87

Tablo 2. PCR protokolünde kullanılan primerler

Primer	Primer dizisi (1106 bp)
AFB-F	5'-CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3'
AFB-R	5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3'

***P. larvae*'nin İzolasyon ve İdentifikasyonu:** AFB teşhisinde; her bir petekten seçilmiş 3-5 bal arısı larvası 9 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisinde süspansiyon edildi. Yaklaşık 15 ergin arı örneği 3 mL PBS içinde kryo tüpe aktarıldı ve homojenizatörde (Bead Ruptor Elite, Bead Mill Homogenizer, Sku 19-042E, Omni International, ABD) parçalandı. Hazırlanan tüm solüsyonlar vejetatif bakterilerin ölmesi için 80°C'deki su banyosunda 10 dakika ısıtılma tabii tutuldu. Temel petek örneği (1.5 g) 10 mL kloroform içerisinde çözdürüldü ve bu çözdürülmüş kısımdan 2 mL alınıp 6 mL fizyolojik tuzlu su ile seyreltilip direkt ekim yapıldı. *P. larvae*'nin izolasyonu için; Kanlı Agar, Brain Heart Infusion agar (BHIA, Tiemin ilaveli) ve Colombia sheep blood agar (CSA %5 steril defibrine koyun kanı, Nalidiksik asit/Pipedimik asit ilaveli) ve MYPGP agar (Mueller-Hinton broth, Yeast ekstrakt, K₂HPO₄, glikoz, sodyum piruvat, Agar ve Nalidiksik asit/Pipedimik asit ilaveli) kullanıldı. Ekim yapılan tüm besiyerleri 37°C'de %5-7 CO₂'li inkübatörde 2-4 gün inkübe edildi. Üremenin yetersiz ya da olmadığı durumlarda besiyerleri 7 güne kadar 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Gözlenen mikroorganizma kolonilerinde identifikasyon için gram, karbol fuksin ve nigrosin boyama yapılarak ışık mikroskopunda incelendi. Ayrıca teşhis için kanlı agardaki kültürlerle katalaz testi yapıldı (17-20).

***P. larvae* Varlığının PCR ile Doğrulanması:** AFB'nin PCR teşhisinde bir öze dolusu şüpheli koloni 200 µL PBS dolu ependorfun içine konulur. İyice vortekslelendikten sonra 100 µL alınıp PureLink Genomic DNA mini kiti (Invitrogen/ABD – Lot: 2392135) ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. AFB için 25 µL'lik hacimde hazırlanan PCR karışımına; 2.5 µL Taq Buffer (10X), 3 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL dNTPs mix (10 nmol), 1 µL 50 pmol/luk *P. larvae* forward primer, 1 µL 50 pmol/luk *P. larvae* reverse primer (Tablo 2), 0.5 µL Taq DNA Polymerase,

11 µL DEPC su ve 5 µL kalıp DNA ilave edildi. PCR amplifikasyonunda; 95°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, sonra devamında 35 döngü 95°C 1 dk, 55°C 1 dk ve 72°C 1 dk ve son uzama basamağı 72°C'de 5 dk uygulandı. Oluşan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV transilliminatorde *P. larvae* için 1106 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü pozitif olarak kabul edildi (17). PCR değerlendirmesinde pozitif suş olarak *P. larvae* PB27B (Erişim No: OP900576) kullanıldı.

İstatistik Analiz: Çalışmada 2020-2023 yılları arasında Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesindeki bal arısı işletmelerinden alınan larvalı petek, temel petek ve ergin arı örnekleri frekans dağılımları bakımından incelenmiş ve elde edilen sonuçlar frekans tablosunda verilmiştir (Tablo 1).

Bulgular

2020-2023 yılları arasında Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinden (Amasya, Giresun, Ordu, Rize, Samsun, Sinop, Trabzon ve Tokat) Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen larvalı petek, temel petek ve ergin arı örnekleri incelemeye alındı. Arı işletmelerinden alınan 30 adet temel petek numuneleri ve 78 adet ergin arı örneklerinin hiçbirinde *P. larvae* tespit edilmedi. Larvalı peteklerden (99 adet) alınan larva numunelerinin 10'unda *P. larvae* belirlendi. Amasya'dan gelen 8 örneğin 2'sinde, Rize'den gelen 11 örneğin 4'ünde, Samsun'dan gelen 99 örneğin 4'ünde *P. larvae* tespit edildi. Giresun'dan gelen 4 örnekte, Ordu'dan gelen 61 örnekte, Tokat'tan gelen 5 örnekte, Sinop'tan gelen 5 örnekte ve Trabzon'dan gelen 14 örnekte *P. larvae* tespit edilmedi. AFB hastalığı teşhis edilmiş numunelerin yüzdeleri Tablo 1'de yer almaktadır.

Arı işletmelerinden alınan larvalı peteklerin klinik gözleminde kapaklarının içbükey ve delinmiş olduğu larvanın renginin bejden kahverengiye doğru değiştiği belirlendi. Larva kalıntılarında bir iğne sokulup hücreden çıkarıldığında AFB belirtisi olarak bilinen larva iplikler halinde dışarı çekilebildi (kibrit çöpü testi). İncelenen 99 adet larvalı petekte yapılan klinik gözleminde 10 adetinin AFB şüpheli olduğu (Şekil 2) ve yapılan izolasyon ve idenfikasyon sonucunda şüpheli numunelerin tamamında AFB etkeni olan *P. larvae* tespit edildi. AFB hastalığının klinik belirtilerini gösteren örneklerin mikroskopik incelenmesinde Gram ve nigrosin boyama tekniği kullanılarak mikroskopik görüntüsü fotoğraflandı (Şekil 2). Mikroskopide nigrosin boyama ile AFB belirtisinin tipik görüntüsü spiralli yapı gözlemlendi. Kültür incelenmesinde ise MYPGP agar besiyerinde belirgin şekilde küçük, düzenli, bazen pürüzlü ve bej renginde *P. larvae* kolonileri gözlemlendi. Kanlı ağarda üreyen kolonilerde katalaz testi yapılmış olup, tüm kolonilerde katalaz testi negatif sonuç vermiştir.

Ayrıca yapılan PCR analizinde'de *P. larvae* (Şekil 3) 10 işletmede tespit edildi. Moleküler analizler ile mikroskopik bakı sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür.

Tartışma

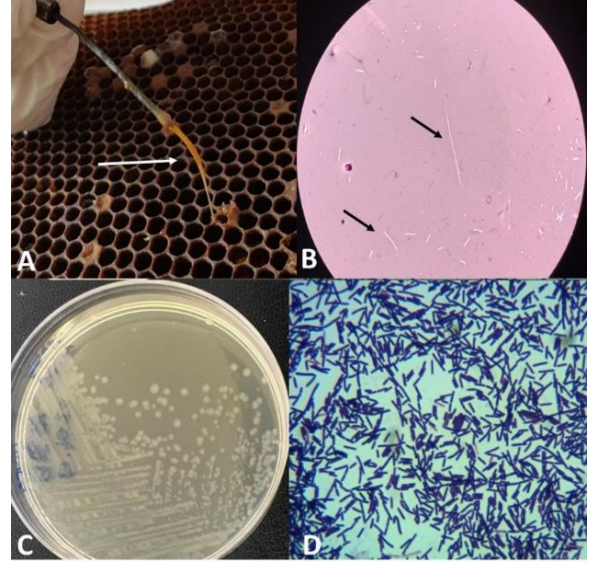
Türkiye, kendine özgü coğrafi yapısı ve iklim koşullarından dolayı çok zengin bir bitki çeşitliliği sahip olup, arıcılık faaliyetleri yaygın olarak yapılmaktadır. Ülkemizde, bitkilerin çiçek açma dönemlerinin yörelere göre farklılık göstermesi sonucunda, gezginci arıcılık yoğun olarak yapılmakta ve gezginci arıcılık nedeni ile enfekte kovanların farklı bölgelere taşınması diğer sağlıklı kovanların da enfekte olmasına sebep olmaktadır. AFB küresel olarak arıcılıkta koloni kayıplarına ve ciddi ekonomik kayıplara neden olan, bal arısı larvasını etkileyen bakteriyel bir hastalıktır. Dünyanın her yerinde görülen AFB hastalığı oldukça bulaşıcı bir hastalık olduğundan, OIE (Office International des Epizooties/World Organization for Animal Health) tarafından liste B olarak sınıflandırılmıştır. AFB hastalığı başta OIE üyesi 178 ülkede ve Türkiye'de bildiri zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır. Bu hastalığın yayılmasını durdurmak için birçok önlem ve yasal prosedür uygulanmakta olup, OIE üyesi ülkelerin çoğunda ve ülkemizde kullanılan prosedür etkilenen koloniler "Bal Arılarının Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığına Karşı Korunma ve Mücadele Yönetmeliği" kapsamında itlaf edilmektedir (7).

Wilhelm ve ark. (21), Avusturya'da yürütülen beş yıllık (2018-2022) gönüllü izleme programı kapsamında yaptıkları çalışmada, AFB pozitif koloni oranlarının %8-28 arasında olduğunu bildirmiştir. Polonya'da yapılan çalışmada, 6510 bal numunesi incelenmiş, balların %35.6'sında *P. larvae* varlığı rapor edilmiştir (22). Şık ve ark. (23) tarafında 2015-2020 yılları arasında AFB şüphesi olan 159 kovan incelemiş ve 49 kovanın (%30.8) AFB pozitif olduğu bildirilmiştir.

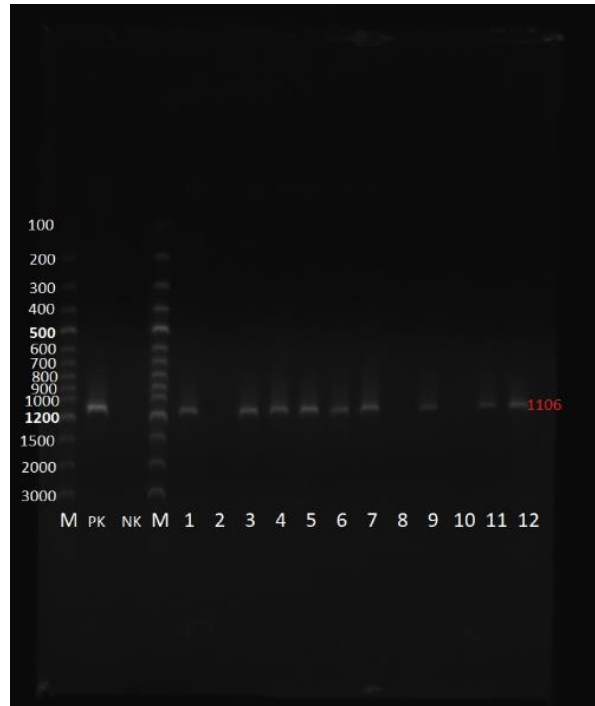
D'Alvise ve ark. (24) tarafından, 2016-2017 yılları arasında Almanya'da ticari ve amatör olarak arıcılık

yapan yetiştiricilerin kovanlarından alınan 1064 arı örneğinde çeşitli arı hastalığı ve zararlıları varlığı incelenmiş ve incelenen 1064 arı örneğinden 295 (%27) tanesi *P. larvae* pozitif olarak bildirilmiştir.

Locke ve ark. (25) tarafından yapılan çalışmada, sonbaharda AFB varlığının %74 olarak belirlenmiş ve erken ilkbaharda karantina yönetim stratejisi uygulayarak AFB oranını %4'e düşürmüştür. Ebeling ve



Şekil 2. *Paenibacillus larvae*'nin mikroskopik ve makroskopik görünümü. A. AFB kibrit testi, B. Nigrosin boyamada *P. larvae*'nin basil ve zikzaklı (pozitif örnek) görüntüsü, C. MYPGP agar besiyerinde *P. larvae* koloni görüntüsü, D. Gram boyama görüntüsü



Şekil 3. AFB PCR pozitif ve negatif örneklerin DNA jel görüntüsü. M: Marker, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol

ark. (26) tarafından AFB'nin Laboratuvar Teşhisinde Farklı Matrislerin Karşılaştırılması üzerine yaptıkları çalışmada, ergin arıların ve petek balının, *P. larvae* sporlarının erken tespiti için eşit derecede uygun olduğu, kovan döküntülerinin ise sadece kuluçka peteklerinden bal veya yetişkin arı numuneleri almanın mümkün olmadığı durumlarda kullanılması gerektiği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada farklı matrislerdeki (larva, temel petek ve ergin arı) numunelerde analizler yapılmıştır. AFB hastalığının prevalansı ile ilgili yapılan çalışmalarda; Yalçinkaya ve ark. (12) Hatay ve Adana illerinde yaptıkları çalışmada %29, Özden (14) tarafından Ege Bölgesindeki illerde yapılan çalışmada ise %27 olarak rapor edilmiştir. Muz ve ark. (27) tarafında Hatay ve yöresinde yapılan çalışmada 6 değişik lokasyondaki 30 farklı arılıktan alınan 900 kolonide, PCR ve kültürel metotlarla AFB etkeni araştırılmış ve *P. larvae* yaygınlığının %8 (72 koloni) olduğu rapor edilmiştir. Özden (14) doktora çalışmasında 96 adet farklı matrislerdeki örneklerde AFB'nin teşhisi için kültür ve moleküler yöntemleri (Konvansiyonel PCR ve Real-Time PCR yöntemi) kullanmış ve analiz sonucunda kültür metodu ile 10 örnekte, konvansiyonel PCR ile 16 örnekte, Real-Time PCR ile 25 örnekte pozitiflik tespit etmiş olup, kültür yöntemi ile pozitif bulunduğu tüm örneklerin, moleküler yöntemlerle de pozitif bulunduğunu bildirmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda, AYÇ şüpheli bir örnek, moleküler yöntemlerle muayene edilip negatif bulunursa menfi olarak değerlendirilebildiğini belirtmiştir.

Çalışmada Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde bulunan 8 ilden gelen 207 şüpheli örnekte AFB pozitif örnek sayısı 10 (%4.83) olarak belirlendi. Bu çalışmada, Ege bölgesinde ve Adana-Hatay illerinde yapılan

çalışmalara göre AFB pozitif prevalansının daha düşük olduğu belirlendi. Bunun nedeninin arıcılık yapılan bölgelerdeki iklimsel ve floral farklılıklar ve gezginci arıcılık yapılması gibi çeşitli dış faktörlerden olabileceği düşünülmektedir. 2022 yılında Güney Marmara Bölgesi'nden örneklenen kolonilerde qPCR kullanarak bakıcı arılarda AFB taraması yapılmış ve genel yaygınlık oranı %31.3 olarak bildirilmiştir. Marmara Adası'ndan (Ada) 42 örnekten 8 örnek AFB pozitif (%19) olarak belirlenirken, diğer örnekleme yapılan bölgelerden (Çınarcık, Ada, Karacabey, Mustafakemalpaşa ve Yalova) gelen 72 örnekte ise 23 örnek AFB pozitif (%38.4) olarak bildirilmiştir (15).

Sonuç olarak; *P. larvae* örneklerinin geldiği Orta ve Doğu Karadeniz bölgelerindeki incelenen 8 ili kapsayan çalışmada arı popülasyonları hastalıktan farklı seviyelerde etkilenmektedir. Sonuçlardaki değişkenliğin nedeni iklim faktörü ve arıcının hastalığın yayılmasındaki rolü gibi muhtemel birkaç faktör ile açıklanabilir. Hastalığın oldukça patojenik doğası ve erken teşhis edilememesi gibi nedenler geniş alanlara yayılmasından da sorumludur. Arıcılar hastalığı yeterince erken tespit edemedikleri için kovanların konakladıkları alanlarda salgınlarının oluşumunu teşvik edebilirler. Sonuçların değişkenliğinin bir diğer nedeni Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde deniz kıyısından içeri doğru geçiş yapıldığında bitki örtüsündeki farklılıklarda olabilir. Bitki örtüsündeki farklılıklar balın kalitesini etkilediği gibi arı hastalık insidansını da etkileyebilir. AFB hastalığı ile mücadelede başarılı olabilmek için etkenin hızlı ve erken teşhis edilmesi ve ardından hastalığın fazla yayılmasını önlemek için uygun kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir.

Kaynaklar

- Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, et al. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvificiens* (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. *pulvificiens*. Int J Syst Evol Microbiol 1996; 46: 270-279.
- Sturtevant AP. Relation of commercial honey to the spread of American foulbrood. J Agric Res 1932; 45: 257-285.
- Pernal SF, Clay, H. American Foulbrood. Honey Bee Diseases and Pests. 3rd Edition, Beaverlodge, Alberta, Canada: Canadian Association of Professional Apiculturists, 2013.
- Woodrow AW, Gochnauer, T. Susceptibility of honey bee larvae to American foulbrood. Gleanings Bee Cult 1941; 69: 148-151.
- de Graaf DC, Alippi AM, Antúnez K, et al. Standard methods for American Foulbrood research. J Apicul Res 2013; 52: 1-28.
- Hansen H, Brødsgaard CJ. American foulbrood: A review of its biology, diagnosis and control. Bee World 1999; 80: 5-23.
- Doğanay A, Aydın L. Bal Arısı Yetiştiriciliği Ürünleri Hastalıkları. 1. Baskı, Bursa: Dora Yayınevi, 2017.
- Genersch E. Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 87: 87-97.
- Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, et al. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation, Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56: 501-511.
- Genersch E, Ashiralieva A, Fries I. Strain and genotype-specific *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American Foulbrood disease in honeybees. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 7551-7555.
- Djukic M, Brzuszkiewicz E, Fünfhaus A, et al. How to kill the honey bee larva: Genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. PLoS One 2014; 5: e90914
- Yalçinkaya A, Keskin N, Özkirim A. After Colony Losses in Hatay and Adana Region of Turkey the Investigation of Honey Bee Diseases. Montpellier, France: Abstract APIMondia, 2009.

13. Sevim E, Baş Y, Çelik G, et al. Antibacterial activity of bryophyte species against *Paenibacillus larvae* isolates, Turkish J Vet Animal Sci 2017; 41: 10.
14. Özden M. Balarılarındaki Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı Etkeni Olan *Paenibacillus larvae*'nin Larvalı Petek ve Bal Örneklerinden Konvansiyonel ve Moleküler Biyolojik Yöntemlerle Teşhisi. Doktora Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017.
15. Mayack C, Hakanoğlu H. Honey Bee pathogen prevalence and interactions within the Marmara region of Turkey. Vet Sci 2022; 9: 573.
16. Brødsgaard CJ, Hansen H, Ritter W. Progress of *Paenibacillus larvae* larvae infection in individually inoculated honey bee larvae reared single in vitro, in micro colonies, or in full-size colonies. J Apic Res 2000; 39: 19-27.
17. OIE. "Chapter 3.2.2. American foulbrood of honey bees (Infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*)". https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf/ 18.05.2022.
18. Gochnauer TA. Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture. J Invertebr Pathol 1973; 22: 251-257.
19. Dingman, DW, Stahly, DP. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. Appl Environ Microbiol 1983; 46: 860-869.
20. Hornitzky MAZ, Karlovskis S. A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. J Apicult Res 1989; 28: 118-120.
21. Wilhelm E, Korschineck I, Sigmund M, et al. Monitoring of *Paenibacillus larvae* in Lower Austria through DNA-Based detection without de-Sporulation: 2018 to 2022. Vet Sci 2023; 10: 213.
22. Pohorecka K, Skubida M, Bober A, Zdanska D. Screening of *Paenibacillus larvae* spores in apiaries from eastern Poland. Nationwide survey. Part 1. Bull Vet Inst Pulawy 2012; 56: 539-545.
23. Şık Z, Atıcı EG, Altıntaş Ö, Elitok Y, Şen S. Frequency of American foulbrood in honeybees: 2015-2020 Data of the Veterinary Control Central Research Institute in Turkey. Etlik Veterinerlik Mikrobiyoloji Dergisi 2022; 33: 15-20.
24. D'Alvise P, Seeburger V, Gihring K, Kieboom M, Hasselmann M. Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. Ecol Evol 2019; 9: 10241-10252.
25. Locke B, Low M, Forsgren E. An integrated management strategy to prevent outbreaks and eliminate infection pressure of American foulbrood disease in a commercial beekeeping operation. Prev Vet Med 2019; 167: 48-52.
26. Ebeling J, Reinecke A, Sibum N, et al. A comparison of different matrices for the laboratory diagnosis of the epizootic American foulbrood of honey bees. Vet Sci 2023; 10: 103.
27. Muz MN, Solmaz H, Yaman M, Karakavuk M. Kış salkımı erken bozulan arı kolonilerinde parazitler ve bakteriyel patojenler. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi 2012; 23: 147-150.