

STUDII PRELIMINARE ASUPRA NOILOR METODE DE DETECTARE A AGENȚILOR PATOGENI AI ALBINEI MELIFERE

Ruth WAITE¹, Helen THOMPSON¹, M. BROWN¹, M. WATKINS², M. BEW¹

¹National Bee Unit, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, ANGLIA

²Vita (Europe) Ltd, 21 Wote Street, Basingstoke, RG21 7NE, ANGLIA

Rezumat

National Bee Unit (NBU), parte a Central Science Laboratory (agenție executivă a Departamentului pentru mediu, alimentație și probleme rurale - Department for Environment, Food and Rural Affairs, Defra) s-a ocupat de punerea la punct a noilor tehnici de detectare ai agenților patogeni ai albinelor. Două metode diferite se află în prezent în cercetare: un test pe bază de anticorpi, pentru identificarea diferitelor forme de locă și utilizabil pe teren, și un test de laborator, bazat pe prezența nucleotidelor, pentru viruși și diferențierea speciilor de albine.

Trusele de testare pe teren pentru locă sunt destinate detectării microorganismelor patogene *Melissococcus plutonius* și *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Anticorpii monoclonali (IgG) au fost dezvoltati la Laboratorul științific central (CSL), folosind culturi bacteriene proaspăt izolate, obținute din material infectat. Trusele (cunoscute sub denumirea de dispozitive de flux lateral) se bazează pe tehnologia existentă, aflată în proprietatea CSL. Anticorpii au trecut printr-o examinare riguroasă, pentru stabilirea specificității pentru bacteria relevantă, fiind testați pentru reactivitatea încrucișată cu alte bacterii, găsite de obicei în coloniile de albine, inclusiv pentru *Paenibacillus alvei* și *Brevibacillus laterosporus*. De asemenea, a fost testată oportunitatea lor în vederea utilizării în dispozitivele de flux lateral. Trusele pentru loca americană au fost validate în laborator în 2002, fiind gata pentru testarea pe teren în 2003, iar cele pentru loca europeană sunt în curs de realizare, anticipându-se testarea de laborator în 2003.

Tehnica de detectare a virușilor și a diferitelor specii de albine se bazează pe metoda PCR în timp real denumită TaqMan®. Sunt disponibile secvențele genetice pentru numeroși viruși legați de albine și au fost elaborate "primere" pentru anumiți viruși (inclusiv virusul de Kașmir și virusul paraliziei acute), în scopul detectării lor în mostrele de albine melifere. Deși încă în stadii timpurii, indicațiile de până acum sunt promițătoare. Metodologia dispune de o mare cantitate de mostre-bază, cu câte 1500 teste disponibile în fiecare săptămână, capabile să detecteze simultan patru viruși diferiți. Ca atare, această tehnologie dispune de un mare potențial pentru proiecte de supraveghere, atât în Regatul Unit cât și în străinătate. A fost, de asemenea, pusă la punct o probă ADN pentru identificarea ADN-ului albinei africanizate, în vederea realizării unui studiu asupra acestor albine.

Introducere

În pofida progreselor importante în domeniul diagnosticului de boli, metodele de rutină utilizate în diagnosticarea bolilor albinelor sunt bazate pe metodologiile tradiționale, cum ar fi microscopia elementară sau testarea serologică. National Bee Unit (NBU), parte a Laboratorului științific central (CSL) examinează tehnici noi pentru detectarea rapidă a agenților patogeni ai albinelor. Două metode diferite se găsesc, în prezent, în faza de examinare, respectiv un test de teren pe bază de anticorpi, pentru identificarea formelor de locă și un test de laborator, bazat pe nucleotide, pentru identificarea virușilor și diferențierea speciilor de albine. Intenția lucrării de față este să prezinte aceste metode noi de diagnoză a bolilor albinelor și să explice progresele realizate până acum.

Albinele melifere sunt afectate de relativ puține boli, care atacă de obicei albinele adulte, ori, în mod specific, larvele. Două astfel de boli sunt loca americană și loca europeană, ambele afectând larvele și fiind cauzate de bacterii. Incidența acestor boli are un impact economic considerabil asupra industriei apicole, albinele fiind valoroase în ceea ce privește polenizarea și producerea de miere și ceară (CARRECK și WILLIAMS, 1998). Ambele boli au fost descrise și trecute în revistă în literatură (SHIMANUKI, 1983, 1990; RATNIEKS, 1992; HANSEN și BRØDSGAARD, 1999). Loca americană (LA) este provocată de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (HORNITZKY, 1998) și a fost cunoscută anterior ca *Bacillus larvae* (HEYNDRICKX et al., 1996), o bacterie aerobă formatoare de spori. Loca europeană (LE) este cauzată de bacteria microaerofilă *Melissococcus plutonius*, anterior cunoscută ca *Melissococcus pluton* (BAILEY și COLLINS, 1982; BAILEY, 1983; TRÜPER și DE'CLARI, 1998). Totuși, mai sunt și alte bacterii găsite uzual în larvele afectate de LE, cum ar fi *Paenibacillus alvei* și *Brevibacillus laterosporus*, ambele considerate organisme saprofite secundare (ALIPPI, 1991).

Ambele boli ale puietului intervin în lumea întregă, deși LA se bucură, în general, de un interes mai larg. LE reprezintă o preocupare majoră în Regatul Unit, dar are un impact relativ redus în alte părți ale lumii (SHIMANUKI, 1990; THOMPSON și BROWN, 2001). În condițiile legislației pentru sănătatea albinelor din Marea Britanie (Ordinul privind combaterea bolilor albinelor, SI 1982 nr. 107, 1982), ambele sunt boli declarabile și trebuie anunțate autorităților de resort. În Anglia și Țara Galilor, NBU coordonează programele de sănătate, atât pentru Defra cât și pentru Adunarea națională a Departamentului de agricultură din Wales (NAWAD). NBU dispune de o echipă de inspectori apicoli desemnați, care inspectează coloniile de albine de pe întreg teritoriul englez și galez. În cazul în care o colonie este suspectată că are una din aceste două boli, este prelevată o mostră larvală simptomatică, care este trimisă la laboratorul de diagnostic al NBU, unde mostra este examinată pentru prezența bacteriilor patogene, în vederea confirmării bolii.

Evident că o trusă test, capabilă să confirme boala pe teren fără a mai trimite mostre la laborator, este mai benefică. Ea ar permite inspectorilor apicoli confirmarea imediată a diagnosticului, ceea ce ar duce la combaterea mai eficientă a bolii. De asemenea, ea ar permite personalului de diagnoză al laboratorului să realizeze o cantitate mai mare de muncă de cercetare și să-și extindă activitatea și la alte domenii ale sănătății albinelor, cum ar fi supravegherea acestora pentru depistarea de patogeni exotici. CSL are peste 600 de oameni de știință specializați în diferite discipline, cum sunt biologia moleculară, chimia analitică și patologia insectelor. În cadrul organizației funcționează și o echipă care își consacră eforturile diagnosticării rapide a bolilor inclusiv dezvoltării de truse de testare de teren, cu precădere pentru bolile plantelor. Aceste truse au fost elaborate pentru diagnosticarea imediată, pe teren, a virusurilor plantelor, cum sunt virusii X și Y ai cartofului (DANKS și BARKER, 2000). Cercetarea noastră a fost îndreptată către adaptarea acestei tehnologii și realizarea de truse de diagnosticare a locii, urmând să fie utilizate atât de inspectorii apicoli, cât și de apicultori.

O altă problemă la albine este cea legată de prezența virusurilor. Există mai multe tehnici disponibile, cum ar fi imunodifuziunea în gel sau testele bazate pe ELISA, care folosesc anticorpi policlonali (ANDERSON, 1984; TODD și BALL, 2003). Metodele disponibile în prezent se pretează la mostrele grav infectate, sau la un număr redus de mostre, dar nu pot fi aplicate cu ușurință la studii pe scară mare sau la detectarea unor niveluri scăzute de virusi, așa cum poate fi cazul unor infecții neaparente. În plus, metodele serologice, sensibile și specifice, de detectare a virusurilor albinei melifere sunt greu de aplicat, deoarece multe preparate de virusi ai albinelor sunt amestecuri; majoritatea coloniilor conțin unul sau mai mulți virusi (BAILEY et al., 1981; STOLTZ et al., 1995; EVANS și HUNG, 2000). Ca atare, este dificil să se producă antiseruri într-adevăr specifice pentru fiecare virus al albinelor (ANDERSON, 1984).

Numeroși virusi legați de albine au fost secvențiați în ultimii ani, secvențele fiind depozitate în baze de date cu acces public, cum sunt GenBank și EMBL (GHOSH et al., 1999; GOVAN et al., 2000), și s-a stabilit o oarecare nomenclatură (EVANS și HUNG, 2000; MAYO, 2002). Totuși, s-au făcut doar câteva studii asupra incidenței acestora (ALLEN și BALL, 1996). Disponibilitatea crescută a secvențelor virale a permis NBU să urmeze o tehnică nouă de identificare a virusurilor, denumită TaqMan®, bazată pe PCR în timp real.

Materiale și metode

Truse de testare

Cercetările inițiale

Trusele de testare de teren, sunt proiectate pentru a detecta bacteria patogenă asociată cu LA (*P. larvae* subsp. *larvae*). În cadrul CSL au fost dezvoltati câțiva anticorpi monoclonali și examinați pentru specificitatea lor la *P. larvae* subsp. *larvae*. După examinarea inițială, un anticorp este ales ca cel mai adecvat conform activității sale, a capacității de a fi utilizat în LFD și a lipsei de reactivitate încrucișată împotriva altor bacterii legate de stup, inclusiv *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* și *P. alvei*. Odată examinat și găsit specific, el este introdus în LFD și în continuare se lucrează cu el.

Validarea de laborator

Validarea în laborator implică testarea oarbă a multor mostre diferite (care sunt, de obicei, trimise laboratorului de diagnoză, ca parte a serviciului de inspectare al NBU), pentru a se vedea dacă sunt sau nu complet specifice pentru *P. larvae* subsp. *larvae*. Deși majoritatea mostrelor testate au fost infectate cu una dintre cele două loci amintite, au fost incluse și altele, ca mumiile de puiet văros precum și larve sănătoase.

Taqman® pentru identificarea virusurilor

Cercetările inițiale

Pentru comparații detaliate ale variabilității *inter* și *intra* a secvenței virale, genele de înveliș pentru virusul de Kașmir al albinelor (VK), virusul paraliziei acute (VPA), virusul puietului în sac (VPS) și virusul botcilor negre (VBN) au fost descărcate din baza de date EMBL. Au fost realizate multiple aliniamente ale

secvenței, folosind algoritmul CLUSTAL V în pachetul Megalign (star ADN). Apoi, a fost efectuată analiza filogenetică, prin calcularea distanței genetice între perechile de secvențe, folosind algoritmul lui Jukes și Cantor, precum și formarea de "clustere" din aceste matrice prin alăturarea lor în TREECON (VAN DE PEER și DE WACHTER, 1994). Semnificația statistică a ramificării a fost estimată prin realizarea a 100 de replici pornind de la datele originale. Pentru secvența *virusului aripiei opace* (VAO), secvența este disponibilă numai în gena replicazei, nu și în gena proteinei de înveliș. Secvența genei ARN polimeraza (replicaza) dependentă de ARN, a fost comparată cu gena replicazei pentru *virusul de Kașmir al albinei* (VK); alte secvențe de replicază nu sunt disponibile.

TaqMan® și designul "primerelor"

Designul "primerelor" și a testelor TaqMan® a fost realizat folosindu-se software-ul Primer Express™ (PE-Biosystems), așa cum a fost descris de MUMFORD et al. (2000). Metoda TaqMan® a fost proiectată pentru VK, VAO, VPS și VBN. Zonele secvenței alese pentru proiectul testului au fost cele în care exista un grad înalt de variație între speciile virale, dar și un mare grad de conservare în interiorul speciei. Un test martor intern pozitiv (IPM) a fost conceput pentru gena ribozomială 18S a *Apis mellifera*. Acest martor a permis monitorizarea eficienței extracției de ARN din mostre și evitarea falselor rezultate negative (cum este cazul în care nici un virus nu a fost detectat, ca urmare a eșecului de a extrage ARN din mostrele de albine).

Testele cu TaqMan®

Reacțiile TaqMan® au fost stabilite pe plăci de reacție cu câte 96 de adâncituri, folosindu-se trusele de reactiv PCR (PE-Biosystems), potrivit protocoalelor furnizate, dar cu adăugarea a 25 unități de M-MLV (Promega) per reacție. Pentru fiecare reacție a fost adăugat 1 μl de extract de ARN, până la un volum final de 25 μl. Plăcile au fost centrifugate în condiții generice de sistem (48°C/30 min., 95°C/10 min. și 40 de cicluri de 60°C/1 min., 95°C/15 sec.), în cadrul sistemului de detecție a secvenței 7700 sau 7900 (PE-Biosystems), folosindu-se colecția de date în timp real.

Rezultate

Trusele de test

Cercetările inițiale

Au fost dezvoltate câțiva anticorpi cu acțiune împotriva *P. larvae* subsp. *larvae*. Cei mai promițători au fost examinați, iar unul a fost ales pentru continuarea studiului. El s-a dovedit pe deplin specific pentru *P. larvae* subsp. *larvae* și nu a reacționat la nici una dintre următoarele bacterii: *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* subsp. *pulvificiens*, *P. alvei* o bacterie anaerobă neidentificată, izolată dintr-o mostră infectată cu LE, *Escherichia coli* sau *Ralstonia solanacearum* (cauza moniliozei cartofului). Acest anticorp a fost introdus într-o trusă de testare și a fost găsit adecvat.

Validarea în laborator

Tabelul I oferă o trecere în revistă sumară a rezultatelor validării în laborator pentru trusa de testare pentru LA.

Tabelul I

Trecere în revistă a testelor de validare în laborator a trusei de testare pentru LA

Tipul mostrei	Nr. total testat	Reacție cu trusa de testare
Mostră pozitivă LA	77	71
Mostră pozitivă LE	87	1
Altele (de ex., mumii de puiet văros)	31	0

Rezultatele arată că testul cu trusele de testare s-a dovedit a fi foarte specific pentru larvele infectate cu LA. A fost înregistrată o singură reacție pozitivă falsă, la o larvă în prealabil congelată și infectată cu LE; aceasta a avut o reacție pozitivă slabă. Deoarece aceasta a fost singura reacție pozitivă falsă, s-a considerat că era vorba de un caz izolat, cu puține probabilități să se repete. Mostrele care au fost diagnosticate inițial ca pozitive pentru LA, dar care ulterior nu au reacționat cu trusa de testare, erau foarte diluate. Aceste rezultate nu sunt surprinzătoare, deoarece trusele de testare sunt concepute pentru detectarea unui mare număr de spori, prezenți într-o larvă simptomatică. Nu au fost înregistrate reacții cu alte larve testate, cum ar fi cele conținând *P. alvei* sau *B. laterosporus*, ori cu cele aparent sănătoase, provenind din aceiași faguri, ca și cu alte larve infectate cu LA sau LE.

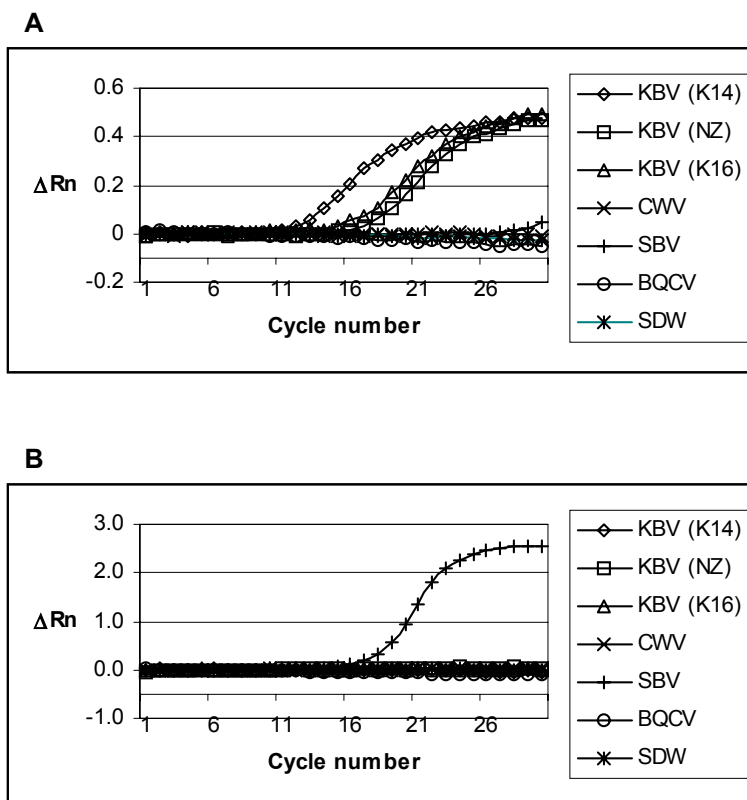
Taqman® pentru identificarea virușilor

Analizarea secvenței

Prin compararea secvențelor ale virușilor care reprezentau interes, au fost alese zonele apte pentru o separare bună a speciilor de virus. De remarcat sunt *virusul de Kașmir al albinelor* și *virusul paraliziei acute*: Aceste două specii sunt strâns înrudite, deși analiza ulterioară a arătat că proteina de înveliș poate fi utilizată pentru diferențierea lor. Nu am reușit să obținem o mostră purificată de VPA pentru a evidenția lipsa de reactivitate încrucișată. Singura secvență disponibilă pentru *virusul aripilor opace* a fost gena de replicază. Urmând compararea pe perechi de secvențe, s-a demonstrat că gena de replicază a *virusului aripilor opace* era identică cu cea a *virusului de Kașmir*, iar testul conceput pe baza acestei secvențe, urma să detecteze și *virusul de Kașmir*.

Testele TaqMan®

Testele TaqMan® concepute au fost utilizate pe o gamă de preparate virale purificate, achiziționate de la CSIRO, Australia. Rezultatele sunt prezentate în figura 1.



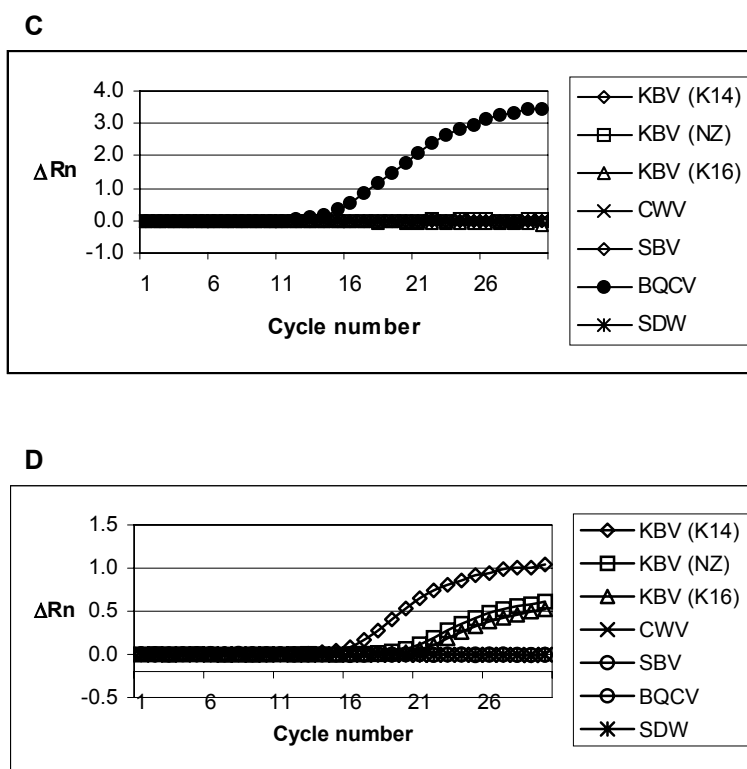


Figura 1 - Ilustrarea detectării virușilor albinelor utilizând PCR în timp real.
A: Detectarea VK (KVB) cu testul VK, **B:** VPS (SBV) cu testul VPS, **C:** VBN (BQCV) cu testul VBN și
D: detectarea VK (KBV) cu testul VAO (CWV). SDW este martorul negativ, diluat cu apă.
 Cycle number = Numărul de cicluri

S-a constatat că în fiecare caz, testul a dat rezultatul așteptat. Testele pentru *virusul puietului în sac* și *virusul botcilor negre* sunt pe deplin specifice, în timp ce cele pentru *virusul de Kașmir* și *virusul aripilor opace* au detectat toate izolatele ale *virusului de Kașmir*. Totuși, nici unul dintre teste nu a detectat ARN în preparatul de *virus al aripilor opace*. Se impune continuarea cercetărilor pentru eludare, deși se bănuie că ARN din preparat a fost degradat. Testul pentru *virusul de Kașmir* a fost aparent specific pentru formele izolatelor de VK.

Discuții

Metodele detaliate în lucrarea de față sunt noi în domeniul diagnozei de boli ale albinei melifere, deși ele au mai fost utilizate cu succes timp de câțiva ani la bolile plantelor (MUMFORD et al., 2000; DANKS și BARKER, 2000). Totuși, ele au fost adaptate cu succes pentru a fi utilizate la albinele melifere.

Trusele pentru testele de teren pentru loca americană reprezintă un concept complet nou în diagnoza bolilor albinelor. În țările în care bolile albinelor sunt diagnosticate, analizele sunt efectuate, în mod curent, într-un laborator (ALIPPI, 1991; OIE, 2000). Posibilitatea realizării lor pe teren prezintă un mare interes, mai ales în țările unde este imposibil un serviciu de inspecție amplu, cum este Australia (GOODWIN, comunicare personală). Trusele pentru detectarea locii europene sunt, de asemenea, în curs de realizare, în prezent găsindu-se în faza de validare în laborator. Se anticipează că stadiul de validare în teren va fi inițiat în Regatul Unit înainte de sfârșitul sezonului 2003. Această boală prezintă cel mai mare interes în Regatul Unit (THOMPSON și BROWN, 1999).

Detectarea virușilor prin utilizarea tehnicii TaqMan® reprezintă un potențial uriaș pentru activitatea viitoare atât în Regatul Unit cât și peste hotare. Orice cercetare privind prezența virușilor albinelor în colonii a depins, până acum, de accesul la antiseruri. Astfel, compararea datelor a fost dependentă de specificitatea antiserurilor realizate în diferite laboratoare. Acest lucru este deosebit de important, deoarece albinele și coloniile prezintă frecvent infecții virale multiple (EVANS, 2001). Testele cantitative, similare cu ELISA, reclamă, de asemenea, acces la anticorpi adecvați și la preparate virale purificate (TODD și BALL, 2003). În cele mai multe cazuri, studiile efectuate nu au reșit să detecteze infecții neaparente și erau utilizate, mai

ales, cu funcție de diagnoză (HORNITZKY, 1987; ALLEN și BALL, 1996). Ca urmare a metodologiilor implicate, ele sunt, de asemenea, limitate și în numărul de mostre folosite (TODD și BALL, 2003), nu întotdeauna oferind rezultate concluzive (RIBIERE et al., 2000). Totuși, după cum a arătat studiul de față, utilizarea tehnologiei TaqMan® depășește problemele legate de disponibilitatea reactivului, face posibilă aplicarea de metode RT-PCR cu înaltă sensibilitate și caracter specific, urmând să fie utilizate cantitativ la un număr mare de mostre, iar utilizarea matorului genei ribozomiale interne 18S permite aprecierea eficienței extracției, asigurând că nu vor interveni false rezultate negative.

Este evident că aceste noi tehnologii pot fi aplicate cu succes la detectarea bolilor albinelor. Cercetările vor continua în ambele zone despre care raportează lucrarea de față. Toate acestea pot duce la o eră nouă în înțelegerea unora dintre necunoscutele, în lumea adeseori încărcată de mister a acestor infecții și, poate, la depistarea unor căi mai bune de gestionare a bolilor albinelor.

Mulțumiri

Autorii doresc să-și exprime mulțumirile lui Chris DANKS, Victoria TOMKIES și Jonathan FLINT, pentru trusele de test, lui Neil BOONHAM pentru realizarea TaqMan® și lui Denis ANDERSON pentru furnizarea de mostre virale.

BIBLIOGRAFIE

- Alippi A.M. (1991), A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*, in Argentina, *J. Apic. Res.* 30, 75-80
- Allen M., Ball B. (1996), The incidence and world distribution of honey bee viruses, *Bee World* 77, 141-162
- Anderson D.L. (1984), A comparison of serological techniques for detecting and identifying honeybee viruses, *J. Invertebr. Pathol.* 44, 233-243
- Bailey L. (1983), *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.), *J. Appl. Bacteriol.* 55, 65-69
- Bailey L., Ball B.V., Perry J.N. (1981), The prevalence of viruses of honeybees in Britain, *Ann. Appl. Biol.* 97, 108-118
- Bailey L., Collins M.D. (1982), Reclassification of '*Streptococcus pluton*' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton*, nom. rev.; comb. nov., *J. Appl. Bacteriol.* 53, 215-217
- Carreck N., Williams I. (1998), The economic value of bees in the UK, *Bee World* 79, 115-123
- Danks C., Barker I. (2000), On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices, *Bulletin OEPP* 30, 421-426
- Evans J.D. (2001), Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses, *J. Invertebr. Pathol.* 78, 189-193
- Evans J.D., Hung A.C. (2000), Molecular phylogenetics and the classification of honey bee viruses, *Arch. Virol.* 145, 2015-2026
- Ghosh R.C., Ball B.V., Willcocks M.M., Carter M.J. (1999), The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus, *J. Gen. Virol.* 80, 1541-1549
- Govan V.A., Leat N., Allsopp M., Davison S. (2000), Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses, *Virology* 277, 457-463
- Hansen H., Brødsgaard C.J. (1999), American foul brood: A review of its biology, diagnosis and control, *Bee World* 80, 5-23
- Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., Devos P., Logan N.A., Ali N., Berkeley R.C.W. (1996), Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 270-279
- Hornitzky M.A.Z. (1987), Prevalence of virus infections of honeybees in Eastern Australia, *J. Apic. Res.* 26, 181-185
- 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, *J. Apic. Res.* 37, 267-271
- Mayo M.A. (2002), Virus taxonomy - Houston 2002, *Arch. Virol.* 147, 1071-1076
- Mumford R., Barker I., Walsh K., Boonham N. (2000) The reliable detection of Potato mop-top and Tobacco rattle viruses directly from potato tubers, using a multiplex TaqMan® assay, *Phytopathology* 90, 1-6
- OIE (2000) Bee diseases in: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines (4th Edition), Section 2.9, www.oie.int, accessed 15th May 2003
- Ratnieks F.L.W. (1992), American foulbrood: The spread and control of an important disease of the honey bee, *Bee World* 73, 177-191
- Ribiere M., Faucon J.-P., Pepin M. (2000), Detection of chronic honey bee (*Apis mellifera* L.) paralysis virus infection: Application to a field survey, *Apidologie* 31, 567-577
- Shimanuki H. (1983), European foulbrood disease: its occurrence, treatment and prevention in the United States of America in: Proceedings of the International Symposium on European foulbrood, Quebec, Canada, 18-20 October 1981, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Quebec, Canada, pp 91-108
- Shimanuki H. (1990), Chapter Three: Bacteria in: Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, second edition, edited by R.A. Morse and R. Nowogrodzki, published by Cornell University Press, pp 28-47
- Stoltz D., Shen X.-R., Boggis C., Sisson G. (1995), Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection, *J. Apic. Res.* 34, 153-160
- Thompson H.M., Brown M.A. (1999), The role of the National Bee Unit in controlling statutory bee diseases, *Bee World* 80, 132-139
- Thompson H.M., Brown M.A. (2001), Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood?, *Bee World* 82, 130-138
- Todd J., Ball B. (2003), Viruses in New Zealand honey bees, *Bee Craft* (February), 12-13
- Trüper H.G., De' Clari L. (1998), Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition', *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 615
- Van de Peer Y., De Wachter R. (1994), TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment, *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570