

DES ÉTUDES PRÉLIMINAIRES SUR LES NOUVELLES MÉTHODES DE DÉPISTAGE DES AGENTS PATHOGÈNES DE L'ABEILLE MELLIFÈRE

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

¹National Bee Unit, Central Science Laboratory, Sand Hgutton, York YO41 ILZ, Angleterre

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

Resumé

National Bee Unit, appartenant à Central Science Laboratory (agence exécutive du Département pour l'environnement, alimentation et problèmes ruraux - Department for Environment, Food and Rural Affairs, Defra) s'est occupée de la mise au point des nouvelles techniques de dépistage des agents pathogènes des abeilles. A présent, des recherches sont en déroulement pour deux méthodes : un test à base d'anticorps pour l'identification des différentes formes de loque, test à utilisation sur le terrain, et un test de laboratoire, basé sur la présence des nucléotides, pour identifier les virus et pour différencier les espèces d'abeilles.

Les kits du test de terrain pour la loque sont destinés au dépistage des micro-organismes pathogènes *Melissococcus plutonius* et *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Les anticorps monoclonaux (IgG) ont été développés dans le Laboratoire scientifique central (CSL), en utilisant des cultures bactériennes récemment isolées, obtenues du matériel infecté. Les kits (connus sous le nom de dispositifs de flux latéral) se fondent sur la technologie déjà existante et se trouvent dans la propriété de CSL. Les anticorps ont été strictement examinés pour déterminer leur spécificité pour la bactérie relevante, étant testés aussi pour la réactivité croisée avec d'autres bactéries qu'on trouve d'habitude dans les colonies d'abeilles, y compris *Paenibacillus alvei* et *Brevibacillus laterosporus*. De même, on a testé l'opportunité de leur utilisation dans les dispositifs de flux latéral. Les kits pour la loque américaine (AFB) ont été validés dans le laboratoire en 2002, étants prêts pour les tests de terrain de 2003, et ceux pour la loque européenne (EFB) sont en cours de réalisation, anticipant les tests de laboratoire de 2003.

La technique de dépistage des virus des différentes espèces d'abeilles s'appuie sur la méthode en temps réel PCR, nommée TaqMan®. Les séquences génétiques de nombreux virus liés aux abeilles sont actuellement disponibles et on a projeté des amorces pour certains virus (y compris le virus Cachemire des abeilles et le virus de la paralysie aiguë), dans le but de les détecter chez les spécimens d'abeilles mellifères. Bien qu'à des stades préliminaires encore, les indices jusqu'à présent sont promettants. La méthodologie dispose d'une grande quantité de spécimens-base, 1500 tests potentiels capables de détecter simultanément quatre virus différents étant disponibles chaque semaine. Par conséquent, cette technologie dispose d'un grand potentiel en ce qu'il y a des projets de surveillance au Royaume Uni et à l'étranger à la fois. On a aussi mis au point une sonde de DNA capable d'identifier le DNA de l'abeille africanisée, en vue de la réalisation d'une étude sur cette espèce d'abeilles.

Introduction

Malgré les progrès enregistrés dans le domaine du diagnostic des maladies, les méthodes de routine utilisées dans ce domaine se fondent encore sur des méthodologies traditionnelles, comme la microscopie élémentaire ou les tests sérologiques. National Bee Unit (NBA), qui appartient au Laboratoire scientifique central (CSL) (agence exécutive du Département pour l'environnement, alimentation et problèmes ruraux - Department for Environment, Food and Rural Affairs, Defra) examine de nouvelles techniques pour détecter rapidement les agents pathogènes des abeilles. À présent, il y a deux méthodes en phase de recherche : un test de terrain à base d'anticorps pour identifier les formes de la loque et un test de laboratoire basé sur la présence des nucléotides, en vue d'identifier les virus et de différencier les espèces d'abeilles. Le but de la présente étude est d'introduire ces nouvelles méthodes dans le processus de diagnostiquer les maladies des abeilles et d'expliquer les progrès réalisés jusqu'à présent.

Les abeilles mellifères sont affectées par relativement peu de maladies, qui d'habitude, attaquent les adultes et de manière spécifique, les larves. La loque américaine et la loque européenne sont deux maladies de ce genre qui affectent d'habitude les larves et sont provoquées par des bactéries. L'incidence de ces maladies a une influence considérable sur l'économie et sur l'industrie apicole, les abeilles étant importantes pour la pollinisation et la production de miel et de cire (CARRECK et WILLIAMS, 1998). Les deux maladies ont été décrites et passées en revue par la littérature de spécialité (SHIMANUKI, 1983; SHIMANUKI, 1990; RATNIEKS, 1992; HANSEN et BRØDSGAARD, 1999). La loque américaine (AFB) est provoquée par *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (HORNITZKY, 1998), antérieurement connue sous le nom de *Bacillus*

larvae (HEYNDRICKX *et al.*, 1996), une bactérie aérobie qui forme des spores. La loque européenne (EFB) est causée par la bactérie microaéroophile exigeante *Melissococcus plutonius*, antérieurement connue sous le nom de *Melissococcus pluton* (BAILEY et COLLINS, 1982; BAILEY, 1983; TRUPER et DE'CLARI, 1998). Pourtant, on a trouvé aussi d'autres bactéries dans les larves affectées par EFB, comme *Paenibacillus alvei* et *Brevibacillus laterosporus*, les deux étant considérées comme des organismes saprophytes secondaires (ALIPPI, 1991).

Les deux maladies des larves surgissent partout dans le monde, bien que l'AFB réjouisse en général d'un plus grand intérêt. L'EFB fait l'objet d'une préoccupation majeure au Royaume Uni, ayant pourtant une influence relativement réduite dans d'autres pays du monde (SHIMANUKI, 1990; THOMPSON et BROWN, 2001). Respectant les termes de la législation concernant la santé des abeilles au Royaume Uni (l'Ordonnance visant la lutte contre les maladies des abeilles SI 1982 n°. 107, 1982), les autorités compétentes doivent être informées sur ces deux maladies. En Angleterre et au Wales, NBU coordonne les programmes de santé pour le Defra, et pour l'Assemblée Nationale du Département pour l'Agriculture de Wales (NAWAD). NBU dispose d'une équipe d'inspecteurs apicoles nommés qui font des inspections dans les colonies d'abeilles de tout le territoire anglais et gallois. Si une colonie est suspectée d'être atteinte par une de ces deux maladies des larves, un échantillon symptomatique en est prélevé et envoyé au laboratoire de diagnostic de NBU, où l'échantillon est examiné pour détecter la présence des bactéries pathogènes, en vue de la confirmation de la maladie.

Un kit de test à l'aide duquel la maladie pourrait être confirmée sur le terrain, sans envoyer des échantillons au laboratoire, présente des avantages évidents. Il permettrait aux inspecteurs apicoles d'avoir immédiatement la confirmation de leur diagnostic, même pendant l'inspection, ce qui rendrait le combat contre la maladie encore plus efficace. De même, il pourrait donner la possibilité au personnel de diagnostic du laboratoire d'effectuer une plus grande quantité de travail de recherche et d'élargir son activité dans d'autres domaines de la santé des abeilles, à savoir leur surveillance, dans le but de dépister des agents pathogènes exotiques. Le CSL dispose de plus de 600 scientifiques qui consacrent leur activité à l'étude de différentes disciplines comme la biologie moléculaire, la chimie analytique et la pathologie des insectes. Au cadre de l'organisation, il y a également une équipe dont la direction de travail vise le diagnostic rapide de la maladie ou le développement de kits de test sur le terrain, surtout dans le domaine des maladies qui touchent les plantes. Ces kits, nommés des dispositifs de flux latéral (LFD), ont été mis au point pour diagnostiquer immédiatement sur le terrain les virus des plantes, à savoir les virus de la pomme de terre X et Y (DANKS et BARKER, 2000). Notre recherche a eu comme objectif l'adaptation de cette technologie en vue de la réalisation du kit de diagnostic de la loque, pour qu'elle soit utilisée par la suite par les inspecteurs apicoles et aussi par les apiculteurs eux-mêmes.

Un autre problème rencontré chez les abeilles est lié à la présence des virus. Il existe plusieurs techniques qui sont disponibles, y compris l'immunodiffusion dans le gel ou les tests basés sur l'ELISA, techniques qui utilisent des anticorps polyclonaux (ANDERSON, 1984; TODD et BALL, 2003). Les méthodes disponibles jusqu'à présent sont utiles dans le cas des spécimens grièvement infectés ou pour un nombre réduit de spécimens, mais on ne peut pas les appliquer facilement à des études à large échelle ou au dépistage de certains niveaux bas de virus, comme pourrait être le cas des infections cachées. En plus, les méthodes sérologiques, sensibles et spécifiques de dépistage des virus de l'abeille mellifère, sont difficiles à appliquer, car beaucoup de préparations de virus des abeilles sont des mélanges; la plupart des colonies contiennent un ou plusieurs virus (BAILEY *et al.*, 1981; STOLTZ *et al.*, 1995; EVANS et HUNG, 2000). Par conséquent, il est difficile de produire des anti-sérums vraiment spécifiques pour chaque virus des abeilles (ANDERSON, 1984).

Pendant les dernières années, de nombreux virus liés aux abeilles ont été divisés en séquences déposées dans des bases de données à libre accès au public, comme le sont GenBank et EMBL (GHOSH *et al.*, 1999; GOVAN *et al.*, 2000), leur nomenclature étant fixée de façon approximative (EVANS et HUNG, 2000; MAYO, 2002). Toutefois, on a enregistré l'apparition de quelques études portant sur leur incidence (ALLEN et BALL, 1996). La disponibilité croissante des séquences virales a donné la possibilité à NBU

d'aborder une nouvelle technique d'identification des virus, appelée TaqMan®, et basée sur la PCR en temps réel.

Matériel et méthodes

Les dispositifs de flux latéral

Les recherches préliminaires

Les kits de test sur le terrain, appelés dispositifs de flux latéral, sont projetés pour détecter la bactérie associée à AFB (*P. larvae* subsp. *larvae*). Quelques anticorps monoclonaux ont été développés dans le cadre du CSL et examinés pour leur spécificité pour *P. larvae* subsp. *larvae*. À la suite de l'examen initial, un anticorps est choisi comme étant le plus adéquat du point de vue de son activité, de sa capacité d'être utilisé pour le LFD et le manque de réactivité croisée contre d'autres bactéries liées à la ruche, y compris *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* et *P. alvei*. Une fois examiné et trouvé comme étant spécifique, il est introduit dans le LFD et il est utilisé par la suite dans le travail.

La validation de laboratoire

La validation de laboratoire implique les tests à l'aveugle de certains spécimens différents (qui d'habitude sont envoyés au laboratoire de diagnostic, comme partie du service d'inspection de NBU), pour voir s'ils sont ou non complètement spécifiques pour *P. larvae* subsp. *larvae*. Bien que la plupart des spécimens testés ait été infectés avec une ou les deux maladies des larves antérieurement mentionnées, on y a inclus d'autres, à savoir le couvain plâtré et les larves saines.

Taqman® pour l'identification des virus

Les recherches préliminaires

Pour réaliser des comparaisons détaillées entre la variabilité de la séquence *inter* et *intra*-virale, les gènes protéine enveloppe pour le virus de l'abeille du Cachemire (KBV), le virus de la paralysie aiguë des abeilles (ABPV), le virus du couvain sacciforme (SBV) et le virus de la cellule noire de la reine (BQCV) ont été extraits de la base de données EMBL. On a réalisé plusieurs alignements de la séquence, en se servant de l'algorithme CLUSTAL V, dans le paquet Megalign (DNA star). On a procédé par la suite à l'analyse phylogénétique, en calculant la distance génétique entre les paires séquentielles, en utilisant l'algorithme de Jukes et Cantor, ensuite en formant des grappes à partir de ces matrices, par leur rapprochement en TREECON (VAN DE PEER et DE WACHTER, 1994). La signification statistique de la formation des branches a été estimée en réalisant 100 répliques nouvelles du nouveau prélèvement en "lacet" de spécimens, en partant des données initiales. Pour la division en séquences du virus des ailes opaques (*nuageuses*) (CWV), la séquence est disponible uniquement dans le gène de la réplicase et non dans le gène de la protéine d'enveloppe également. La séquence du gène ARN de la polymérase (réplicase) dépendante de l'ARN a été comparée avec le gène de la réplicase pour le virus de l'abeille du Cachemire (KBV); D'autres séquences de la réplicase ne sont plus disponibles.

La sonde TaqMan® et la conception de l'amorce

La conception des amorces et des sondes pour les tests TaqMan® a été réalisée en utilisant le programme sur l'ordinateur appelé Primer Express™ (PE-Biosystems), comme décrit par Mumford *et al.* (2000). Des amorces d'avancement et de régression et une sonde étiquetée de FAM ont été projetées pour KBV, CWV, SBV et BQCV. Les zones de la séquence choisies pour projeter le test ont été celles où il y avait un haut degré de variation entre les espèces virales et aussi un haut degré de conservation à l'intérieur de l'espèce. Un test de contrôle positif interne (IPC) a été conçu pour le gène ribosomal 18S d'*Apis mellifera*. La

sonde pour ce test a été étiquetée de VIC, plutôt que de FAM, pouvant ainsi être utilisée d'une manière multiple avec chacun des tests viraux conçus. Ce contrôle a permis la surveillance de l'efficacité de l'extraction d'ARN des spécimens et l'évitement des faux résultats négatifs (comme c'est le cas où aucun virus n'a été dépisté à la suite de l'échec d'extraire d'ARN des spécimens d'abeilles).

Les tests avec TaqMan®

Les réactions TaqMan® ont été établies sur des plaques de réaction à 96 de puits chacune, en utilisant les kits réactifs de noyau PCR (PE-Biosystems), en conformité avec les protocoles fournis, mais en ajoutant 25 unités de M-MLV (Promega) par réaction. Pour chaque réaction on a ajouté 1 µl d'extrait d'ARN, jusqu'à un volume final de 25 µl. Les plaques ont été par la suite centrifugées dans des conditions génériques de système (48°C/30 min., 95°C/10 min. et 40 cycles de 60°C/1 min., 95°C/15 sec.), dans le cadre de la séquence de 7700 ou 7900 du système de dépistage (PE-Biosystems), tout en utilisant la collecte de données en temps réel.

Résultats

Les dispositifs de flux latéral

Les recherches préliminaires

On a développé quelques anticorps à activité contre *P. larvae* subsp. *larvae*. Les plus prometteurs ont été examinés, un en étant choisi pour la poursuite de l'étude. Il s'est avéré être complètement spécifique pour *P. larvae* subsp. *larvae*, montrant un manque de réactivité contre chacune des bactéries suivantes: *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*, *P. alvei*, une bactérie anaérobie non identifiée, isolée d'un échantillon infecté avec EFB, *Escherichia coli* ou *Ralstonia solanacearum* (la cause de la pourriture brune de la pomme de terre). Cet anticorps a été introduit dans un test LFD, étant trouvé comme adéquat.

La validation de laboratoire

Le Tableau 1 offre un inventaire sommaire des résultats de la validation de laboratoire pour LFD AFB.

Tableau 1

Inventaire sommaire des résultats de la validation de laboratoire pour LFD AFB

Type du spécimen	N° total testé	Réaction avec LFD
Spécimen positif AFB	77	71
Spécimen positif EFB	87	1
Autres (par ex., le couvain plâtré)	31	0

Les résultats montrent que le test LFD s'est prouvé hautement spécifique pour les larves infectées avec AFB. On a enregistré une seule réaction positive fautive dans le cas d'une larve congelée en préalable, infectée avec EFB, qui a mis en évidence une faible réaction positive. Parce que cela a été la seule réaction positive faible, on a considéré qu'il s'agissait d'un cas isolé, avec peu de probabilités de répétition. Les spécimens qui ont été initialement diagnostiqués comme étant positives pour AFB, mais qui, par la suite, n'ont pas réagi au kit LFD, étaient très dilués; les résultats ne sont pas surprenants, car les kits sont conçus pour détecter un grand nombre de spores présents chez une larve symptomatique. On n'a pas enregistré des réactions avec d'autres larves testées, à savoir celles contenant *P. alvei* ou *B. laterosporus*, ou celles apparemment saines, provenant des mêmes rayons de miel comme les autres larves affectées d'AFB ou d'EFB.

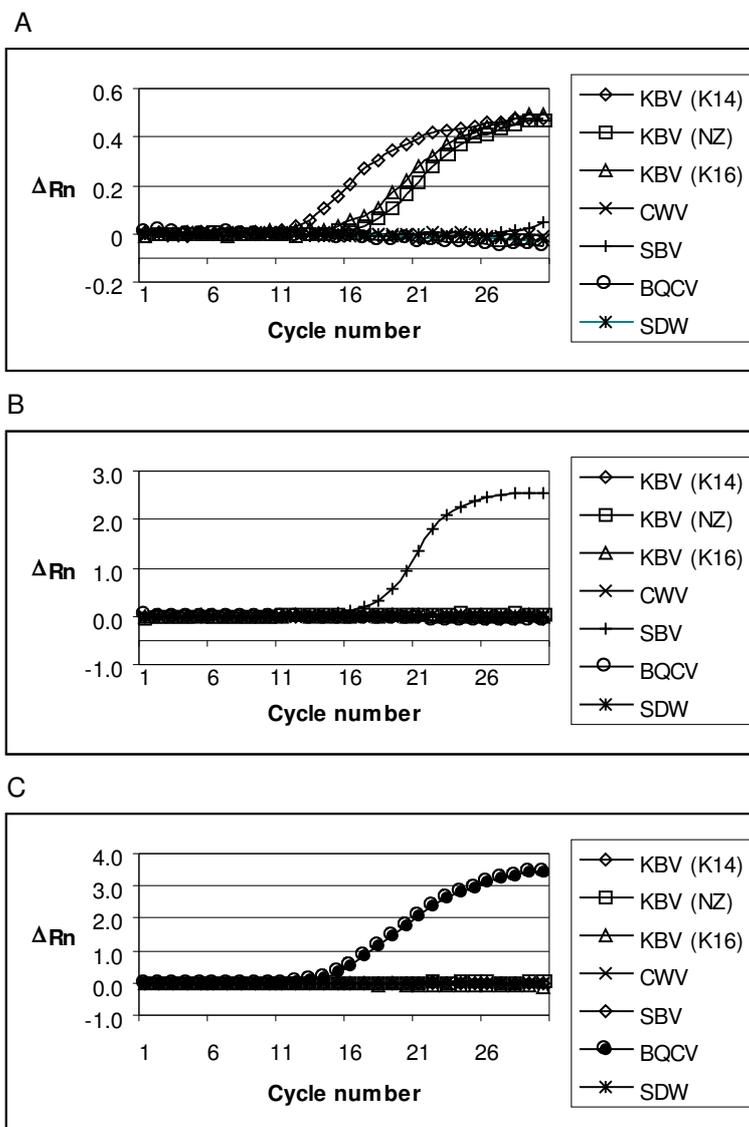
Taqman® pour l'identification des virus

L'analyse de la séquence

En comparant les séquences de virus intéressantes, on a choisi des zones à même d'offrir une bonne séparation des espèces de virus. À remarquer *le virus de l'abeille du Cachemire* et *le virus de la paralysie aiguë des abeilles* : ces deux espèces sont étroitement apparentées, bien que l'analyse ultérieure ait montré que la protéine d'enveloppe peut être utilisée pour les séparer. On a manqué d'obtenir un spécimen purifié d'ABPV pour mettre en évidence le manque de réactivité croisée. La seule séquence disponible pour *le virus des ailes opaques* a été le gène de réplicase. En poursuivant la comparaison de la séquence on a démontré que le gène de réplicase du *virus des ailes opaques* était identique à celle du *virus de l'abeille du Cachemire*, et on s'attend à ce que le test conçu, basé sur cette séquence, détecte aussi le *virus de l'abeille du Cachemire*.

Les tests TaqMan®

Les tests TaqMan® conçus ont été utilisés sur une large gamme de préparations virales purifiées, acquises de CSIRO, en Australie. Les résultats sont présentés dans la Figure 1.



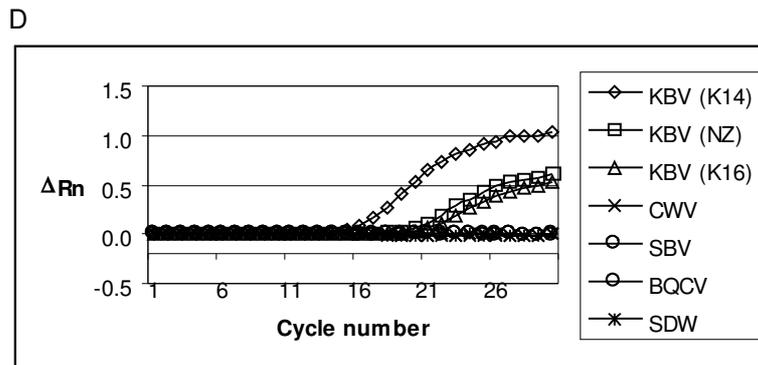


Fig. 1 - Illustration du dépistage des virus des abeilles, en utilisant PCR en temps réel. A : Dépistage KBV, avec le test KBV, B : dépistage SBV, avec le test SBV, C : dépistage BQCV, avec le test BQCV et D : dépistage KBV avec le test CWV. SDW est le contrôle négatif, dilué avec de l'eau.

(en bas, au centre, à A, B, C, D) Nombre de cycles :

Dans chacun des cas, comme l'on a mis en évidence, le test a donné le résultat attendu. Les tests pour le *virus du couvain sacciforme* et le *virus de la cellule noire de la reine* sont entièrement spécifiques, pendant que celles pour le *virus de l'abeille du Cachemire* et le *virus des ailes opaques* ont dépisté toutes les formes isolées du *virus de l'abeille du Cachemire*. Pourtant, aucun des tests n'a détecté de l'ARN dans la préparation du *virus des ailes opaques* ; la continuation des recherches s'impose avant que les causes du phénomène soient confirmées, bien qu'on soupçonne que l'ARN de la préparation ait été dégradé. Le test pour le *virus de l'abeille du Cachemire* a été apparemment spécifique pour les formes isolées de KBV.

Discussions

Les méthodes détaillées dans la présente étude sont nouvelles pour le domaine de la diagnose des maladies de l'abeille mellifère, bien qu'elles aient été utilisées pendant quelques années pour les maladies des plantes (MUMFORD *et al.*, 2000; DANKS et BARKER, 2000). Pourtant, elles ont été adaptées avec succès pour qu'elles puissent être utilisées en apiculture.

Les tests de terrain pour la loque américaine représentent un concept complètement nouveau dans la diagnose des maladies des abeilles. Dans les pays où l'on diagnostique les maladies des abeilles, les analyses s'effectuent de façon courante dans un laboratoire (ALIPPI, 1991; OIE, 2000). La possibilité de les réaliser sur le terrain présente un très grand intérêt, surtout dans les pays où il est impossible de disposer d'amples services d'inspection, à savoir, l'Australie (GOODWIN, communication personnelle). Des kits pour détecter la loque européenne sont également en cours de réalisation, étant à présent dans le stade de validation de laboratoire. On anticipe que le stade de validation sur le terrain sera initié au Royaume Uni avant la fin de la saison 2003. Cette maladie présente un très vif intérêt au Royaume Uni (THOMPSON et BROWN, 1999).

Le dépistage des virus par la technique TaqMan® jouit d'un potentiel immense dans l'activité future, aussi au Royaume Uni qu'à l'étranger. Toute recherche sur la présence des virus des abeilles dans les colonies a tenu, compte jusqu'à présent de l'accès aux anti-sérums. Par conséquent, la comparaison des données a été dépendante de la spécificité des anti-sérums créés dans de différents laboratoires. Ce fait a une grande importance, car les abeilles et leur colonies présentent souvent des infections (EVANS, 2001). Les tests quantitatifs, similaires à ELISA, réclament aussi l'accès aux anticorps adéquats et aux préparations virales purifiées (TODD et BALL, 2003). Dans la plupart des cas, les études effectuées ne sont pas arrivées à détecter des infections cachées, étant utilisées surtout pour le diagnostic (HORNITZKY, 1987; ALLEN et BALL, 1996). Par la suite des méthodologies impliquées, elles se limitent aussi à la dimension des

spécimens utilisés (TODD et BALL, 2003), sans que les résultats soient toujours concluants (RIBIERE *et al.*, 2000). Pourtant, comme cette étude a montré, l'utilisation de la technologie TaqMan® dépasse les problèmes liés à la disponibilité du réactif et rend possible l'application de méthodes RT-PCR à haute sensibilité et spécificité, méthodes qu'on est en train d'utiliser de façon quantitative (pour quelques ordres de magnitude) pour un grand nombre de spécimens, et l'utilisation du contrôle du gène ribosomal interne 18S permet de mesurer l'efficacité de l'extraction, ayant la certitude que des faux résultats négatifs ne vont pas exister.

Il est évident que ces nouvelles technologies peuvent être appliquées avec succès au dépistage des maladies des abeilles. La poursuite des recherches est anticipée dans les deux zones sur lesquelles on fournit des informations dans la présente étude. Tout cela pourrait conduire vers une nouvelle étape dans la compréhension de quelques faits inconnus dans le monde des fois mystérieux de ces infections et peut-être, vers la mise en place de meilleures voies d'administration des maladies des abeilles.

Remerciements

Les auteurs voudraient adresser leur gratitude à Chris DANKS, Victoria TOMKIESET Jonathan FLINT, pour le développement du LFD, à Neil BOONHAM, pour la réalisation du TaqMan® et à Denis ANDERSON, pour la fourniture des spécimens viraux.

RÉFÉRENCES

- 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, Québec, 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