



ADVIES 12-2012

Betreft : Beoordeling van het risico dat gekweekte hommels, gecontamineerd met sporen en/of vegetatieve cellen van Amerikaans vuilbroed (*Paenibacillus larvae*), een klinische uitbraak van deze ziekte bij honingbijen veroorzaken (dossier SciCom 2011/16).

Advies goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 20 april 2012.

Samenvatting

Het Wetenschappelijk Comité heeft een evaluatie gemaakt van het risico dat gekweekte hommels, die gecontamineerd zijn met sporen en/of vegetatieve cellen van Amerikaans vuilbroed (*Paenibacillus larvae*), een klinische uitbraak van deze ziekte bij honingbijen veroorzaken.

Het Wetenschappelijk Comité besluit dat dit risico laag is, aangezien tot nu toe nooit werd aangetoond dat hommels drager van deze ziekte kunnen zijn. Bovendien is de kans dat honingbijen met Amerikaans vuilbroed geïnfecteerd worden via gekweekte hommels veel kleiner dan dat zij geïnfecteerd worden door direct of indirect contact met andere bijen, gezien de ziekte wijdverspreid is. De goede praktijken bij het kweken van hommels vereisen echter dat alle noodzakelijke maatregelen worden genomen om het risico op besmetting door sporen en/of vegetatieve cellen van Amerikaans vuilbroed tot een minimum te beperken (bvb. : naleven van de bioveiligheidsregels).

Summary

Advice 12-2012 of the Scientific Committee of the FASFC on the assessment of the risk that reared bumblebees contaminated with spores and/or vegetative cells of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) induce a clinical outbreak of this disease in honeybees.

The Scientific Committee has assessed the risk that reared bumblebees contaminated with spores and/or vegetative cells of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) induce a clinical outbreak of this disease in honeybees.

The Scientific Committee concludes that this risk is low, since it has never been shown so far that bumblebees could be carriers of this disease. Moreover, the probability that honeybees become contaminated with American foulbrood by reared bumblebees is much lower compared to the probability that they become infected following a direct or indirect contact with other bees, as the disease is widespread. Good bumblebees rearing practices do require however that all necessary measures are taken to minimize the risk of contamination by spores and/or vegetative cells of American foulbrood (e.g. : compliance with biosecurity rules).

Trefwoorden

Hommel – bij – Amerikaans vuilbroed – *Paenibacillus larvae* – risico-evaluatie

1. Referentietermen

1.1. Doel

Het doel van dit dossier is het risico te evalueren dat gekweekte hommels, die gecontamineerd zijn met sporen en/of vegetatieve cellen van Amerikaans vuilbroed (*Paenibacillus larvae*), een klinische uitbraak van deze ziekte bij honingbijen veroorzaken.

1.2. Wettelijke context

Koninklijk besluit van 25 april 1988 tot aanwijzing van de dierenziekten die vallen onder de toepassing van hoofdstuk III van de dierengezondheidswet van 24 maart 1987.

Koninklijk besluit van 14 november 2003 betreffende autocontrole, meldingsplicht en traceerbaarheid in de voedselketen.

Koninklijk besluit van 23 mei 2000 houdende bijzondere bepalingen inzake het verwerven, het in depot houden, het voorschrijven, het verschaffen en het toedienen van geneesmiddelen bestemd voor dieren door de dierenarts en inzake het bezit en het toedienen van geneesmiddelen bestemd voor dieren door de verantwoordelijke voor de dieren.

Koninklijk besluit van 14 december 2006 betreffende geneesmiddelen voor menselijk en diergeneeskundig gebruik.

Koninklijk besluit van 7 maart 2007 betreffende de bestrijding van besmettelijke ziekten van de bijen.

Ministerieel besluit van 31 augustus 1993 tot vaststelling van de veterinairerechtelijke voorschriften voor het handelsverkeer en de invoer van dieren, sperma, eicellen en embryo's, van soorten waarvoor ten aanzien van de veterinairerechtelijke voorschriften geen specifieke reglementering is opgesteld, als bedoeld in bijlage III, A, van het koninklijk besluit van 31 december 1992 betreffende de veterinaire en zoötechnische controles, die van toepassing zijn op het intracommunautaire handelsverkeer van sommige levende dieren en producten.

Verordening (EG) nr. 1430/94 van de Commissie van 22 juni 1994 tot wijziging van de bijlagen I, II, III en IV bij Verordening (EEG) nr. 2377/90 van de Raad houdende een communautaire procedure tot vaststelling van maximumwaarden voor residuen van geneesmiddelen voor diergeneeskundig gebruik in levensmiddelen van dierlijke oorsprong.

Richtlijn 82/894/EEG van de Raad van 21 december 1982 inzake de melding van dierziekten in de Gemeenschap.

Richtlijn 92/65/EEG van de Raad van 13 juli 1992 tot vaststelling van de veterinairerechtelijke voorschriften voor het handelsverkeer en de invoer in de Gemeenschap van dieren, sperma, eicellen en embryo's waarvoor ten aanzien van de veterinairerechtelijke voorschriften geen specifieke communautaire regelgeving als bedoeld in bijlage A, onder I, van Richtlijn 90/425/EEG geldt.

Gezien de discussies tijdens de vergaderingen van de werkgroep van 5 juli 2011, 24 augustus 2011 en 11 oktober 2011, en de plenaire zittingen van 14 oktober 2011 en 20 april 2012,

geeft het Wetenschappelijk Comité het volgend advies :

2. Inleiding

Dit dossier is het gevolg van de vaststelling van sporen van Amerikaans vuilbroed (*Paenibacillus larvae*) in een bedrijf dat hommels kweekt met het oog op het verhandelen ervan als hulpinsecten voor de bestuiving van gewassen (vb. in serres met tomaten, aubergines en paprika's). Immers, in het kader van de autocontrole neemt dit bedrijf om de drie weken monsters van broed teneinde eventuele pathogene agentia op te sporen. Eén van deze laboanalyses bracht in mei 2011 de aanwezigheid van sporen van Amerikaans vuilbroed (AVB) in broed van de soort *Bombus terrestris* aan het licht. Er werden echter geen klinische tekens van AVB in het bedrijf vastgesteld. Daarnaast konden uitgebreide bemonsteringen en bacteriologische analyses een contaminatie door *P. larvae* niet aantonen. Het bleek dus *a priori* dat het ging om een besmetting te wijten aan het feit dat hommels worden gevoed met pollen die kunnen gecontamineerd zijn met sporen van AVB. Na deze vaststelling heeft het bedrijf in kwestie besloten om de pollen, gebruikt voor het voederen van hommels, te steriliseren door middel van gamma stralen. De monsters die hierna werden genomen, zijn allemaal negatief.

Wat de Belgische resultaten betreft voor het opsporen van sporen van AVB bij honingbijen en gekweekte hommels, wordt in tabel 1 aangetoond dat slechts 4 monsters positief bevonden waren (op een totaal van 1.123 ontlede monsters, ofwel 0,36 %) bij gekweekte hommels in België in de periode 2000-2011. In dezelfde periode zijn 77 monsters positief bevonden (op een totaal van 1.929 ontlede monsters ofwel 3,99 %) voor wat honingbijen betreft. Sinds 2004 zijn er 22 haarden van AVB vastgesteld, gaande van 0 tot 7 haarden per jaar en deze haarden hebben enkel betrekking op honingbijen. Er moet eveneens worden verduidelijkt dat België in 2010 zo'n 3.000 imkers volgens het FAVV, maar ongeveer 7.600, met een totaal van om en nabij de 112.000 bijenkorven, volgens de Regio's telde.

Er moet evenwel worden opgemerkt dat de bemonstering en de analyse van de monsters als doel had de afwezigheid van sporen van AVB te bevestigen in een partij honingbijen of gekweekte hommels en niet om een monitoring uit te voeren met het oog op het opsporen van de aanwezigheid van de ziekte op Belgisch grondgebied. Derhalve is vanuit een epidemiologisch standpunt de interpretatie van de resultaten een delicate zaak.

Tabel 1 : Overzicht van het aantal monsters geanalyseerd voor het opsporen van sporen van Amerikaans vuilbroed bij honingbijen en gekweekte hommels, van het aantal van deze monsters die positief bleken te zijn en van het aantal haarden van Amerikaans vuilbroed bij bijen in België in de periode 2000-2011 (gegevens uit LIMS van het CODA-CERVA).

Jaar	Aantal ontlede monsters			Aantal positieve monsters			Aantal haarden
	Bijen	Hommels	Totaal	Bijen	Hommels	Totaal	Bijen
2000	153	0	153	12 ^b	0 ^b	12 ^b	- ^a
2001	226	0	226	15 ^b	0 ^b	15 ^b	- ^a
2002	154	0	154	10 ^b	0 ^b	10 ^b	- ^a
2003	102	3	105	3	0	3	- ^a
2004	205	9	214	7	1	8	2
2005	148	7	155	7	0	7	7
2006	157	6	163	3	0	3	3
2007	171	9	180	7	0	7	5
2008	141	193	334	5	0	5	1
2009	219	233	452	8	0	8	4
2010	142	198	340	0	0	0	0
2011	111	465	576	0	3	3	0
Totaal	1.929	1.123	3.052	77	4	81	22

^a = cijfers niet beschikbaar

^b = niet bij PCR bevestigd, enkel geïsoleerd en geïdentificeerd

Derhalve heeft deze adviesaanvraag als doel te onderzoeken in welke mate deze geïnfecteerde gekweekte hommels kunnen worden gebruikt in landbouw- en tuinbouwbedrijven in België en in het buitenland zonder de gezondheid van de honingbijen in gevaar te brengen.

3. Biologie en rol van hommels

3.1. Biologie en natuurlijke habitat

Terwijl de bestuiving door honingbijen goed gekend is en zeer vaak in de media komt, onderschat men vaak het belang van de bestuiving door hommels.

Hommels zijn nochtans de meest performante bestuivers van tal van planten zoals rode klaver, luzerne en in bepaalde gebieden, katoenplant, frambozenstruiken, appel- en pruimenbomen (Faegri & van der Pijl, 1979).

Ze zijn zo performant omdat :

- ze bij relatief lage temperaturen kunnen vliegen;
- ze een langere tong hebben dan honingbijen en dus bloemen kunnen bestuiven die een diepere bloemkroon hebben;
- ze zeer behaard zijn en dus ook een grotere hoeveelheid pollen kunnen meenemen.

Hommels leven in kolonies die tot 300 exemplaren kunnen tellen (de koningin, werksters en darren inbegrepen). Hommels zijn insecten behorende tot de holometabola, d.w.z. tijdens hun ontwikkeling ondergaan ze 4 volledige gedaanteverwisselingen (ei, larve, pop en imago).

Hoewel ze in kolonies leven worden hommels ingedeeld bij de primitieve eusociale insecten omwille van het feit dat de koningin gedurende een periode solitair leeft (Michener, 2007). In de gematigde klimaatzones beschikken zij bovendien over een jaarlijkse levenscyclus.

Op het eind van de zomer wordt een nieuwe koningin door een dar bevrucht (Alford, 1975). Daarna zoekt zij een holte voor haar winterdiapauze (= hibernatie) die 6 tot 9 maanden duurt en afhangt van de temperatuur in het voorjaar. De exemplaren van de andere kasten (oude koninginnen, werksters, darren) sterven voor de winter.

In de lente komt de koningin terug te voorschijn en gaat op zoek naar een plaats om haar nest (vaak een oude schuilplaats van een microzoogdier), en dus haar eigen kolonie te bouwen (Alford, 1969). Zij voedt zich met nectar en pollen die nodig zijn voor de ontwikkeling van de ovaria (Heinrich, 1979). Eens zij een plaats gevonden heeft, legt zij haar eitjes en broedt ze uit waarbij ze zich voedt met nectar die ze verzameld en gestockeerd heeft in een vooraf uit was gemaakte "honingpot".

Het aantal eitjes dat per cel wordt gelegd varieert volgens de in aanmerking genomen species. Ze ontwikkelen zich in larven, daarna in poppen. Deze worden daarna in individuele cocons afgescheiden. Tenslotte wordt het stadium van 'imago' bereikt (Heinrich, 1979).

De koningin gebruikt haar thermoregulatie om een geschikte temperatuur te behouden voor de overleving en ontwikkeling van haar afstammelingen. Wanneer de eerste werksters uit de cocons komen, gaat de koningin enkel eitjes leggen en de werksters voeren alle andere taken in de kolonie uit (verzamelen van pollen en nectar, enz.) die noodzakelijk zijn om het nest intact te houden.

Wanneer de koningin geen spermatozoïden meer heeft in de spermateek, legt ze onbevruchte eitjes die enkel darren opleveren (arrhenotoke parthenogenese).

In tegenstelling tot de honingbijen, waarbij de productie van de koninginnen sterk verbonden is aan de productie van "koninginnengelei", is het afscheiden van een contraceptief feromoon

door de koningin en de hoeveelheid voedsel dat een exemplaar afgeeft van doorslaggevend belang.

Bij het opstarten van de kolonie wordt immers het leggen van eieren door werksters afgeremd door een contraceptief feromoon dat door de koningin wordt afgescheiden. Het effect ervan blijkt onduidelijker te worden naarmate de kolonie groter wordt en de seksuele organen van de nieuwe exemplaren zich beginnen te ontwikkelen. In dit stadium zijn de werksters talrijk en de verhouding in het aantal werksters/eieren is hoog. De nieuwe nakomelingen ontvangen dus een overvloedige hoeveelheid voedsel om te groeien en voor de ontwikkeling van hun reproductieve organen. Er komen dus nieuwe vruchtbare koninginnen tevoorschijn. Zij zullen uiteindelijk het nest verlaten en met darren paren waardoor de cyclus rond is.

3.2. Karakteristieken bij het kweken van hommels

Het was een wetenschappelijke uitdaging om hommels in een totaal afgesloten omgeving te kweken, waarbij ze niet afhankelijk van hun seizoensgebonden levenscyclus en ze indien nodig experimentele species kunnen voortbrengen. De vooruitgang hierin heeft ondernemers ertoe aangezet om hommels te kweken voor commerciële doeleinden. Door de hoge kosten van het werk en het laag slaagpercentage van de kweek werd de privésector ertoe aangezet zich te richten op gewassen met een hoge toegevoegde waarde, bvb. deze voor de productie van hybride zaden, vooral wanneer een verstuiving met de hand nodig was (Velthuis & van Doorn, 2006). De zaken hebben zich gestaag opgebouwd sinds een Belgische dierenarts in 1985 begonnen is met het kweken van hommels voor commerciële toepassingen.

3.2.1. Keuze van de species

Verschillende hommelspecies worden gebruikt die allemaal aan verschillende criteria voldoen :

- (i) de species moet een grote natuurlijke verspreidingsareaal hebben,
- (ii) de species moet grote kolonies voortbrengen,
- (iii) de species is bij voorkeur een algemene bestuiver die door trillingen kan bestuiven, d.w.z. door sonificatie (vb. voor het bestuiven van tomaten) en
- (iv) de species moet over een hoog slaagpercentage beschikken om in een afgesloten milieu te kunnen kweken.

Het aantal gekweekte species werd uitgebreid tegelijkertijd met een markt in expansie, waardoor inheemse hommelspecies voor bestuiving in verschillende continenten konden worden aangeboden (zie tabel 2). Een belangrijk criterium bij de teelt is het voedingsgedrag van de hommellarven. De '*pollen-storers*', een groep hommels die stuifmeel in een voorraadpotje van was opslaan, voederen voortdurend de larven door regurgitatie en deze nemen gemakkelijk het in gevangenschap verspreide stuifmeel op. In tegenstelling tot de '*pocket-makers*', die een voorraad stuifmeel afzetten aan de top van de broedcel waaraan de larven zich voederen.

Tabel 2 : (Sub)species van hommels die voor commerciële bestuiving worden gekweekt (Velthuis & van Doorn, 2006).

Species	Oorsprong	aangewend in	# kolonies in 2004	# werksters/kolonie
<u>Geslacht <i>Bombus</i></u>				
<i>B. terrestris</i> L.	Europa, Noord-Afrika, Westelijk Azië	Europa, Noord-Afrika, Azië, zuidelijk Azië, Zuid-Amerika	900.000	200–400
<i>B. t. canariensis</i> Pérez	Canarische Eilanden	Canarische Eilanden	30.000	150–300
<i>B. lucorum</i> L.	Europa, Azië	Oost-Azië	4.000	50–150
<i>B. ignitus</i> Smith	Oost-Azië	Oost-Azië	3.500	100–200
<i>B. occidentalis</i> Greene	Noordwest Amerika	Noordwest-Amerika	1.000	200–400
<u>Geslacht <i>Pyrobombus</i></u>				
<i>B. impatiens</i> Cresson	Noordoost-Amerika	Noord-Amerika	55.000	300–500

3.2.2. Overwintering

Het natuurlijk overwinteringsgedrag (cf. punt 3.1.) kan in gevangenschap worden gesimuleerd, de bevruchte koninginnen kunnen zich in een hoop aarde (of een andere substraat) in de bevruchtungskast ingraven. De koninginnen worden uitgegraven en bewaard in een individuele of collectieve container aan een temperatuur van 1 à 5°C (er kan opnieuw verschillende soorten substraten zoals aarde, vochtig papier, vochtige turf worden gebruikt) (Velthuis & van Doorn, 2006). Indien gesteriliseerde overwinteringsmilieus worden gebruikt, komen minder schimmelinfecties voor, hetgeen zich vertaalt in een betere overlevingspercentage na overwintering (Macfarlane *et al.*, 1995).

3.2.3. Initiatie van de kolonie

De overwintering kan worden onderbroken of door een CO₂ behandeling worden belemmerd. Volgend op de narcose (= artificieel veroorzaakte slaap) worden de jonge koninginnen actief en zijn ze klaar om een kolonie te stichten (ösel, 1985; Velthuis & van Doorn, 2006). Terzelfdertijd wordt de omgevingstemperatuur en de lichtintensiteit verhoogd. Een temperatuur van 28-30°C en een luchtvochtigheidsgraad van meer dan 50 % moeten behouden blijven. De initiatie van de kolonie kan gebeuren door twee koninginnen samen te zetten. Hoewel de hieruit voortvloeiende agressiviteit vaak leidt tot de dood van één van de twee koninginnen wordt de doeltreffendheid van de teelt op de helling gezet. Andere methodes voegen werksters van dezelfde species, cocons of zelfs werksterbijen toe, maar het kunstmatig stimuleren met bvb. plastic cocons hebben eveneens hun succes bewezen (Jie *et al.*, 2005; Velthuis & van Doorn, 2006).

3.2.4. Bevruchting

Om bevruchte koninginnen te bekomen, worden darren en koninginnen met een aangepaste leeftijd, in bevruchtungskasten geplaatst van 40×40×60 cm of iets groter. De paring gebeurt voornamelijk in de ochtend, waarbij het zonlicht of een sterk licht leidt tot een vruchtbare paring. De meerderheid van de Europese koninginnen paren slechts één maal, terwijl daarentegen meerdere paringen bij de Noord-Amerikaanse species werden gerapporteerd. Anderzijds kunnen darren meerdere keren paren (Velthuis & van Doorn, 2006).

3.2.5. Voederen

Als energie- en koolstofbron wordt een suikersiroop gebruikt terwijl door bijen verzameld stuifmeel als stikstofbron wordt aangedragen. Een ringtest m.b.t. de kwaliteit van het stuifmeel voor hommels heeft aangetoond dat het succes van de hommelteelt groter is door stuifmeel te gebruiken met een hoog proteïnegehalte. De oorzaak van een lager slaagpercentage in de teelt kan echter ook worden toegeschreven aan een tekort aan bepaalde bestanddelen, zoals een vitamine of een essentieel aminozuur (Velthuis & van Doorn, 2006).

4. Amerikaans vuilbroed

4.1. De ziekte

Amerikaans vuilbroed (AVB) is een ziekte van de larven van de honingbij (*Apis mellifera*), veroorzaakt door de Gram-positieve, sporenvormende bacterie *Paenibacillus larvae* (Genersch *et al.*, 2006), vroeger *Bacillus larvae* genaamd. De naam 'vuilbroed' verwijst naar klinische symptomen van AVB bij zware verzieking van de kolonie, met name de verwording van het bijenbroed tot een vuile, rotte massa. De ziekte wordt daarom ook wel Amerikaans 'broedrot' genoemd. Er bestaat ook een ziekte die men Europees vuilbroed noemt, maar hier zijn zowel ziekteverwekker (*Melissococcus plutonius*), ziekteverloop als ziektebeeld enigszins anders. Zo kenmerkt AVB zich door larvenresten die lichtbruin, slijmerig, zelf lijmachtig zijn, wat zich laat opmerken als men met een wattenstaaf of houten spatel (ook met een lucifer) doorheen de larvenresten gaat: bij het terugtrekken van het object kan men de massa tot draden trekken. Deze techniek is ook gekend in imkersmiddens en wordt veelal omschreven als de 'lucifertest'. De ziekte presenteert zich evenwel niet altijd als dusdanig. Vaak sterft de larve in een vroeg stadium en wordt het kadaver door de werksterbijen snel verwijderd. Bij verdere ontwikkeling van het broed worden alleen de cellen met larven afgesloten door een wasdeksel en krijgen we een mozaïekformatie waarbij lege broedcellen worden afgewisseld met gesloten cellen. Dit klinisch beeld komt echter ook bij andere broedziekten voor. Wél kenmerkend, maar eerder zeldzaam is de situatie waarbij de honingbij pas sterft in het popstadium en uit de rotte resten de harde structuren van de pupale tong naar voor steken (Genersch, 2010).

P. larvae is een sporenvormer en deze duurstadia zijn bijzonder resistent. Temperaturen tot 100°C kunnen voor korte tijd verdragen worden (Hansen & Brodsgaard, 1999). Sporen zijn ook vele decennia levensvatbaar; het is zelfs beschreven dat larvenresten van zieke kolonies na 35 jaar de ziekte nog kunnen uitlokken (Haseman, 1961). En aangezien één enkele dode larve tot 25×10^9 sporen kan bevatten vormt een AVB-zieke bijenkast een belangrijke besmettingsbron voor de naburige kasten. De ziekte wordt trouwens uitsluitend overgedragen via dit sporenstadium. Dit komt omdat de vegetatieve cellen van *P. larvae* bijzonder gevoelig zijn voor koninginnenbrij, het secreet van de hypofaryngeale klieren waarmee jonge larven worden gevoederd (Hornitzky, 1998). De delingsstadia (= vegetatieve cellen) die samen met het voedsel via orale weg door de larven worden opgenomen zijn meestal reeds afgedood voor ze de darm bereiken; dit in tegenstelling tot de sporen die voor koninginnenbrij ongevoelig zijn (Hornitzky, 1998). Larven zijn vooral gevoelig voor infectie tot 36 uur na ontluiken; 10 sporen (of minder) zijn dan al voldoende om een fatale infectie te veroorzaken (Genersch, 2010). Vanaf 48 uren oud blijken larven meer en meer resistent (Hansen & Brodsgaard, 1999). Dit komt o.a. door de vorming van een peritrofe membraan in het lumen van de larvale darm, die het darmepitheel beschermt tegen microbiële aanval. Bij hoge infectiedosis of na vermeerdering van de kiem in het darmlumen ontstaat een omstandigheid waarbij de darmbarrière ook op latere leeftijd kan doorbroken worden. De vermeerdering van de kiem gebeurt nadien ook in de lichaamsholte, waar de larve meestal aan ten onder gaat. Degradatie van het weefsel, met inbegrip van het integumentum door microbiële enzymen geeft de larvenresten haar kenmerkende consistentie en garandeert dat na sporulatie de ziektekiem makkelijk verspreid kan worden binnen de kolonie en opgenomen door een nieuw slachtoffer (Genersch, 2010).

Virulentieverschillen binnen de species *P. larvae* zijn beschreven. Deze blijken bovendien gecorreleerd te zijn met het genotype bepaald op basis van repetitieve elementen in het

bacteriële genoom, met name de 'enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)' sequenties (Generesch *et al.*, 2006). ERIC-I en ERIC-II geven aanleiding tot de hierboven beschreven klinische beelden, daar waar ERIC-III en ERIC-IV overeenstemmen met de vroegere subspecies *pulvificiens*, verantwoordelijk voor de zgn. 'powdery scale disease' (Katznelson, 1950). Deze subspeciesindeling zorgde voor tal van controversen (de Graaf *et al.*, 2006) en wordt momenteel niet meer gebruikt. ERIC-III en ERIC-IV genotypes werden recent niet meer geïsoleerd en kunnen enkel nog worden teruggevonden in cultuurcollecties. Uit infectieproeven is gebleken dat ERIC-I minder virulent is (op larvenniveau) dan de andere genotypes. Doch, er bestaat een negatieve correlatie tussen de virulentie op larvenniveau en deze op kolonieniveau. Immers, stammen die de larven snel doden verspreiden zich minder snel in een kolonie omdat de vroege dood van de larve zorgt voor een snellere verwijdering uit de kolonie, waardoor gevaarlijk hoge sporenconcentraties niet worden bereikt (Generesch *et al.*, 2006).

Adulte honingbijen zijn niet gevoelig voor AVB (Hitchcock *et al.*, 1979; Wilson, 1971; Riessberger-Galle *et al.*, 2001). Over de gevoeligheid van de larven van andere bijen- of hommelse soorten is weinig geweten. Zo omschrijft de *Terrestrial Animal Health Code* (OIE, 2010) Amerikaans vuilbroed als een ziekte van de *Apidae*, een insectenfamilie waartoe alle bijen en hommels behoren. Doch de oorsprong van deze uitspraak is ondertussen verloren gegaan; de OIE Manual onderging in de loop der jaren opeenvolgende revisies door uiteenlopende auteurs (de Graaf, mondelinge mededeling). Bij de Afrikaanse honingbij slaat een experimentele infectie *P. larvae* aan (Danka & Villa, 1994), maar het betreft hier slechts een subspecies van de Europese honingbij (*Apis mellifera scutellata*). Het ontbreken van de rapportering van AVB in Afrika ten zuiden van de Sahara is mogelijk het gevolg van hygiënisch gedrag van deze subspecies (Fries & Raina, 2003). Hygiënisch gedrag zou ook aan de basis liggen van het uitblijven van AVB-infecties in kolonies van de Aziatische honingbij (*Apis cerana*) en dit ondanks het feit dat ook hier experimenteel de gevoeligheid voor AVB-infectie kon worden bewezen (Chen *et al.*, 2000). Het is ook het enige rapport dat we hebben kunnen vinden over een bijensoort anders dan *Apis mellifera* die gevoelig is voor *P. larvae* infecties. Bij ons weten vermeldt de wetenschappelijke literatuur geen enkel geval van AVB aanwezig in het geslacht *Bombus* of in een ander geslacht van de familie van de *Apidae*, behalve in het geslacht *Apis*. Men is van mening dat honingbijen en hommels hun eigen soorten verwante ziektekiemen herbergen. Bijvoorbeeld, *Crithidia bombi* en *Nosema bombi* infecteren hommels en zijn er niet toe in staat om honingbijen te infecteren, terwijl *Crithidia melliferum* en *Nosema apis* honingbijen infecteren en hommels niet (Ruiz-Gonzalez & Brown, 2006; Eijnde & Vette, 1993; Fries *et al.*, 2001). In recente studies over ziekteverwekkers werd echter aangetoond dat bijensoorten ten minste enkele ziekteverwekkers delen, d.w.z. een aantal RNA-virussen, zoals 'acute bee paralysis virus' (Bailey & Gibbs, 1964), 'Kashmir bee virus' (Ward *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010), 'sac brood virus' (Singh *et al.*, 2010), 'Israeli acute paralysis virus' (Singh *et al.*, 2010), 'black queen cell virus' (Singh *et al.*, 2010), en 'deformed wing virus' (Generesch *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010), maar eveneens een aantal bacteriële ziekteverwekkers zoals *Spiroplasma apis* en *Spiroplasma melliferum* (Meeus *et al.*, ingediend) en het protozoön *Nosema ceranae* (Plischuk *et al.*, 2009). Al deze ziekteverwekkers werden eerst bij honingbijen ontdekt en later eveneens bij hommels vastgesteld. Dit gedeelde palet ziekteverwekkers is eigenlijk geen verrassing als men het gedeelde habitat van hommels en honingbijen bekijkt en de ziekteverwekkers gebruiken zelfs dezelfde transmissiewegen. Er werd bewezen dat horizontale overdracht via gedeeld gebruik van een bloem een succesvolle route is waarbij verschillende ziekteverwekkers bij bijen worden overgedragen, met name *Spiroplasma* (Raju *et al.*, 1981) en *Crithidia* (Durrer *et al.*, 1994). Een andere tweede belangrijke horizontale transmissieweg van ziekteverwekkers kan zich eveneens voordoen doordat hommels de opslag van bijen gaan roven, gezien ze hiervoor gekend zijn. Kortom, de interspeciesoverdracht levert een succesvolle aanpassing op voor ziekteverwekkers van honingbijen, omdat infecties binnen een andere species niet tot een fatale afloop leidt, maar de ziekteverwekkers kunnen hierdoor wel profiteren van meer gastheren.

De resistentie van de honingbij tegenover Amerikaans vuilbroed werd intensief bestudeerd. Tal van aspecten blijken hier een rol te spelen, waaronder :

- (i) het gedrag van de bijen,
- (ii) de aangeboren immuniteit,
- (iii) de secreten van de hypofaryngeale klieren,
- (iv) de darmflora en
- (v) omgevingselementen.

Bijenkolonies die geselecteerd werden voor hygiënisch gedrag op basis van een test waarbij larven door bevriezing worden gedood, toonden een aanzienlijk hogere resistentie tegenover AVB (Spivak & Reuter, 2001). In Argentinië is op basis hiervan een heus kweekprogramma uitgetekend (Basualdo *et al.*, 2008). Recent werden de achtereenvolgende stappen van dit hygiënisch gedrag in kaart gebracht (Gramacho & Goncalves, 2009). Het onderzoek naar de genetische basis van dit gedrag kreeg onlangs een nieuwe impuls door het vinden van 'quantitative trait loci' (Oxley *et al.*, 2010) en 'binary trait loci' (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2011). Reeds vroeger werd intra-colonial genetische variatie in resistentie tegenover Amerikaans vuilbroed aangetoond, en mogelijk is het feit dat de koningin paart met meerdere darren (polyandrie) een aanpassing om de kans op een catastrofale infectieuze aandoening te beperken (Palmer & Oldroyd, 2003; Invernizzi *et al.*, 2009). In het voorbije decennium kon tevens worden aangetoond dat de leeftijdsafhankelijke resistentie tegenover Amerikaans vuilbroed niet alleen door de vorming van een peritrofe membraan wordt veroorzaakt, maar ook door een substantie die gevonden wordt in de larve (Crailsheim & Riessberger-Galle, 2001; Wedenig *et al.*, 2003). Kort daarna kon Evans aantonen dat de expressie van het antimicrobieel peptide 'abaecine' sterk is opgereguleerd 24h na orale inoculatie met *P. larvae* (Evans, 2004). ABAECINE maakt deel uit van de aangeboren immuniteit van de honingbij. De ziekte van de kolonie blijkt bovendien negatief gecorreleerd te zijn met de gen-expressie bij de werksters van dit ABAECINE. En vervolgens kon worden aangetoond dat de expressie van dit gen matig overerfbaar is en dat deze en andere 'immune traits' deel kunnen uitmaken van kweekprogramma's bedoeld om de gezondheid van de bijen te verbeteren (Decanini *et al.*, 2007). Ook de secreten van de hypofaryngeale klieren, het zgn. koninginnenbrij waarmee de larven na uitsluipen worden gevoederd, blijken antimicrobiële peptiden te bevatten die actief zijn tegenover *P. larvae* (Bachanova *et al.*, 2002). Daarnaast werden uit larven bacteriën geïsoleerd die de groei van *P. larvae* remmen (Evans & Armstrong, 2005). Bovendien kon men aantonen dat niet-pathogene bacteriën de gen-expressie van ABAECINE induceren. Er werd gesuggereerd dat toediening van zulke niet-pathogene bacteriën kunnen gebruikt worden als probiotica (Evans & Lopez, 2004). Tenslotte kon worden aangetoond dat propolis eveneens antimicrobiële activiteit tegenover *P. larvae* vertoont (Bastos *et al.*, 2008). Propolis zijn harsen afkomstig van bomen die honingbijen collecteren om kieren en spleten in de kast te dichten. Recent kon worden aangetoond dat deze harsen de expressie van immuun-genen op kolonieniveau negatief beïnvloeden (Simone *et al.*, 2009). Het is de eerste keer dat een relatie kon worden gevonden tussen omgevingselementen en de expressie van immuniteitsgenen. Het mag duidelijk zijn, de resistentie tegenover Amerikaans vuilbroed omvat vele facetten, waarvan sommigen overerfbaar zijn.

4.2. Diagnosemethodes

De diagnose van AVB kan door een directe DNA vingerafdruktechniek (polymerase chain reaction, PCR) of door voorafgaande aanrijking op vaste cultuurmedia worden uitgevoerd (de Graaf *et al.*, 2006). Directe PCR analyse kan bijvoorbeeld in geval van klinisch zieke larven (positieve 'lucifer test'). In alle andere gevallen is een aanrijking wenselijk. Vaak wordt cultivatie voorafgegaan door een hitteshock om niet-sporevormers af te doden. Omwille van de trage groeisnelheid van *P. larvae* zijn vloeibare cultuurmedia te vermijden; hierdoor zouden eventuele contaminanten de kweek overwoekeren. De kweek vertrekkende van slijmerige larvenresten resulteert vaak in confluerende groei op de plaat en eventuele contaminanten zijn eerder schaars. Bij honinganalyse daarentegen is het gebruik van semi-selectieve media noodzakelijk; toevoeging van nalidixinezuur (Hornitzky & Clark, 1991) en pipemidinezuur (Alippi, 1991; Alippi, 1995) is hier aangewezen. Bacteriekolonies met kenmerkende morfologie kunnen dan bevestigd worden via de PCR technologie. Verschillende primersets en PCR procedures werden reeds beschreven, doch de methode van Dobbelaere *et al.* (2001) heeft in het afgelopen decennium zijn specificiteit en robuustheid bewezen.

Ook biochemische karakterisatie van het pathogene agens is mogelijk. Deze benadering behoeft geen gesofisticeerde apparatuur, is goedkoop doch tijdsrovend. Veelal wordt gestart met een gramkleuring (dient positief te zijn, met herkenning van de staafvorm van de bacterie onder de microscoop), eventueel aangevuld met een catalasetest (dient negatief of uitgesteld zwak positief te zijn), waarna de reïncultuur wordt opgekweekt in aanwezigheid van specifieke carbohydraten en een pH-indicator. Een galerij met 4 suikers kan een discriminerend resultaat opleveren: zuren ontstaan met glucose en trehalose en niet met arabinose en xylose (Gordon *et al.*, 1973).

Sinds kort is een immunotest op de markt die een snelle confirmatie op het terrein mogelijk maakt (Vita Europe). Deze test werkt alleen als van de larvenresten de kenmerkende slijmdraden kunnen worden getrokken. Voor een meer uitgebreide bespreking van de diagnostische mogelijkheden verwijzen we graag naar het overzichtsartikel van de Graaf *et al.* (2006) en naar de *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011* (OIE, 2011).

4.3. Reglementaire bepalingen

Op Europees vlak vermeldt de Richtlijn 82/894/EEG inzake de melding van dierziekten in de Gemeenschap de bijenkastkever (*Aethina tumida*) en de *Tropilaelaps*smijt voor wat de bijen betreft, maar omvat geen enkele bepaling voor hommels.

De Richtlijn 92/65/EEG tot vaststelling van de veterinairerechtelijke voorschriften voor het handelsverkeer en de invoer in de Gemeenschap van dieren, sperma, eicellen en embryo's waarvoor ten aanzien van de veterinairerechtelijke voorschriften geen specifieke communautaire regelgeving als bedoeld in bijlage A, onder I, van Richtlijn 90/425/EEG geldt, stelt in artikel 8 :

"De Lid-Staten zien erop toe dat bijen (Apis mellifera) slechts voor het handelsverkeer bestemd mogen worden indien zij aan de volgende eisen voldoen:

a) zij moeten afkomstig zijn uit een gebied waarvoor geen verbod wegens Amerikaans vuilbroed geldt.

Het verbod geldt voor ten minste 30 dagen vanaf het ogenblik waarop het laatste geval is geconstateerd en waarop alle bijenkasten binnen een straal van drie kilometer door de bevoegde autoriteit zijn gecontroleerd en alle besmette bijenkasten zijn verbrand of ten genoegen van deze bevoegde autoriteit zijn behandeld en gecontroleerd.

Volgens de procedure van artikel 26 en na advies van het Wetenschappelijk Veterinair Comité, kunnen de eisen voor bijen (Apis mellifera) of gelijkwaardige eisen worden toegepast voor hommels;

b) zij moeten vergezeld gaan van een gezondheidscertificaat volgens het model van bijlage E waarvan het attest moet zijn ingevuld door de bevoegde autoriteit, ten einde te verklaren dat is voldaan aan de eisen onder a)."

In deze Richtlijn wordt Amerikaans vuilbroed toegevoegd als aangifteplichtige dierenziekte voor bijen (cf. Bijlage A van deze Richtlijn).

Deze Richtlijn legt eveneens het gebruik op van het gezondheidscertificaat 92/65/EI voor het handelsverkeer in bijen en hommels (cf. bijlage E van deze Richtlijn, tweede deel). Wat Amerikaans vuilbroed betreft, wordt hierin het volgende vermeld :

"de bijen/hommels komen uit een gebied waarvoor geen verbodsmaatregel geldt in verband met de aanwezigheid van Amerikaans vuilbroed (een eventuele verbodsmaatregel blijft van toepassing tot ten minste 30 dagen na de datum waarop het laatste geval is geconstateerd en na de datum waarop alle bijenkasten en -korven binnen een straal van drie kilometer door de bevoegde autoriteit zijn gecontroleerd en alle besmette kasten en korven zijn verbrand dan wel zijn behandeld en door de bevoegde autoriteit ziektevrij zijn bevonden),

of,

de hommels komen uit een van de omgeving geïsoleerde voorziening die door de bevoegde autoriteit van de lidstaat is erkend en onder haar toezicht staat, vrij van Amerikaans vuilbroed is en onmiddellijk vóór de verzending is geïnspecteerd en noch de hommels noch hun broed vertonen klinische symptomen of geven aanleiding tot vermoedens van deze ziekte."

De sanitaire overheden van de verschillende lidstaten werden gecontacteerd in het kader van dit dossier en ze hebben allemaal geantwoord dat geen enkele specifieke wettelijke vereiste voor hommels is opgelegd.

Op Belgisch niveau verwijst het koninklijk besluit van 25 april 1988 naar Amerikaans vuilbroed, Europees vuilbroed, acariose, varroase, kleine bijenkastkever (*Aethina tumida*) en de *Tropilaelaps*smijt als aangifteplichte ziekten voor bijen, maar het koninklijk besluit bevat geen bepaling voor hommels.

Het koninklijk besluit van 7 maart 2007 betreffende de bestrijding van de besmettelijke ziekten van de bijen bepaalt dat de zes voormelde ziekten onderworpen zijn aan een officiële bestrijding, maar bevat evenmin een bepaling voor hommels.

Het ministerieel besluit van 31 augustus 1993 tot vaststelling van de veterinairerechtelijke voorschriften voor het handelsverkeer en de invoer van dieren, sperma, eicellen en embryo's vermeldt namelijk in artikel 10 :

"Bijen (Apis mellifera) mogen slechts in het handelsverkeer gebracht worden indien zij aan de volgende eisen voldoen :

- a) *Zij moeten afkomstig zijn uit een gebied waarvoor geen verbod wegens Amerikaans vuilbroed geldt. Het verbod geldt voor tenminste dertig dagen vanaf het ogenblik waarop het laatste geval is vastgesteld en waarop alle bijenkasten binnen een straal van drie kilometer door de bevoegde consulent voor de bijenteelt zijn gecontroleerd en alle besmette bijenkasten zijn verbrand of ten genoegen van de bevoegde consulent voor de bijenteelt zijn behandeld en gecontroleerd. Het hoofd van de Dienst bepaalt de vereisten waaraan hommels moeten voldoen;"*.

Tot op heden werd geen enkele vereiste voor hommels vastgelegd.

Op internationaal vlak blijkt dat de Werelddierengezondheidsorganisatie (OIE) specifieke vereisten voor hommels binnen de 2 jaar zal uitwerken.

4.4. Bestrijdingsmethodes

4.4.1. Bioveiligheidsmaatregelen

De bioveiligheidsmaatregelen worden genomen om het risico op insleep van pathogene agentia in individuele productie-eenheden (bio-exclusie) evenals om het risico op overdracht naar buiten toe tot een minimum te herleiden (bio-containment) en de verdere verspreiding van deze agentia. Hierbij worden meer bepaald een houding en een gedrag aangenomen waardoor deze risico's tot een minimum worden herleid. In grote hommelskwekerijen wordt een bijkomstige compartimentering van de productie in onderafdelingen vereist om de overdracht van ziekteverwekkers binnen het bedrijf zelf tot een minimum te herleiden (bio-compartimentering).

In de praktijk dient de productie te worden gecompartmenteerd waarbij de hommels niet naar buiten kunnen ontsnappen en bijen niet kunnen binnendringen (cf. punt 5.2.).

Zoals hierboven vermeld zijn de sporen van *P. larvae* zeer resistent en kunnen gedurende een lange termijn (tot meer dan 35 jaar) infectieus blijven (Haseman, 1961). De desinfectie van materiaal is derhalve een cruciale stap in de beheersing van AVB, voornamelijk na een klinische uitbraak waarbij een extreem hoog aantal sporen worden gevormd. Een dergelijke ontsmetting kan gebeuren met producten gebaseerd op natriumhypochloriet (NaOCl), glutaraldehyde of formaldehyde. Een efficiënte desinfectie waarbij ook de sporen afgedood worden die zich niet direct aan de oppervlakte van het houten materiaal bevinden, wordt evenwel enkel bereikt met oplossingen met een concentratie van 50 % of hoger (Dobbelaere *et al.*, 2001). Ter herinnering, kunnen alleen de biociden (= ontsmettingsmiddelen) die in België toegelaten zijn en die tot groep 1 "*Ontsmettingsmiddelen en algemene biociden*" behoren, gebruikt worden (cf. de lijst van de toegelaten biociden aan het volgend adres: <http://www.health.belgium.be/eportal/Environment/Chemicalsubstances/Biocids/index.htm>).

Deze groep 1 bevat de producten van types 1 t.e.m. 5, namelijk de "*Biociden voor menselijke hygiëne*", de "*Desinfecterende middelen voor privé-gebruik en voor de openbare*

gezondheidszorg en andere biociden”, de “Biociden voor veterinaire hygiënedoeleinden”, de “Ontsmettingsmiddelen voor gebruik in de sector voeding en diervoeders” en de “Ontsmettingsmiddelen voor drinkwater”. Ook met warmte kunnen sporen afgedood worden. Daartoe kan men een open vlam gebruiken, of materiaal onderdompelen in hete paraffine. Een efficiënte afdoding van dieper in hout gelegen AFB-sporen wordt niet bereikt met een open vlam, doch wel door onderdompeling in paraffine van 160°C of hoger (Dobbelaere *et al.*, 2001). Natte sterilisatie doodt alle sporen aan de oppervlakte, maar laat nog een beperkt aantal infectieuze interne sporen (Dobbelaere *et al.*, 2001). In het kader van het kweken van hommels, zal men het gebruik van houten materiaal derhalve uit voorzorg vermijden en men zal het gebruik van gemakkelijk te reinigen en te desinfecteren materiaal (vb. gegalvaniseerde stalen planken) of voor eenmalig gebruik (vb. plastic houder voor de productie van één enkele kolonie) bevoorstellen.

De kweek-, verpakkings- en opslaglokalen dienen ook regelmatig gereinigd en gedesinfecteerd te worden, ten minste na elke productiecycclus.

De personeelsleden, evenals bezoekers aan de kweekeenheden, dienen ook de hygiënerregels na te leven, zoals het wassen/desinfecteren van de handen, het dragen van een schort, kapje en overschoenen, de ontsmetting van de schoenen alvorens de verschillende productiecompartimenten binnen te treden.

4.4.2. Antibioticagebruik

Sommige bijenziekten en -plagen kunnen met antibiotica of chemotherapeutische middelen worden aangepakt. Een volledig overzicht van de relevante antimicrobiële middelen in de bijenteelt werd gegeven door Reybroeck (2010) en Reybroeck *et al.* (2012).

Talrijke auteurs hebben over de doeltreffendheid van verschillende antibiotica en chemotherapeutische agentia geschreven teneinde Amerikaans vuilbroed (AVB) te weren.

Oxytetracycline (OTC), gewoonlijk onder de vorm van hydrochloride, wordt sinds begin jaren 50 in een aantal landen in de bijenteelt gebruikt voor de behandeling van bacterieziekten in het broed zoals AVB (Hopingarner & Nelson, 1987; Spivak, 2000). Terramycin® (oxytetracycline hydrochloride) (Phibro Animal Health, Ridgefield Park, NJ) was lange tijd de enige erkende behandeling voor broedziekten in de Verenigde Staten (Anon., 2010). Tegenwoordig zijn in de Verenigde Staten tal van andere diergeneesmiddelen die OTC als basisingrediënt bevatten en die door de Food and Drug Administration (FDA) erkend zijn voor gebruik in de bijenteelt.

Streptomycine is een antibioticum behorend tot de aminoglycosiden en wordt in de bijenteelt gebruikt om bijen tegen een reeks broedziekten te beschermen. Ondanks het feit dat het geneesmiddel in vele landen (EU, USA) niet toegelaten is, wordt het gebruik ervan vaak gesuggereerd in fora en in handboeken voor bijenteelt. In China waren streptomycine en chlooramfenicol (het gebruik van dit antibioticum is ook binnen de EU verboden, zie hieronder) de belangrijkste antibiotica bij de bestrijding van een grote haard van AVB in 1997 (Ortelli *et al.*, 2004).

Het gebruik van sulfonamiden om bijen te beschermen tegen bacterieziekten is een normale praktijk geworden in de commerciële bijenteelt nadat Haseman & Childers (1944) vonden dat sulfonamiden en vooral sulfathiazole de verspreiding van ABV kon tegengaan. Op korte termijn werd de bijenziekte veroorzaakt door *P. larvae* ingedijkt door het bestanddeel sulfathiazole waardoor de symptomen verdwenen. De ontkieming van de reproductieve sporen worden hierdoor eveneens belemmerd. Het gebruik van sulfonamiden bij het voederen van bijen in de lente en de herfst werd eveneens door andere auteurs aangemoedigd (Eckert, 1947; Reinhardt, 1947; Johnson, 1948; Katznelson & Gooderham, 1949; Katznelson, 1950). Ondanks de doeltreffendheid van sulfonamides tegen AVB, stelden er zich problemen met de stabiliteit ervan en de hieruit voortvloeiende residuen in honing. Sinds de jaren 70 is er hierover niets meer geregistreerd (Shimanuki & Knox, 1994).

Tylosine, een antibioticum behorend tot de macroliden, werd in de bijenteelt algemeen gebruikt. Verschillende auteurs hebben de doeltreffendheid ervan aangetoond (Hitchcock *et al.*, 1970; Moffett *et al.*, 1970; Peng *et al.*, 1996; Pettis & Feldlaufer, 2005). Tylosine bleek stabiel in suikersiropen dan OTC (Kochansky *et al.*, 1999). In oktober 2005 bekwam in de Verenigde Staten Tylan Soluble[®] (Elanco Animal Health, Indianapolis, IN), meer bepaald tylosinetartraat, wel de erkenning van het FDA voor de behandeling van actief AVB, maar niet voor preventief gebruik in gezonde kolonies. Het gebruik van tylosine bij AVB werd aangemoedigd nadat *Paenibacillus* tetracyclineresistentie vertoonde.

Erythromycine, een ander macrolide, werd in 1955 voor de eerste maal getest (Katznelson *et al.*, 1955; Katznelson, 1956). In de literatuur werd erythromycine als doeltreffend omschreven (Machova, 1970; Okayama *et al.*, 1996), terwijl andere auteurs van mening waren dat het tegen AVB niet efficiënt was.

Lincomycine maakt deel uit van de lincosamidengroep. Het effect hiervan bij *P. larvae* werd door een aantal auteurs beschreven (Okayama *et al.*, 1996; Kochansky *et al.*, 2001). Lincomycine werd samen met tylosine getest als geneesmiddel dat mogelijks een erkenning van de FDA kon bekomen voor de bestrijding van tetracyclineresistente AVB. Lincomycine was efficiënt in de bestrijding van AVB wanneer het als poedersuiker aan bijenkolonies werd toegediend. De erkenning van het FDA zelf is nog steeds lopende.

Chlooramfenicol (CAP) is een krachtig breedspectrumantibioticum en is potentieel carcinogeen. Het gebruik ervan bij voedselproducerende dieren, met inbegrip van bijen, is sinds 1994 in de Europese Unie verboden (Verordening (EG) van de Commissie nr. 1430/94). In 1997-1998 werden in China honderdduizenden bijenkasten en -bijenkorven door AVB geïnfecteerd en door de imkers met CAP of streptomycine behandeld om zo hun kasten en korven evenals hun industrie te redden (Ortelli *et al.*, 2004).

Andere antibiotica en chemotherapeutische agentia zouden eveneens kunnen worden gebruikt in de bestrijding van AVB. Machova (1970) verkreeg een goede sensibiliteit van *P. larvae* aan bacitracine, een polypeptide antibioticum. De isolaten van *P. larvae* getest door Okayama *et al.* (1996) waren gevoelig voor macroliden. Microsamicine bleek de meest efficiënte stof onder de macroliden te zijn. Kochansky *et al.* (2001) hebben alternatieve antibiotica voor OTC-resistente *P. larvae* getest. Rifampicine, een bacteriëndodend antibioticum behorend tot de groep van rifamycines, was veruit het meest actief antibioticum dat getest werd; monensin (een antibioticum behorend tot de ionoforen) en voormelde erythromycine, tylosine en lincomycine bleken eveneens *in vitro* actief tegen de resistente stammen van *P. larvae*. In een latere studie (Kochansky & Pettis, 2005) werden andere antimicrobiële stoffen getest. Pirlimycine (lincosamide) en tiamuline, een antibioticum behorend tot de pleuromutilines, vertoonden een verhoogde activiteit *in vitro*, maar hebben eenzelfde werkingsprincipe als tylosine en bieden daarom geen voordeel. De efficiëntie van tilmicosine, een antibioticum behorend tot de macroliden, tegen AVB *in vitro* en *in vivo* werd door Reynaldi *et al.* (2008) gerapporteerd. De lijst met doeltreffende alternatieve stoffen voor oxytetracycline en tylosine bij de behandeling van AVB is zeer beperkt. Ondanks het feit dat sommige farmaceutische producten een potentiële alternatieve behandeling tegen AVB lijken te vertonen, zijn er tot op heden geen aanwijzingen dat bacitracine, microsamicine, rifampicine, monensin, pirlimycine, tiamuline en tilmicosine in de bijenteelt worden gebruikt.

Wat het gebruik van antibiotica en chemotherapeutische agentia bij Amerikaans vuilbroed betreft, is het belangrijk rekening te houden met het volgende :

- Antibiotica kunnen enkel de ziekte afzwakken, maar niet elimineren, daarom moeten, in de hypothese dat antibiotica worden aangewend, geïnfecteerde bijenkasten en -korven of hommelskolonies voortdurend worden behandeld als preventie tegen een haard van AVB. De geneesmiddelen doden niet de sporen van *P. larvae*, die zich in de geïnfecteerde en dode en uitgedroogde larven bevinden die aan de celwanden kleven en die zeer besmettelijk zijn en jaren kunnen overleven.
- Het gebruik van antibiotica in het kader van het kweken van hommels kan een resistentie aan de stammen van *Paenibacillus* vergroten, net zoals het intensief gebruik van tetracyclines in de professionele bijenteelt in de VS (Miyagi *et al.*, 2000), in Canada (Colter, 2000), en in Argentinië (Alippi, 2000) leidde tot *Paenibacillus*-

- stammen die resistent zijn aan tetracyclines. Er bestaat momenteel een algemene bezorgdheid m.b.t. een wijdverspreide resistentie tegen tetracyclines.
- Het antibioticagebruik in de bijenteelt geeft aanleiding tot hoge residugehaltes in honing waardoor die gedurende lange periodes uit de handel genomen dient te worden. Aangezien bijen worden geklasseerd onder de voedselproducerende dieren in de EU, is het vaststellen van een maximale residu limiet (MRL) voor honing noodzakelijk alvorens aan een diergeneesmiddel de toelating voor verhandeling kan worden toegekend. Hommels worden gekweekt voor bestuivingsdoeleinden en niet voor de honingproductie en worden derhalve niet onderworpen aan de wetgeving voor voedselproducerende dieren. In elk geval moet elke mogelijkheid van overdracht van antimicrobiële residuen vanuit hommelskwekerijen naar kasten en korven voor honingproductie worden vermeden.
 - Ter herinnering kunnen alleen de op nationaal of op Europees vlak vergunde geneesmiddelen voor diergeneeskundig gebruik gebruikt worden, in overeenstemming met het koninklijk besluit van 23 mei 2000. Het Federaal Agentschap voor Geneesmiddelen en Gezondheidsproducten (FAGG) biedt meer informatie hieromtrent (cf. http://www.fagg-afmps.be/nl/DIERGENEESKUNDIG_gebruik/).
 - Indien nodig zou het watervalstelsel (= cascadesysteem) toegepast kunnen worden, in overeenstemming met het koninklijk besluit van 14 december 2006. Dit systeem biedt aan de behandelende dierenarts de mogelijkheid om af te wijken van het strikte gebruik van in ons land geregistreerde geneesmiddelen. Zo is het enerzijds mogelijk om een geneesmiddel voor een andere diersoort of voor een andere aandoening te gebruiken. Anderzijds kan de dierenarts ook een diergeneesmiddel dat vergund is in een andere Europese lidstaat, een geneesmiddel voor menselijk gebruik en zelfs een magistrale bereiding voorschrijven. Het Federaal Agentschap voor Geneesmiddelen en Gezondheidsproducten (FAGG) biedt meer informatie hieromtrent (cf. http://www.fagg-afmps.be/nl/DIERGENEESKUNDIG_gebruik/).

4.5. Risicofactoren

Wat de eventuele besmetting van hommels door sporen en/of vegetatieve cellen van AVB in de kwekerijen werden volgende risicofactoren geïdentificeerd :

- het gebruik van besmet stuifmeel van de stuifmeelkorfjes (= oogst van de bijen) en/of honing en/of suikersiroop om hommelskolonies te voederen;
- het gebruik van besmette wilde hommels/bijen om een nieuwe productiecycclus te beginnen (vb. : bij productie van een nieuwe species).
- De besmetting door het personeel die kolonies in groei behandelen en/of door bezoekers aan de kwekerij;
- Besmetting via het materiaal gebruikt bij het kweken.

De gekweekte hommels, die eventueel besmet zijn met sporen en/of vegetatieve cellen van AVB kunnen na verkoop op hun beurt honingbijen besmetten :

- ofwel doordat ze eenzelfde bloem bezoeken of aan eenzelfde waterbron drinken;
- ofwel doordat bijen de voedselresten afkomstig van hommelskwekerijen gaan roven (vb. suikersiroop in de afleverdozen van hommelskolonies);
- ofwel door contact met reeds gebruikt en besmet materiaal in de kwekerij;
- ofwel ingevolge direct contact tussen deze hommels en honingbijen.

De verschillende geïdentificeerde risicofactoren worden in figuur 1 weergegeven en hierna gespecificeerd.

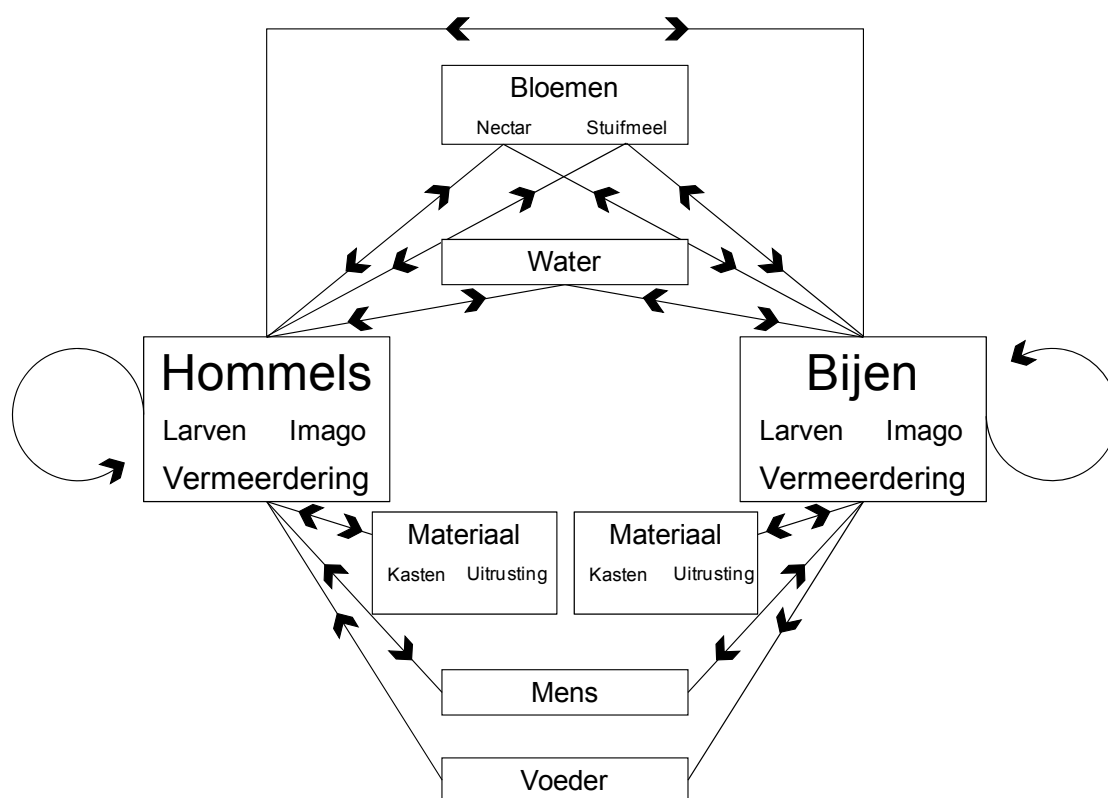
De 'mens' als risicofactor betekent het risico op overdracht van AVB van gekweekte hommels op honingbijen en vice versa door hommelskwekers, imkers en bezoekers aan kweekcentra of imkerijen (die fungeren als levende vector).

Een indirecte overdracht van AVB tussen gekweekte hommels en honingbijen via een ander insect (of geleedpotige) werd niet als pertinent weerhouden, gezien, voor zover momenteel geweten is, er voor beide species geen gemeenschappelijke ectoparasieten bekend zijn.

Onder de term 'Voeding' wordt stuifmeel en suikersiropen voor vervoeding en eventueel de honing en de bijenlarven verstaan.

Op het vlak van het kweken zelf is een besmetting van hommels op hommels mogelijk ofwel wanneer koninginnen worden gekweekt en wilde mannelijke hommels worden gebruikt voor de bevruchting, ofwel indien kweekmateriaal wordt ingevoerd om een nieuw hommelras uit te breiden. Immers een mogelijk scenario is dat wilde hommels een "dode" kast zonder verdediging beroven. Indien deze kast geïnfecteerd is met vegetatieve cellen en/of met sporen van AVB, kunnen de wilde "rover" hommels worden besmet. Indien deze laatste daarna worden gebruikt in het kader van de hommelkweek kunnen deze AVB overdragen.

Hoewel dit niet het voorwerp is van dit dossier, is een besmetting van bij op bij mogelijk op het niveau van het gedrag van de bijen ingevolge roverij, het zwermen, aankoop/uitwisseling van koninginnen, uitzetten van de kasten op een andere plaats, bijebrengen van de kasten of zelfs verwijdering van de kasten.



Figuur 1: Schematische voorstelling van alle risicofactoren m.b.t. de infectie van honingbijen door sporen en/of vegetatieve cellen van Amerikaans vuilbroed via gekweekte hommels en vice-versa.

5. Risicoevaluatie

5.1. Identificatie van de verspreiding (pathways)

Over het algemeen en zoals gesteld in punt 4.1., is het verspreidingsrisico via vegetatieve cellen van AVB verwaarloosbaar in vergelijking met het risico via sporen. De eerste zijn immers beduidend minder resistent dan de tweede. Er wordt dus geacht dat de ziekte bijna exclusief onder de vorm van sporen wordt overgedragen.

5.1.1. Tijdens de kweekperiode van de hommels

Wat de hommelkweekeenheden betreft worden in figuur 2 de verschillende verspreidingsroutes van AVB tussen gekweekte hommels en honingbijen weergegeven.

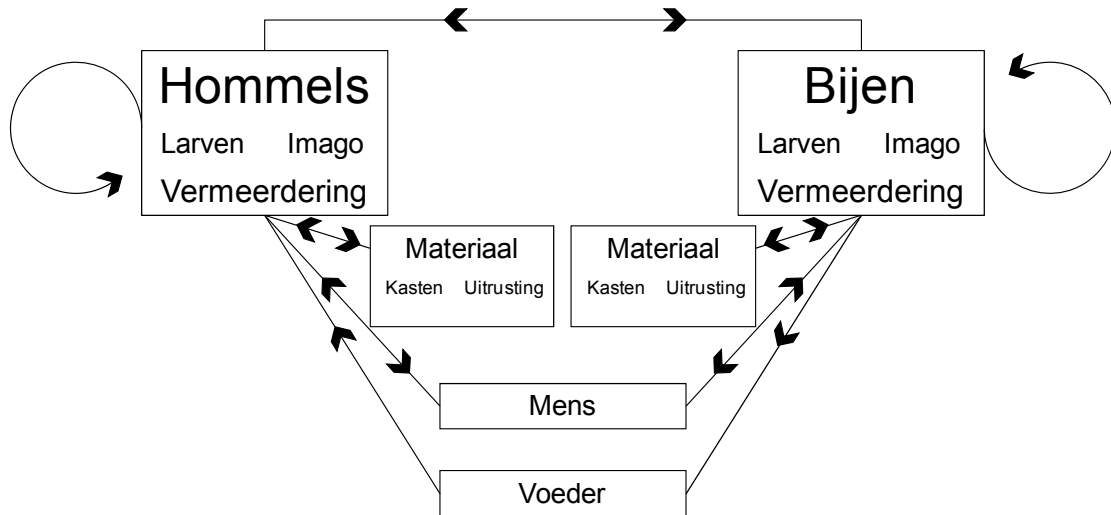
Binnen deze kweekeenheden, is het risico op overdracht van AVB tussen hommels en bijen via bloemen en/of water *a priori* onbestaand. Dit is juist voor zover de elementaire bioveiligheidsregels bij het kweken van hommels worden nageleefd. Dit betekent namelijk dat de productie dient te worden gecompartmenteerd waarbij de hommels niet naar buiten kunnen ontsnappen en bijen niet kunnen binnendringen (cf. punt 4.4.1.).

Wat het materiaal betreft, dat vermoedelijk verschillend is bij het kweken van hommels, of het gedrag van het bijenvolk, is het risico van overdracht van AVB tussen hommels en bijen eveneens *a priori* onbestaand als het materiaal gebruikt voor het kweken van hommels buiten het bereik van bijen wordt gehouden. Er bestaat evenwel een risico bij gekweekte hommels waarbij AVB wordt overgedragen ingeval eventueel besmet materiaal, gebruikt bij het kweken van hommels, opnieuw wordt gebruikt bij het opkweken van andere hommels. Hetzelfde overdrachtrisico bestaat ook bij honingbijen gezien het materiaal voor bijenteelt over het algemeen opnieuw wordt gebruikt.

In de professionele hommelkwekerijen is er praktisch geen contact tussen de gekweekte hommels en de buitenwereld of de habitat van bijen. Elk extern contact wordt vermeden door een in-house kweekstelsel (vanaf de voortplanting tot het eindproduct, gaande van overwintering, initiatie en ontwikkeling van de kolonie). Hierna geven wij een samenvatting van die paar plaatsen in de keten waar er contact is tussen de buitenwereld en de habitat van bijen :

1. Bij het binnenbrengen van nieuw genetisch materiaal :
Kweekcentra geven hieromtrent niet gemakkelijk informatie. Officieel delen zij mee dat er geen nieuw genetisch materiaal nodig is om hun massale kweek te garanderen. Maar aan een andere kant stellen zij dat nieuwe hommelkoninginnen eerst in quarantaine worden geplaatst wanneer ze worden binnengebracht. Bovendien verduidelijken ze dat kolonies en dochterkoninginnen gekeurd kunnen worden vóór ze in een massakweekeenheid worden binnengebracht.
2. Contact met personeelsleden en/of bezoekers :
Er worden voorzorgsmaatregelen genomen (cf. 4.4.1.), voornamelijk om elke besmetting van één kweekkamer naar een andere te beletten.
3. Voedingsbronnen :
De voedselbron, met name de suikersiropen voor het voederen, is gegarandeerd vrij van AVB. De eiwitbron is het door bijen verzameld stuifmeel, dat sporen van AVB kan bevatten. Het stuifmeel dat in kweekcentra wordt gebruikt is het stuifmeel dat van de stuifmeelkorfjes (corbicula) van de haalbijen afvalt wanneer ze de kast binnenkomen en er dus geen direct contact bestaat met de sporen afkomstig van geïnfecteerde larven (sporen van larven → voederbijen → haalbijen → stuifmeelkorfjes). Bij ons weten werd *P. larvae* niet vastgesteld in het stuifmeel van de stuifmeelkorfjes. Maar wel werden *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008) en ARN-virussen (Singh *et al.*, 2010) teruggevonden in stuifmeel van de corbicula en *P. larvae* in honing (Bakonyi *et al.*, 2003).
4. Initiatie van de kolonie :
In sommige kweekbedrijven wordt een honingbij samen met de hommelkoningin bijeengebracht om de leg te initiëren. Maar bij ons weten is deze techniek niet wijdverspreid en staat ze ter discussie omwille van het feit dat pathogenen mogelijk worden overgedragen.

Tot besluit, als AVB niet van nature voorkomt bij hommels, is het door bijen verzameld stuifmeel de belangrijkste insleepweg in kolonies.



Figuur 2: Schematische voorstelling van de verspreidingsroutes van Amerikaans vuilbroed tussen gekweekte hommels en honingbijen tijdens hun opkweek (= vóór de verkoop).

5.1.2. Na de verkoop van gekweekte hommels

Na de verkoop van gekweekte hommels, d.w.z. wanneer ze worden ingezet, is over het algemeen het risico op overdracht van AVB op honingbijen *a priori* hoger, gezien er meer contact mogelijk is tussen beide groepen. De verschillende verspreidingsroutes van AVB tussen beide groepen wanneer hommels worden ingezet worden in figuur 3 weergegeven.

De situatie met het hoogste risico op directe of indirecte overdracht van AVB van hommels op bijen doet zich voor wanneer beide insectensoorten gelijktijdig in een afgesloten milieu worden ingezet (vb. hommels en bijen in bepaalde serres).

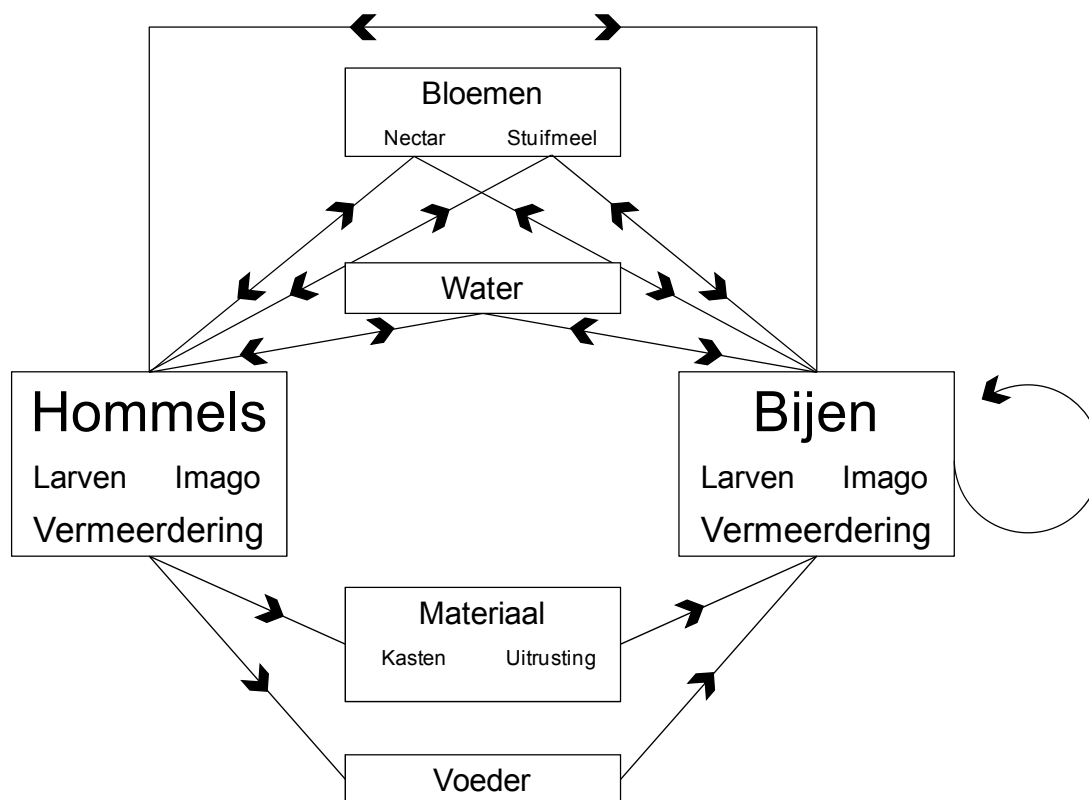
Indien in de natuur *Bombus* sp. zou geïnfecteerd worden met AVB, dan zou ze waarschijnlijk niet de bijzondere klinische symptomen vertonen als deze die bij bijen worden aangetroffen. Een minder uitgesproken beeld qua besmetting kon gemakkelijk onopgemerkt blijven in de weinige studies over hommels, zoals de prevalentie van *Spiroplasma apis* bij Europese hommels die onlangs aan het licht kwam (Meeus *et al.*, ingediend). Bij ons weten werden er geen belangrijke controleacties (screening) uitgevoerd ter opsporing van de vector van AVB, *P. larvae*. Anderzijds, in recente studies werd beroep gedaan op een unbiased screeningmethode van darmbacteriën bij verschillende hommelspecies, maar *P. larvae* kon niet worden aangetoond (Koch & Schmid-Hempel, 2011; Martinson *et al.*, 2011). Tot besluit, indien hommels door *P. larvae* kunnen worden geïnfecteerd, zou die waarschijnlijk geen aanleiding geven tot klinische symptomen, omdat die tot nu toe onopgemerkt bleef.

Vroeger werd gedacht dat de sporen van *P. larvae* kiemden aan één van de uiteinden van de middelste darm (of mesenterium) van de bijenlarven, vlak na de ingang van de middelste darm, en dat deze sporen door fagocytose doorheen het epitheel gaan. Recente studies hebben echter aangetoond dat ze op eender welke plaats in de middelste darm kiemen en dat de vegetatieve cellen (bacteriën) de middelste darm van de larve overspoelen waar ze zich massaal vermenigvuldigen als commensaal van het door de larve geconsumeerd voedsel. In een later stadium, wanneer de middelste darm niets anders meer bevat dan deze pathogene bacteriën, dringen ze doorheen het intestinaal epitheel en 'barsten' ze buiten de darm open in de buikholte, waardoor de larve ineens sterft (Yue *et al.*, 2008; Genersch, 2008). Gezien deze bacteriën in de eerste infectiefases als een commensaal leeft, is het meer dan waarschijnlijk dat ze andere gastingecten infecteren. De meest kritieke fase bij het wisselen van gastheer is het feit dat de sporen al dan niet kunnen kiemen, maar ze hoeven de darm van de larve niet binnen te dringen om die te koloniseren. Er moet nog worden vastgesteld of de sporen, als ze niet in de darm kunnen ontkiemen, nog besmettelijk zijn nadat ze het darmstelsel van de hommels verlaten hebben. *Crithidia bombi*, bijvoorbeeld, kan

bijen niet infecteren, maar kan wel door doorgang door het darmstelsel overleven en is daarna nog in staat zijn om hommels te infecteren (Ruiz-Gonzalez & Brown, 2006).

Wij hebben hierboven verduidelijkt dat het gedeelde bloemenbezoek en de roofacties de belangrijkste overdrachtsroutes van pathogenen tussen bijen en hommels vormen. Roofbijen worden beschouwd als een belangrijke vector bij het overdragen van AVB tussen bijenkolonies (Genersch *et al.*, 2008). Maar roofhommels komen in contact met *P. larvae* en kunnen mogelijk ook hun nest infecteren.

Tot besluit, hommelskolonies kunnen in contact komen met *P. larvae*, aangezien bijen en hommels een overlappende habitat hebben en aangezien hommels bekend staan als rovers van bijenreserves. *P. larvae* leven als commensaal in de eerste fases van de infectie, waardoor de interspecies infectie steeds meer mogelijk wordt, maar niet gegarandeerd is.



Figuur 3: Schematische voorstelling van de verspreidingsroutes van Amerikaans vuilbroed tussen gekweekte hommels en honingbijen wanneer ze worden ingezet (= na de verkoop).

5.2. Identificatie van de opties voor de beheersing van de ziekte

Aangezien antibiotica niet efficiënt zijn tegen de sporen van AVB, moet het accent worden gelegd op preventie m.b.t. de besmetting van gekweekte hommels, zodat ze op hun beurt, wanneer ze worden ingezet, geen besmettingsbron voor honingbijen vormen. Daarom wordt aangeraden alle nodige bioveiligheidsmaatregelen te nemen binnen de kweekseenheden. Door de infrastructuur en de uitrusting van deze eenheden zou bijvoorbeeld elke toegang van een wild insect (vb. bijen en hommels) moeten worden verhinderd, evenals elk contact tussen de verschillende geproduceerde partijen/kolonies van hommels (vb. : afzonderlijke productie van de verschillende hommelssoorten) teneinde een eventuele verspreiding van de ziekte in een kweekseenheid te vermijden (= naleving van het principe van compartimentering van de productie). Binnenkomende producten uit de bijenteelt, zoals stuifmeel, die door sporen en/of vegetatieve cellen van AVB kunnen besmet zijn, zouden moeten worden vermeden of aan een analyse onderworpen en, indien nodig, ontsmet voor gebruik (vb. : behandeling door gamma stralen van het stuifmeel). De andere binnenkomende producten zouden aan een

analyse moeten worden onderworpen teneinde elke eventuele besmetting op te sporen en zouden eveneens moeten worden ontsmet, indien nodig. De kweek-, verpakkings- en opslaglokalen zouden regelmatig moeten worden gereinigd en gedesinfecteerd, ten minste na elke productiecycli. De personeelsleden, evenals bezoekers aan de kweekeenheden, zouden de hygiëneregels moeten naleven, zoals het wassen/desinfecteren van de handen, het dragen van een schort, kapje en overschoenen, de ontsmetting van de schoenen alvorens de verschillende productiecompartimenten binnen te treden.

Het eventueel gebruik van antibiotica bij de bestrijding van AVB bij gekweekte hommels mag slechts bij gelegenheid, in geval van een haard, worden overwogen. Ter herinnering, tot nu toe is dit nog nooit nodig geweest, zeker niet systematisch, gezien dan het gevaar op resistente stammen.

6. Aanbevelingen

Teneinde de wetenschappelijke kennis te verbeteren, is het noodzakelijk de kans te bestuderen dat gekweekte hommels door vegetatieve cellen en/of sporen van AVB worden besmet, dat ze deze multipliceren en verspreiden (vb. zijn ze werkelijk geïnfecteerd door AVB of gaan de sporen enkel doorheen hun darmstelsel ?) en dat ze de ziekte ontwikkelen (vb. indien dit wel het geval is, wat is de besmettelijke dosis ?). Het is eveneens noodzakelijk na te gaan in welke concentraties *P. larvae* terug te vinden is in het corbicula stuifmeel of in de honing.

Teneinde zich uit te spreken over het risico op overdracht van AVB van gekweekte hommels op honingbijen, is het ideaal gezien nodig om in een afgesloten milieu infectietests uit te voeren.

Het is eveneens nodig een gedetailleerd onderzoek uit te voeren hoe de resistentie op AVB werkt en hoe dit op een verschillende manier tot uiting komt bij de verschillende species van bijen en hommels.

In het kader van de goede hommelteeltpraktijken wordt aangeraden binnenkomende stoffen, meer bepaald het stuifmeel, te ontsmetten. Dit laatste kan worden gesteriliseerd door middel van gamma stralen, maar er werd vastgesteld dat dan de nutritionele kwaliteit significant verminderd was, wat leidde tot een lagere productie op het vlak van de hommelteelt. Een grondige analyse van de voor- en nadelen van dit soort behandeling blijkt dus noodzakelijk voordat de toepassing ervan op stuifmeel al dan niet kan worden aanbevolen.

Teneinde het risico op overdracht van AVB op gekweekte hommels te beperken, wordt aanbevolen om het gebruik van voeder afkomstig van honingbijen voor het voederen van hommels te vermijden.

In het kader van de goede hommelteeltpraktijken en teneinde beter de overdracht van besmettelijke agentia en/of parasieten te bestrijden, wordt aangeraden de productie maximaal te compartimenteren (= bioveiligheidsregel).

Teneinde AVB bij gekweekte hommels te bestrijden, zou antibiotica kunnen worden toegediend via gesuikerde voeding. Ten opzichte van honingbijen is de problematiek van antibioticaresiduen in honing natuurlijk niet in dezelfde mate acuut voor hommels. Er moet evenwel worden opgemerkt dat antibiotica doeltreffend zijn tegen de vegetatieve cellen van AVB, maar niet tegen de sporen die op lange termijn een probleem kunnen stellen. Bovendien zou het antibioticagebruik de oorzaak kunnen zijn van een verminderde productiviteit van de hommelteelt. De kenmerken van antibioticaresistentie kunnen eveneens voorkomen na verkeerd gebruik van deze antibiotica. Bovendien, zullen in geval van behandeling, alle maatregelen worden genomen om het roven door honingbijen tegen te gaan van de restanten van de suikersiroop met antibiotica voor het voederen van gekweekte hommels. Een grondige analyse van de voor- en nadelen van het antibioticagebruik blijkt dus noodzakelijk vooraleer het gebruik ervan al dan niet kan worden aanbevolen in het kader van de bestrijding van AVB bij gekweekte hommels.

Teneinde de doeltreffendheid te verhogen bij de bestrijding van ziekten bij honingbijen en gekweekte hommels, is het nodig het aantal imkers en hommelkwekers te kennen die in België actief zijn, evenals hun coördinaten. Het wordt dus aan het FAVV aanbevolen om de registratie van deze imkers of kwekers aan te moedigen.

Er werd een gebrek aan informatie vastgesteld met betrekking tot de geanalyseerde monsters. Inderdaad is het moeilijk of onmogelijk gebleken om voor een aantal monsters de oorsprong aan te geven. Er wordt derhalve aanbevolen om in de toekomst minimale informatie mee te geven bij de geanalyseerde monsters (vb. localisering van de producent, context van de analyseaanvraag zoals de verdachte haard of certificatie van schadeloosstelling...).

7. Besluit

Het Wetenschappelijk Comité besluit dat het risico laag is, dat gekweekte hommels, die gecontamineerd zijn met sporen en/of vegetatieve cellen van AVB (*Paenibacillus larvae*), een klinische uitbraak van deze ziekte bij honingbijen veroorzaken, aangezien tot nu toe nooit werd aangetoond dat hommels drager van deze ziekte kunnen zijn.

Bovendien is de kans dat honingbijen met Amerikaans vuilbroed geïnfecteerd worden via gekweekte hommels veel kleiner dan dat zij geïnfecteerd worden door direct of indirect contact met andere bijen, gezien de ziekte wijdverspreid is.

De goede praktijken bij het kweken van hommels vereisen echter dat alle noodzakelijke maatregelen worden genomen om het risico op besmetting door sporen en/of vegetatieve cellen van Amerikaans vuilbroed tot een minimum te beperken (bvb. : naleven van de bioveiligheidsregels).

Voor het Wetenschappelijk Comité,
De Voorzitter,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert

Brussel, 23/04/2012

Referenties

Alford D.V., 1969. A study of the hibernation of bumblebees (*Hymenoptera: Bombidae*) in southern England. *Journal of Animal Ecology*. 38:149-170.

Alford D.V., 1975. *Bumblebees*. Davis-Poynter, London.

Alippi A.M., 1991. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *J. Apic. Res.* 30, 75–80.

Alippi A.M., 1995. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologia*. 11, 343–350.

Alippi A.M., 2000. Is Terramycin losing its effectiveness against AFB? *Bee Biz*. 11:27-29.

Anonymous, 2010. FDA. Available at : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda/>.

Arechavaleta-Velasco M.E., Hunt G.J., Spivak M., Camacho-Rea C., 2011. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2(3):283-298.

Bachanova K., Kludiny J., Kopernicky J., Simuth J., 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie*. 33(3):259-269.

Bakonyi T., Derakhshifar I., Grabensteiner E., Nowotny N., 2003. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: Comparison with isolation and biochemical characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:1504-1510.

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.

Basualdo M., Figini E., Torres J., Tabera A., Libonatti C., Bedascarrasbure E., 2008. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6(2):236-240.

Chen Y.W., Wang C.H., An J., Ho K.K., 2000. Susceptibility of the Asian honey bee, *Apis cerana*, to American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae*. *Journal of Apicultural Research*. 39(3-4):169-175.

Colter D., 2000. An update on resistant American foulbrood disease in Alberta. *Alberta Bee News*. September 2000:2-4.

Crailsheim K., Riessberger-Galle U., 2001. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*. 32(1):91-103.

Danka R.G., Villa J.D., 1994. Preliminary observations on the susceptibility of Africanized honey bees to American foulbrood. *Journal of Apicultural Research*. 33(4):243-245.

Decanini L.I., Collins A.M., Evans J.D., 2007. Variation and heritability in immune gene expression by diseased honeybees. *Journal of Heredity*. 98(3):195-201.

de Graaf D.C., De Vos P., Heyndrickx M., Van Trappen S., Peiren N., Jacobs F.J., 2006. Identification of *Paenibacillus larvae* to the subspecies level: an obstacle for AFB diagnosis. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 115–123.

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. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(2006):583–590.
- Dobbelaere W., de Graaf D.C., Reybroeck W., Desmedt E., Peeters J.E., Jacobs F.J., 2001. Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores. *Journal of Applied Microbiology.* 91(2):212–216.
- Durrer S., Schmid-Hempel P., 1994. Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proceedings of Biological Sciences.* 258:299-302.
- Eckert J.E., 1947. Use of sulfa drugs in the treatment of American foulbrood disease of honeybees. *J. Econ. Entomol.* 40:41-44.
- Eijnde J. van den, Vette N., 1993. *Nosema* infection in honeybees (*Apis mellifera* L.) and bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *Proceedings of Experimental and Applied Entomology.* N. E. V. Amsterdam, 4:205-208.
- Evans J.D., 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85(2):105-111.
- Evans J.D., Lopez D.L., 2004. Bacterial Probiotics induce an immune response in the honey bee (*Hymenoptera: Apidae*). *J. Econ. Entomol.* 97(3):752-756.
- Evans J.D., Armstrong T.N., 2005. Inhibition of the American foulbrood bacterium, *Paenibacillus larvae*, by bacteria isolated from honey bees. *J. Apic. Res.* 44(4):168-171.
- Faegri K., van der Pijl L., 1979. *The principles of pollination ecology.* Pergamon Press, Oxford, New York.
- Feldlaufer M., Pettis J.S., Kochansky J.P., Stiles G., 2001. Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honey bees. *Apidologie.* 32(6):547–554.
- Fries I., de Ruijter A., Paxton R.J., Da Silva A.J., Slemenda S.B., Pieniazek N.J., 2001. Molecular characterization of *Nosema bombi* (*Microsporidia: Nosematidae*) and a note on its sites of infection in *Bombus terrestris* (*Hymenoptera: Apoidea*). *Journal of Apicultural Research.* 40:91-96.
- Fries I., Raina S., 2003. American foulbrood and African honey bees (*Hymenoptera: Apidae*). *J. Econ. Entomol.* 96(6):1641-1646.
- Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I., 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 501–511.
- Genersch E., 2008. *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood - long since known and still surprising. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety.* 3:429-434.
- Genersch E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 103(2010)S10–S19.
- Gordon R.E., Haynes W.C., Pang H.N., 1973. The Genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture.
- Gramacho K.P., Goncalves L.S., 2009. Sequential hygienic behavior in Carniolan honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Genet. Mol. Res.* 8(2):655-663.
- Hansen H., Brodsgaard C.J., 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World.* 80, 5–23.

- Haseman L., Childers L.F., 1944. Controlling American foulbrood with sulfa drugs. *Univ. Missouri Agric. Exp. Sta. Bull.* 482:3-16.
- Haseman L., 1961. How long can spores of American foulbrood live? *Am. Bee J.* 101, 298–299.
- Heinrich B., 1979. *Bumblebee economics*. Harvard university press, Cambridge, Massachusetts.
- Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., García-Palencia P., Meana A., 2008. Detection of infective *Nosema ceranae* (*Microsporidia*) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology.* 97:76-78.
- Hitchcock J.D., Moffett J.O., Lockett J.J., Elliott J.R., 1970. Tylosin for control of American foulbrood disease in honey bees. *J. Econ. Entomol.* 63:204-207.
- Hitchcock J.D., Stoner A., Wilson W.T., Menapace D.M., 1979. Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honeybee larvae of various ages (*Hymenoptera: Apidae*). *J. Kansas Entomol. Soc.* 52, 238–246.
- Hopingarner R., Nelson K., 1987. American foulbrood cleanup rate using three terramycin treatments. *Am. Bee J.* 128:120-121.
- Hornitzky M.A.Z., Clark S., 1991. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *J. Apic. Res.* 30, 13–16.
- Hornitzky M.A.Z., 1998. The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *Journal of Apicultural Research.* 37(4): 267–271.
- Invernizzi C., Penagaricano F., Tomasco I.H., 2009. Intracolony genetic variability in honeybee larval resistance to chalkbrood and American foulbrood parasites. *Insectes Sociaux.* 56(3):233-240.
- Jie W., Wenjun P., Jiandong A., Zhanbao G., Yueming T., Jilian L., 2005. Techniques for year-round rearing of *Bombus terrestris* L. (*Hymenoptera, Apoidea*) in China 65. *Journal of Apicultural Science.* 49:65-69.
- Johnson J.P., 1948. Sulfa drugs for American foul brood of honeybees: Third Report. *Jour. Econ. Entomol.* 41(2):314-318.
- Katznelson H., 1950. *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *J. Bacteriol.* 59:153–155.
- Katznelson H., 1950. The influence of antibiotics and sulpha drugs on *Bacillus larvae*, cause of American foulbrood of the honeybee, *in vitro* and *in vivo*. *J. Bacteriol.* 59:471-479.
- Katznelson H., 1956. Stability of antibiotics in honey. *Am. Bee J.* 96:137.
- Katznelson H., Gooderham C.B., 1949. Sulfathiazole in relation to American foulbrood. *Sci. Agric.* 32:180-184.
- Katznelson H., Jamieson C.A., Austin G.H., 1955. Further studies on the chemotherapy of diseases of the honeybee. *Can. J. Agric. Sci.* 35:189-192.
- Koch H., Schmid-Hempel P., 2011. Bacterial communities in central European bumblebees: Low diversity and high specificity. *Microbiological Ecology.* 62:121-133.

- Kochansky J., Knox D., Shimanuki H., 1999. Comparative stability of oxytetracycline and tylosin in sugar syrup. *Apidologie*. 30:321–326.
- Kochansky J., Knox D.A., Feldlaufer M., Pettis J.S., 2001. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie*. 32:215-222.
- Kochansky J.P., Pettis J.S., 2005. Screening additional antibiotics for efficacy against American foulbrood. *J. Apic. Res.* 44(1):24-28.
- Macfarlane R. P., Lipa J.J., Liu H.J., 1995. Bumble bee pathogens and internal enemies. *Bee World*. 76:130-148.
- Machova M., 1970. Variations de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Bacillus larvae*. *Bull. Apic.* 13:5-11.
- Martinson V. G., Danforth B. N., Minckley R. L., Rueppell O., Tingek S., Moran. N. A., 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*. 20:619-628.
- Meeus I., Brown M.J.F., de Graaf D.C., Smagghe G., 2011. Effects of Invasive Parasites on Bumble Bee Declines. *Conservation Biology*. 25(4):662-671.
- Meeus I, Vercruyse V., Smagghe G. Molecular detection of *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma melliferum* in bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. (submitted)
- Michener C.D., 2007. *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University press Baltimore and London.
- 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. *Journal of Invertebrates Pathology*. 75:95-96.
- Moffett J.O., Wilson W.T., Parker R.L. 1958. The effect of Penicel, tetracycline and erythromycin on adult bees, brood-rearing, and honey production. *Am. Bee J.* 98:22-24.
- Moffett J.O., Hitchcock J.D., Lockett J.J., Elliot J.R. 1970. Evaluation of some new compounds in controlling American foulbrood. *J. Apic. Res.* 9:39-44.
- Mutinelli F. 2003. Practical application of antibacterial drugs for the control of honey bee diseases. *Apiacta*. 38:149-155.
- Mutinelli F., 2011. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 30(1):257-271.
- OIE, 2010. Chapter 9.2. American foulbrood of honeybees. *Terrestrial Animal Health Code*. World Organisation for Animal Health (OIE). Available at : http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.9.2.htm.
- OIE, 2011. Chapter 2.2.2. American foulbrood of honeybees. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011*. World Organisation for Animal Health (OIE). Available at : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.02_AMERICAN_FOULBR_OOD.pdf.
- Okayama A., Sakogawa T., Nakajima C., Hayama T., 1996. Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus larvae* originated from American foulbrood of honeybee in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 58(5):439-41.

- Ortelli D., Edder P., Corvi C., 2004. Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Chromatographia*. 59(1-2):61-64.
- Oxley P.R., Spivak M., Oldroyd B.P., 2010. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* 19(7):1452-1461.
- Palmer K.A., Oldroyd B.P., 2003. Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. *Naturwissenschaften*. 90(6):265-268.
- Peng C.Y.S., Mussen E., Fong A., Cheng P., Wong G., Montague M.A., 1996. Laboratory and field studies on the effects of the antibiotic tylosin on honey bee *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) development and prevention of American foulbrood disease. *Invertebr. Pathol.* 67(1):65-71.
- Pettis J., Feldlaufer M., 2005. Efficacy of tylosin and lincomycin in controlling American foulbrood in honey bee colonies. *J. Apic. Res.* 44(3):106-108.
- Plischuk S., Martín-Hernández R., Prieto L., Lucía M., Botías C., Meana A., Abrahamovich A.H., Lange C., Higes M., 2009. South American native bumblebees (*Hymenoptera: Apidae*) infected by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*) *Environmental Microbiology Reports*. 1:131-135.
- Raju B.C., Nyland G., Meikle T., Purcell A. H., 1981. Helical, motile mycoplasmas associated with flowers and honey bees in California. *Canadian Journal of Microbiology*. 27:249-253.
- Reinhardt J.F., 1947. The sulfathiazole cure of American foulbrood: an explanatory theory. *J. Econ. Entomol.* 40:45-48.
- Reybroeck W., 2010. Screening for residues of antibiotics and chemotherapeutics in milk and honey. Ph. D. Thesis. *Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine*. 295 pp.
- Reybroeck W., Daeseleire E., De Brabander H.F., Herman L., 2012. Antimicrobials in beekeeping (review article). *Vet. Microbiol.* (accepted, in press).
- Reynaldi F.J., Albo G.N., Alippi A.M., 2008. Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease of honeybee. *Vet. Microbiol.* 132(1-2):119-128.
- Riessberger-Galle U., von der Ohe W., Crailsheim K., 2001. Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *J. Invertebr. Pathol.* 77(4):231-236.
- Röseler P.F., 1985. A technique for year-round rearing of *Bombus terrestris* (*Apidae, Bombini*) colonies in captivity. *Apidologie*. 16:165-170.
- Ruiz-Gonzalez M.X., Brown M.J.F., 2006. Honey bee and bumblebee trypanosomatids: specificity and potential for transmission. *Ecological Entomology*. 31:616-622.
- Shimanuki H., Knox D.A., 1994. Susceptibility of *Bacillus larvae* to Terramycin. *Am. Bee J.* 134: 125-126.
- Simone M., Evans J.D., Spivak M., 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*. 63(11):3016-3022.
- Singh R., Levitt A.L., Rajotte E.G., Holmes E.C., Ostiguy N., vanEngelsdorp D., Ian Lipkin W., dePamphilis C.W., Toth A.L., Cox-Foster D.L., 2010. RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* Hymenopteran species. *PLoS ONE*. 5(12): e14357. doi:10.1371/journal.pone.0014357.

- Spivak M., 2000. Preventive antibiotic treatments for honey bees. *Am. Bee J.* 140: 867-868.
- Spivak M., Reuter G.S., 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie.* 32(6):555-565.
- Velthuis H. H.W., van Doorn A., 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie.* 37:421-451.
- Wedenig M., Riessberger-Galle U., Crailsheim K., 2003. A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae larvae*. *Apidologie.* 34(1):43-51.
- Wilson W.T., 1971. Resistance to American foulbrood in honey bees XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *J. Invertebr. Pathol.* 17:247-255.
- 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.

Leden van het Wetenschappelijk Comité

Het Wetenschappelijk Comité is samengesteld uit de volgende leden :

D. Berkvens, C. Bragard, E. Daeseleire, P. Delahaut, K. Dewettinck, J. Dewulf, L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, K. Raes*, C. Saegerman, B. Schiffers, M.-L. Scippo*, W. Stevens*, E. Thiry, T. van den Berg, M. Uyttendaele, C. Van Peteghem

* Uitgenodigde experts.

Dankbetuiging

Het Wetenschappelijk Comité dankt de Stafdirectie voor risicobeoordeling en de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerpadvies. De werkgroep was samengesteld uit :

Leden van het Wetenschappelijk Comité	C. Saegerman (verslaggever), C. Bragard, H. Imberechts
Externe experts	D. de Graaf (UGent), B.K. Nguyen (GxABT), W. Reybroeck (ILVO), G. Smaghe (UGent)

Juridisch kader van het advies

Wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid artikel 8;

Koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen;

Huishoudelijk reglement, bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door de Minister op 9 juni 2011.

Disclaimer

Het Wetenschappelijk Comité behoudt zich, te allen tijde, het recht voor dit advies te wijzigen indien nieuwe informatie en gegevens ter beschikking komen na de publicatie van deze versie.