

PRÄLIMINÄRSTUDIEN ÜBER NEUE ENTDECKUNGSMETHODEN DER KRANKHEITSERREGER DER HONIGBIENE

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

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

²Vita (Europe) Ltd., 21 Wote Street, Basingstoke, RG 21 7NE, ENGLAND

Resümee

National Bee Unit, Teil des Central Science Laboratory (CSL), eine Exekutivagentur des Ministeriums für Umwelt, Ernährung und Dorfangelegenheiten (Defra), hat neue Methoden zur Entdeckung von Krankheitserregern der Bienen entwickelt. Zwei verschiedene Methoden wurden getestet, wobei das eine ein Antikörpertest für die Identifizierung der Faulbrut unter Feldbedingungen und das zweite ein Labortest aufgrund von Nukleotiden für Viren und Differenzierung der Bienenspezies ist. Der Faulbrut-Feldtestkit dient der Entdeckung der pathogenen Mikroorganismen *Melissococcus plutonius* und *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. CSL erhielt monoklonale Antikörper (IgG) aus frisch isolierten Bakterienkulturen, die von infiziertem Material stammten. Das Kit fußt auf einer Technologie des CSL. Zur Feststellung der Spezifität des relevanten Bakteriums wurden die Antikörper rigorös gescreent. Es folgte ein Testen der Kreuzreaktivität mit anderen Bakterien, die üblicherweise im Bienenvolk vorkommen, einschließlich *Paenibacillus alvei* und *Brevibacillus laterosporus*. Auch die Anwendbarkeit von seitlichen Kits wurde getestet. Die Kits für AFB wurden 2002 im Labor genehmigt und standen in 2003 für das Testen im Gelände bereit. Der Kit für EFB befindet sich noch in der Entwicklungsphase und wird wahrscheinlich in 2003 im Labor getestet.

Die Entdeckungsmethode von Viren und verschiedenen Bienenspezies fußt auf einer realen PCR-Zeitmethode, TaqMan[®] genannt. Genetische Sequenzen vieler Bienenviren stehen zur Verfügung und es wurden Vorrichtungen für gewisse Viren (einschließlich Kashmir Bienenvirus und Virus der akuten Lähmung) entworfen, um sie in den Bienenproben zu entdecken. Obwohl erst am Anfang sind die Hinweise verheißungsvoll. Die Methode ist sehr leistungsfähig, sodaß 1500 Tests in jeder Woche erfolgen können, wobei gleichzeitig vier verschiedene Viren entdeckt werden können. Diese Methode eignet sich sehr gut für Überwachungsprojekte sowohl im Vereinigten Königreich als auch in Übersee. Außerdem wurde auch eine DNS-Probe entwickelt, mit der die DNS afrikanisierter Honigbienen identifiziert werden kann, sodaß auf diese Weise diese Bienen überwacht werden können.

Einleitung

Trotz der Fortschritte auf dem Gebiete der Krankheitsdiagnose beruhen die geläufigen Methoden auf diesem Gebiete weiterhin auf traditionellen Methodologien, wie die elementare Mikroskopie oder das Testen der Seren. National Bee Unit (NBU), Teil des Wissenschaftlichen Zentrallabors (CSL), untersucht neue Technologien für die schnelle Entdeckung der Krankheitserreger der Bienen. Zwei Methoden werden heutzutage geprüft, u. zwar ein Feldtest aufgrund von Antikörper für die Identifizierung der Faulbrutformen und ein Labortest aufgrund von Nukleotiden für die Identifizierung von Viren und die Differenzierung der Bienenspezies. Die vorliegende Arbeit möchte diese neuen Diagnosemethoden der Bienenkrankheiten vorführen und die erzielten Fortschritte beschreiben.

Die Honigbienen leiden an ziemlich wenig Krankheiten, die gewöhnlich die adulten Bienen betreffen oder, spezifischerweise, die Larven. Zwei solche Krankheiten sind die amerikanische Faulbrut und die europäische Faulbrut. Beide befallen die Larven und werden von Bakterien verursacht. Das Auftreten dieser Krankheiten beeinflusst die Bienenzuchtindustrie sehr stark von ökonomischem Standpunkt, da die Bienen eine bedeutende Rolle in der Bestäubung, der Honig- und Wachsgewinnung spielen (CARRECK und WILLIAMS, 1998). Beide Krankheiten wurden von der Fachliteratur eingehend beschrieben (SHIMANUKI, 1983; SHIMANUKI, 1990; RATNIEKS, 1992; HANSEN und BRODSGAARD, 1999). Die amerikanische Faulbrut (AFB) wird von *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* verursacht (HORNITZKY, 1998), vorher als *Bacillus larvae*, eine aerobe sporenbildende Bakterie, bekannt (HEYNDRICKX et al., 1996). Die europäische Faulbrut (EFB) wird von der mikroaerophilen Bakterie *Melissococcus plutonius* verursacht, früher als *Melissococcus pluton* bekannt (BAILEY und COLLINS, 1982; BAILEY, 1983; TRÜPER und DE'CLARI, 1989). In den von der EFB befallenen Larven werden aber auch andere Bakterien gefunden, wie *Paenibacillus alvei* und *Brevibacillus laterosporus*, beide sekundäre Saprophytenorganismen (ALIPPI, 1991).

Beide Brutkrankheiten kommen in der ganzen Welt vor, die AFB in etwas größerem Maße. Die EFB ist für das Vereinigte Königreich ein Problem, kommt aber in den anderen Teilen der Welt in kleinerem Maße vor (SHIMANUKI, 1990; THOMPSON und BROWN, 2001). Gemäß der Gesundheitsgesetzgebung für Bienen (Gesetzgebung zur Bekämpfung von Bienenkrankheiten SI 1982 Nr. 107, 1982) müssen in Großbritannien beide Krankheiten bei den zuständigen Behörden angemeldet werden. In England und Wales kontrolliert NBU die Gesundheitsprogramme sowohl für Defra als auch für die Nationalversammlung der Landwirtschaftsabteilung von Wales (NAWAD). NBU hat ein Team von ernannten Bieneninspektoren, die alle Bienenvölker, die in England und Wales aufgestellt sind, inspektieren. Wird ein Bienenvolk auf eine dieser beiden Brutkrankheiten verdächtig, wird eine symptomatische Larvenprobe entnommen und in das Diagnoselabor von NBU gesendet, wo sie auf die Anwesenheit der Krankheitserreger geprüft wird, um auf diese Weise die Erkrankung festzustellen.

Ein Testkit, das die Krankheit auf dem Felde bestätigen würde, ohne daß Proben ins Labor geschickt werden, wäre viel vorteilhafter. Die Bieneninspektoren könnten die Diagnose auf der Stelle während der Inspektion bestätigen, was eine bessere Bekämpfungsmethode sichern würde. Auch das Laborpersonal könnte sich anstatt Diagnose mehr mit der Forschungsarbeit beschäftigen und die

Gesundheit der Bienen überwachen und fremde Krankheitserreger entdecken. Bei CSL sind über 600 Wissenschaftler tätig, die sich mit verschiedenen Gebieten befassen, wie molekuläre Biologie, analytische Chemie und Insektenpathologie. Im Rahmen der Organisation befaßt sich ein Team mit der schnellen Diagnose von Krankheiten, einschließlich der Aufstellung von Gelände-Testkits vor allem für Pflanzenkrankheiten. Diese Kits, Vorrichtungen für seitlichen Fluß (LFD) genannt, wurden zur sofortigen Diagnose von Pflanzenviren entwickelt, wie der X und Y-Virus der Kartoffeln (DANKS und BARKER, 2000). Unsere Forschung befaßte sich mit der Anpassung dieser Technologie, um Diagnosekits der Faulbrut zu erhalten, die sowohl von den Bieneninspektoren als auch den Imkern selbst verwendet werden können.

Ein weiteres Problem der Bienen ist die Anwesenheit von Viren. Es existieren mehrere Techniken, einschließlich Gelimmdiffusion oder auf ELISA fußende Tests, die poliklonale Antikörper verwenden (ANDERSON, 1984; TODD und BALL, 2003). Die heutzutage verfügbaren Methoden sind nützlich im Falle von stark befallenen Proben oder einer geringen Probenzahl, können aber bei großangelegten Studien oder bei der Entdeckung von sehr niedrigen Virenniveaus nicht leicht verwendet werden, so wie es der Fall unsichtbarer Infektionen ist. Die empfindlichen und spezifischen Serummethode sind bei der Entdeckung der Viren der Honigbienen schwer anwendbar, da viele Virenpräparate Mischungen sind. Die meisten Bienenvölker enthalten einen oder mehrere Viren (BAILEY et al., 1981; STOLTZ et al., 1995; EVANS und HUNG, 2000). Folglich können nur schwer tatsächlich spezifische Antiseren für jeden Bienenvirus aufgestellt werden (ANDERSON, 1984).

Zahlreiche bienenbezogene Viren wurden in den letzten Jahren sequenziert und die Sequenzen in öffentlichen zugänglichen Datenbanken gespeichert, wie GenBank und EBML (GHOSH et al., 1999; GOVAN et al., 2000), wobei ihre Nomenklatur nur ungenau festgelegt wurde (EVANS und HUNG, 2000; MAYO, 2002). Dennoch wurden auch einige Studien über ihr Erscheinen unternommen (ALLEN und BALL, 1996). Dank der wachsenden Disponibilität der Virussequenzen konnte NBU eine neue Identifizierungstechnik der Viren aufstellen, die TaqMan[®] heißt und auf RT-PCR fußt.

Material und Methoden

Vorrichtung für seitlichen Fluß

Anfängliche Untersuchungen

Die Gelände-Testkits, Vorrichtungen des seitlichen Flußes genannt, dienen der Entdeckung des Krankheitserregers, der mit AFB in Verbindung steht (*P. larvae* subsp. *larvae*). Im Rahmen des CSL wurden einige monoklonale Antikörper entwickelt und auf ihre Spezifität für *P. larvae* subsp. *larvae* untersucht. Nach der anfänglichen Untersuchung wurde ein Antikörper als der geeignetste ausgesucht, u.zwar aufgrund seiner Tätigkeit, seiner Verwendbarkeit bei LFD und der abwesenden Kreuzreaktivität gegenüber anderen bienenvolkbezogenen Bakterien, wie *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* subsp. *pulvificiens* und *P. alvei*. Nach seinem Screening und seiner spezifischen Begutachtung wurde der Antikörper in LFD eingeführt und das Weitere unternommen.

Laborgültigkeit

Die Gültigkeitserklärung im Labor betrifft das Blindtesten von zahlreichen unterschiedlichen Proben (die üblicherweise dem Labor zur Diagnose als Teil der Inspektionsdienststeller des NBU gesendet werden), um festzustellen, ob der Antikörper für *P. larvae* subsp. *larvae* vollständig spezifisch ist. Obwohl die Mehrzahl der getesteten Proben von einem der Faulbrutkrankheiten angesteckt war, wurden auch andere in Betracht genommen, wie Mumien der Kalkbrut und gesunde Larven.

TaqMan[®] für Identifizierung der Viren

Anfängliche Untersuchungen

Für einen detaillierten Vergleich der Variabilität der *Inter-* und *Intraviralsequenzen* wurden die Hüllenproteingene des Kashmir Bienenvirus (KBV), des Virus der akuten Bienenlähmung (ABPV), des Virus der Sackbrut (SBV) und des Virus der schwarzen Königinnenzelle (BQCV) aus der EMBL-Datenbasis entladen. Mithilfe von dem CLUSTAL V Algorithmus wurden in der Megalign-Packung (DNS-Star) multiple Sequenzabsteckungen durchgeführt. Danach erfolgte die phylogenetische Analyse durch das Berechnen der genetischen Distanz zwischen den Sequenzpaaren mit den Jukes- und Cantoralgorithmen und ein Clusterring dieser Matrizes durch TREECON-Neighbour joining (VAN DE PEER und DE WACHTER, 1994). Die statistische Signifikanz der Verzweigung wurde durch 100 Replikationen von neuen Strangproben der Originaldaten eingeschätzt. Für den Virus der trüben Flügel (CWV) war die Sequenz nur im Replikasegen und nicht im Proteingen der Hülle verfügbar. Die Sequenz für den von der RNS abhängigen RNS-Polymerase(Replikase)gen wurde mit dem Replikasegen des Kashmir Bienenvirus (KBV) verglichen. Andere Replikasesequenzen waren nicht verfügbar.

TaqMan®-Sonde und Primerdesign

Das Primer- und Sondedesign der TaqMan®-Versuche wurden mit Primer Express™ Software (PE-Biosysteme) durchgeführt, so wie von MUMFORD et al. (2000) beschrieben. Forward- und Reverseprimer und eine FAM-bezeichnete Sonde wurden für KBV, CWV, SBV und BQCV bestimmt. Die für den Versuchsdesign ausgesuchten Sequenzregionen waren diejenigen, in denen zwischen den Virusspezies ein großer Variationsgrad, aber innerhalb der Spezies ein großer Konservierungsgrad existierte. Ein innerer positiver Kontrolltest (IPC) wurde für das 18S Ribosomgen von *Apis mellifera* aufgestellt. Die Sonde für diesen Test wurde eher VIC etikettiert als FAM und deshalb konnte sie im Multiplex bei jedwelchem ausersehenen Virustest verwendet werden. Diese Kontrolle erlaubte die Überwachung der Wirksamkeit der RNS-Extrahierung aus den Proben und bewahrte vor falschen negativen Ergebnissen (z.B. wenn wegen der mißlungenen RNS-Extrahierung aus den Bienenproben kein Virus entdeckt werden konnte).

TaqMan®-Untersuchungen

Die TaqMan®-Reaktionen erfolgten auf Reagenzplatten mit 96 Vertiefungen mit PCR Kernreagenzkits (PE-Biosystems) gemäß der gelieferten Protokolle, jedoch mit der Zugabe von 25 M-MLV-Einheiten (Promega) pro Reaktion. Für jede Reaktion wurde 1 µl RNS-Extrakt zugefügt, sodaß das Endvolumen 25 µl betrug. Danach wurden die Platten unter generellen Systembedingungen (48 °C/30 min, 95 °C/10 min und 40 Zyklen bei 60 °C/1 min, 95 °C/15 sek) innerhalb des 7700 oder 7900 Sequenz-Detektionssystems (PE-Biosystems) und mit Gebrauch einer RT-Datensammlung zyklert.

Ergebnisse

Vorrichtungen für seitlichen Fluß

Anfängliche Untersuchungen

Es wurden einige Antikörper mit einer gegen *P. larvae* subsp. *larvae* ausgerichteten Aktivität entwickelt. Die meistversprechenden wurden gescreent und einer für das folgende Studium ausgesucht. Er war für *P. larvae* subsp. *larvae* vollkommen spezifisch, wies keine Reaktivität gegenüber den folgenden Bakterien auf: *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*, *P. alvei*, ein unidentifiziertes anaerobes aus einem von EFB angesteckter Probe isoliertes Bakterium, *Escherichia coli* oder *Ralstonia solanacearum* (Ursache des braunen Kartoffelschimmels). Dieser Antikörper wurde in ein LFD eingeführt und als entsprechend gefunden.

Laborgültigkeit

Tab. I enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Laborgültigkeit im Falle von AFB LFD.

Tabelle I

Zusammenfassung der AFB LFD Laborgültigkeitstests

Probtyp	Insgesamt getestete Zahl	Reaktion mit LFD
AFB positive Proben	77	71
EFB positive Proben	87	1
Andere (Kalkbrut-Mumien)	31	0

Die Ergebnisse beweisen, daß der LFD-Test für die mit AFB infizierten Larven ausgeprägt spezifisch war. E gab nur eine einzige falsche positive Reaktion, erhalten bei einer EFB infizierten und tiefgefrorenen Larve. Dieses zeigte eine schwache positive Reaktion. Da es nur diese eine positive Reaktion gab, wurde begutachtet, daß es eine singuläre Erscheinung wäre, die nicht mehr vorkommen wird. Die Proben, die anfänglich als AFB positiv gedeutet wurden und die aber im LFD-Kit fehlten, wurden stark verflüssigt. Diese Ergebnisse waren nicht überraschend, da die Kits dazu bestimmt waren, in einer symptomatischen Larve eine große Sporenzahl zu entdecken. Es wurden keine Reaktionen mit anderen getesteten Larven beobachtet, wie z.B. solche die *P. alvei* oder *B. laterosporus* enthielten, oder solche, die scheinbar gesund waren, aber von den gleichen Waben stammten wie die von AFB oder EFB infizierten Larven.

TaqMan® für Virusidentifizierung

Sequenzanalyse

Beim Vergleich der Sequenzen interessanter Viren wurden Regionen selektiert, die eine gute Trennung der Virusspezies garantieren konnten. Hervorzuheben wäre der Kashmir Bienenvirus und der Virus der akuten Bienenlähmung: Diese zwei Spezies sind eng verwandt, obwohl weitere Analysen ergaben, daß das Hüllenprotein zu ihrer Unterscheidung benützt werden kann. Wir konnten keine geläuterte Probe von ABPV erhalten, um die abwesende Kreuzreaktivität zu veranschaulichen. Die einzige verfügbare Sequenz des Virus der trüben Flügel war das Replikasegen. Gemäß dem paarweise Sequenzvergleich wurde bewiesen, daß das Replikasegen des Virus der trüben Flügel und das des Kashmir Bienenvirus

identisch waren und daß der Test, der aufgrund dieser Sequenz aufgestellt wurde, zur Entdeckung des Kashmir Bienenvirus führen mußte.

TaqMan®-Tests

Die aufgestellten TaqMan®-Tests wurden bei einer Reihe von geläuterten Viruspräparaten verwendet, die von CSIRO, Australien, gekauft worden sind. Abb.1 enthält die Ergebnisse.

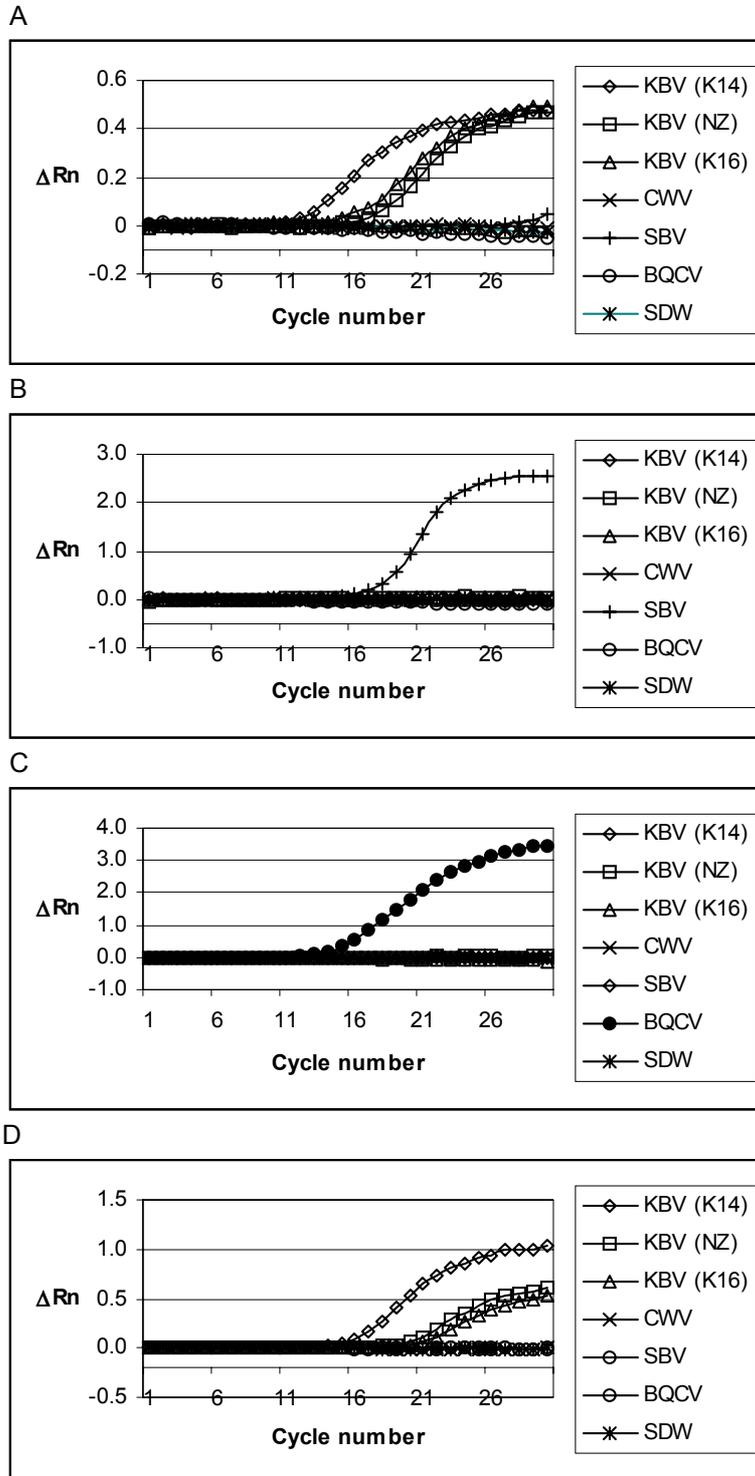


Abb. 1 – Illustrierung der Entdeckung von Bienenviren mit PCR reelle Zeitanwendung.

A: Entdeckung von KBV mit KBV-Test, B: SBV mit SBV-Test, C: BQCV mit BQCV-Test und D: Entdeckung von KBV mit CWV-Test. SDW ist die negative Kontrolle, mit Wasser verflüssigt.

Es ist eindeutig, daß in jedem Fall der Test das erwartete Resultat ergab. Die Tests für den Sackbrutvirus und dem Virus der schwarzen Königinnenzelle waren äußerst spezifisch, während die Tests für den Kashmir Bienenvirus und den Virus der trüben Flügel alle isolierten Formen des Kashmir Bienenvirus entdeckten. Keiner der Tests entdeckte RNS im Präparat des Virus der trüben Flügel. Die Forschungen müssen weiterhin fortgesetzt werden, noch bevor die Gründe dafür bestätigt werden können. Es wird vermutet, daß die RNS aus dem Präparat abgebaut wurde. Der Test für den Kashmir Bienenvirus war scheinbar für die KBV-Isolate spezifisch.

Diskussion

Die in dieser Arbeit dargebrachten Methoden sind neu auf dem Gebiete der Diagnose der Bienenkrankheiten, obwohl sie einige Jahre erfolgreich bei Pflanzenkrankheiten verwendet wurden (MUMFORD et al., 2000; DANKS und BARKER, 2000). Sie wurden erfolgreich an ihre Verwendung bei den Bienen angepaßt.

Die Feld-Testkits für die amerikanische Faulbrut stellen ein vollständig neues Konzept in der Diagnose der Bienenkrankheiten dar. In den Ländern, in denen eine Diagnose der Bienenkrankheiten erfolgt, wird diese üblicherweise in einem Labor durchgeführt (ALIPPI, 1991; OIE, 2000). Ihre Durchführung im Gelände ist von großem Interesse, vor allem in den Ländern, wo weitangebrachte Inspektionsabteilungen nicht möglich sind, wie z.B. in Australien (GOODWIN, pers. Mitteilung). Es wird an Entdeckungskits für die europäische Faulbrut gearbeitet, wobei sich diese in der Phase der Laborgültigkeit befinden. Die Gültigkeitserklärung für Geländebedingungen wird wahrscheinlich im Vereinigten Königreich noch vor Ende der Saison 2003 erfolgen. Diese Krankheit ist für das Vereinigte Königreich von besonders großem Interesse (THOMPSON und BROWN, 1999).

Die Entdeckung der Viren mit der TaqMan[®]-Technik stellt sowohl im Vereinigten Königreich als auch im Ausland ein riesiges Potential für die künftige Tätigkeit dar. Jedwede Forschung über die Anwesenheit der Viren in den Bienenvölkern hing bis jetzt von den Antiseren ab. Auf diese Weise war der Datenvergleich von der Spezifität der in verschiedenen Labors hergestellten Antiseren abhängig. Diese Tatsache ist von größter Bedeutung, da die Bienen und ihre Völker sehr oft an viralen Ansteckungen leiden (EVANS, 2001). Die Mengentests fordern ähnlich wie ELISA den Zugang zu entsprechenden Antikörpern und zu geläuterten Viruspräparaten (TODD und BALL, 2003). In den meisten Fällen konnten die unternommenen Studien unsichtbare Infektionen entdecken. Sie wurden vor allem als Diagnosemittel verwendet (TODD und BALL, 2003) und boten nicht immer aufschlußreiche Ergebnisse (RIBIERE et al., 2000). Auch diese Untersuchung ergab, daß die Verwendung der TaqMan[®]-Technologie die Probleme der Verfügbarkeit des Reagenzmittels übersteigt, die Anwendung der hochempfindlichen und spezifischen RT-PCR-Methode ermöglicht, sodaß sie quantitativ bei einer großen Probenzahl verwendet werden kann. Die Verwendung der Kontrolle des inneren 18 S Ribosomalgens ermöglicht die Bewertung der Extrahierungswirksamkeit und verhindert falsche negative Ergebnisse.

Es ist eindeutig klar, daß diese neuen Technologien bei der Entdeckung der Bienenkrankheiten erfolgreich verwendet werden können. Die Forschungen werden auf beiden Gebieten, über welche die vorliegende Arbeit informierte, fortgesetzt. Dieses könnte der Beginn einer neuen Epoche in der Verständnis einiger Unbekannter dieser geheimnisvollen Welt der Infektionen sein und vielleicht auch der Beginn des Auffindens von guten Verwaltungsmethoden der Bienenkrankheiten.

Danksagung

Die Verfasser möchten Chris DANKS, Victoria TOMKIES und Jonathan FLINT für die LFD-Realisierung, Neil BOONHAM für die TaqMan[®]-Realisierung und Denis ANDERSON für die Virusproben danken.

LITERATUR

- 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