

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE NUEVOS METODOS DE DETECCION DE LOS AGENTES PATOGENOS DE LA ABEJA MELIFERA

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

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

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

Resumen

National Bee Unit, dependiente del Central Science Laboratory (agencia ejecutiva del Departamento para medio ambiente, alimentación y asuntos rurales - Department for Environment, Food and Rural Affairs, Defra), se encargó de diseñar nuevas técnicas de detección de los patógenos de las abejas. En la actualidad están en estudio dos métodos distintos: una prueba a base de anticuerpos, para la identificación de las distintas formas de loque in situ y una prueba de laboratorio, basada en la presencia de los nucleótidos, para los virus y la identificación de las especies de abejas.

Los maletines de la prueba in situ para la loque están concebidos para detectar los microorganismos patógenos *Melissococcus plutonius* y *Paenibacillus larvae subesp. larvae*. Los anticuerpos monoclonales (IgG) fueron desarrollados en el Laboratorio Científico Central (CSL), a partir de cultivos bacterianos recién aislados, obtenidos de material infectado. Los maletines (conocidos con el nombre de dispositivos de flujo lateral) se basan en la tecnología existente, propiedad del CSL. Los anticuerpos estuvieron sometidos a un riguroso estudio, al efecto de la determinación de su especificidad para la bacteria relevante, y se ensayaron para la reactividad cruzada con otras bacterias, habitualmente asociadas a las colonias de abejas, incluidos *Paenibacillus alvei* y *Brevibacillus laterosporus*. Se ensayó además sobre la conveniencia de su utilización en los dispositivos de flujo lateral. Los maletines para la loque americana (AFB) se validaron en el laboratorio en 2002, y estuvieron listos para ser ensayados en el campo en 2003, y los para la loque europea (EFB) están en curso de realización, anticipándose las pruebas de laboratorio en 2003.

La técnica de detección de los virus e identificación de las distintas especies de abejas se basa en el método PCR en tiempo real, con el nombre de TaqMan®. Están disponibles secuencias genéticas para numerosos virus relacionados con las abejas y ya están diseñados iniciadores para algunos virus (incluido el virus Cachemira de las abejas y el virus de la parálisis aguda), para su detección en las muestras de abejas melíferas. Aunque todavía es pronto, las señales son esperanzadoras. La metodología cuenta con gran cantidad de muestras-base, con 1500 pruebas potenciales disponibles cada semana, capaces de detectar simultáneamente cuatro virus diferentes. Por tanto, esta tecnología dispone de un gran potencial para los proyectos de seguimiento, tanto en el Reino Unido como en el extranjero. Finalizó asimismo la construcción de una sonda ADN, capaz de identificar el ADN de la abeja africanizada, al efecto de emprender un estudio sobre estas abejas.

Introducción

No obstante el avance registrado en el diagnóstico de las enfermedades, los métodos rutinarios utilizados en este ámbito se siguen basando en metodologías tradicionales, tales como la microscopia elemental o la prueba serológica. National Bee Unit (NBU), dependiente del Laboratorio Científico Central (CSL) (agencia ejecutiva del Departamento para medio ambiente, alimentación y asuntos rurales, Defra), estudia nuevas técnicas para la rápida detección de los patógenos de las abejas. En el presente, están en estudio dos métodos distintos, a saber: un ensayo de campo a base de anticuerpos, para la identificación de las formas de loque, y un ensayo de laboratorio, basado en la presencia de los nucleótidos, para la identificación de los virus y la identificación de las especies de abejas. El presente trabajo pretende incorporar estos nuevos métodos en la diagnosis de las enfermedades de las abejas y explicar los progresos registrados hasta ahora.

Las abejas melíferas son afectadas por relativamente pocas enfermedades, que suelen atacar a los adultos o, de modo específico, a las larvas. Dos enfermedades de este tipo son la loque americana y la loque europea; ambas atacan a las larvas y son ocasionadas por las bacterias. La incidencia de estas enfermedades tiene un considerable impacto económico en la industria apícola, dada la importancia de las abejas para la polinización y la producción de miel y cera (CARRECK y WILLIAMS, 1998). Ambas enfermedades han sido descritas y aparecen citadas en la literatura (SHIMANUKI, 1983; SHIMANUKI, 1990; RATNIEKS, 1992; HANSEN y BRØDSGAARD, 1999). La loque americana (AFB) es ocasionada por *Paenibacillus larvae subesp. larvae* (HORNITZKY, 1998), antiguamente conocida como *Bacillus larvae* (HEYNDRIKX et al., 1996), una bacteria aerobia formadora de esporas. La loque europea (EFB) es causada por la pretenciosa bacteria microaerófila *Melissococcus plutonius*, antiguamente conocida como *Melissococcus pluton* (BAILEY y COLLINS, 1982; BAILEY, 1983; TRÜPER y DE CLARI, 1998). Sin embargo, en las larvas afectadas por EFB se encontraron también otras bacterias, entre ellas *Paenibacillus alvei* y *Brevibacillus laterosporus*, consideradas las dos como organismos saprófitos secundarios (ALIPPI, 1991).

Ambas enfermedades de la cría ocurren en todo el mundo, si bien la AFB despierta, en general, un interés más amplio. La EFB suscita una preocupación mayor en el Reino Unido, pero tiene un impacto relativamente escaso en otras partes del mundo (SHIMANUKI, 1990; THOMPSON y BROWN, 2001). En los términos de la legislación sobre la sanidad de las abejas de Gran Bretaña (la Orden sobre el combate de las enfermedades de las abejas, SI 1982 no. 107, 1982), ambas enfermedades deben ser puestas en conocimiento de las autoridades pertinentes. En Inglaterra y el País de Gales, la NBU gestiona los programas de sanidad, tanto para Defra como para la Junta nacional del Departamento de agricultura de

Wales (NAWAD). La NBU cuenta con un equipo de inspectores apícolas nombrados, que inspeccionan las colonias de abejas de todo el territorio inglés y galés. Cuando se sospecha que una colonia tiene una de estas dos enfermedades de la cría, se toma una muestra larval sintomática y se envía al laboratorio de diagnóstico de la NBU, donde se le examina para la presencia de las bacterias patógenas, en vista de la comprobación de la enfermedad.

Un maletín de ensayo, capaz de comprobar la enfermedad in situ, sin necesidad de enviar las muestras al laboratorio, presenta obvias ventajas. Permitiría que los inspectores apícolas comprobaran el diagnóstico inmediatamente, durante la misma inspección, haciendo más eficaz el combate de la enfermedad. Igualmente, podría permitir que el personal de diagnóstico del laboratorio efectuara un mayor volumen de labores de investigación y extender su actividad también a otros aspectos de la sanidad de las abejas, como es su seguimiento, para la detección de los patógenos exóticos. El CSL cuenta con más de 600 científicos, que ponen su pericia al servicio de varias disciplinas, entre las cuales la biología molecular, la química analítica y la patología de los insectos. El estamento cuenta además con un equipo que dedica sus esfuerzos al rápido diagnóstico de la enfermedad y también a diseñar maletas de ensayos in situ, básicamente para las enfermedades de las plantas. Estas maletas, denominadas dispositivos de flujo lateral (LFD), se diseñaron para el diagnóstico inmediato, in situ, de los virus de las plantas, entre ellos los virus X y Y de la patata (DANKS y BARKER, 2000). Nuestra investigación persiguió la adaptación de esta tecnología para la realización de maletas de diagnóstico de la loque, para los inspectores apícolas y los propios apicultores.

Otro problema de las abejas es el de la presencia de los virus. Están disponibles varias técnicas, entre ellas la inmunodifusión sobre gel o las pruebas basadas en ELISA, que se valen de anticuerpos policlonales (ANDERSON, 1984; TODD y BALL, 2003). Los métodos de que se dispone en la actualidad pueden servir para muestras altamente infectadas o para un número reducido de muestras, pero no se les puede aplicar fácilmente a estudios de gran envergadura o a la detección de bajos niveles del virus, como es el caso de las infecciones no manifiestas. Hay más, los métodos serológicos, sensibles y específicos, de detección de los virus de la abeja melífera son de difícil aplicación, puesto que muchas preparaciones de virus de las abejas son mezclas; la mayoría de las colonias contienen uno o varios virus (BAILEY et al., 1981; STOLTZ et al., 1995; EVANS y HUNG, 2000). Por tal razón, es difícil que se produzcan antiseros realmente específicos para cada uno de los virus de las abejas (ANDERSON, 1984).

Numerosos virus asociados a las abejas han sido secuenciados en los últimos años, con las secuencias almacenadas en bases de datos con acceso público, como son GenBank y EMBL (GHOSH et al., 1999; GOVAN et al., 2000), cuya nomenclatura se estableció con aproximación (EVANS y HUNG, 2000; MAYO, 2002). Aún así, se registraron varios estudios sobre su incidencia (ALLEN y BALL, 1996). La disponibilidad cada vez mayor de las secuencias virales permitió al NBU seguir una nueva técnica de identificación de los virus, denominada TaqMan®, basada en la PCR en tiempo real.

Materiales y métodos

Dispositivos de flujo lateral

Investigaciones iniciales

Los maletines para pruebas in situ, denominados dispositivos de flujo lateral, están diseñados para la detección de la bacteria asociada con AFB (*P. larvae* subesp. *larvae*). Unos cuantos anticuerpos monoclonales fueron desarrollados en el CSL y se estudiaron para su especificidad para *P. larvae* subesp. *larvae*. Tras un examen inicial, un anticuerpo es escogido como más adecuado, en función de su actividad, su capacidad para ser utilizado en LFD y la falta de reactividad cruzada contra otras bacterias asociadas a la colmena, entre ellas *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* subesp. *pulvificiens* y *P. alvei*. Una vez estudiado y comprobado como específico, se le introduce en LFD y más adelante se trabaja con él.

Validación de laboratorio

La validación en el laboratorio consiste en ensayar en blanco muestras distintas (habitualmente enviadas al laboratorio de diagnóstico, como parte del servicio de inspección de la NBU), para comprobar si son o no completamente específicas para *P. larvae* subesp. *larvae*. Aunque la mayoría de las muestras ensayadas se infectaron por una de las dos citadas enfermedades de la cría, se incorporaron también otras, como cría calcificada, y también larvas sanas.

TaqMan® para la identificación de los virus

Investigaciones iniciales

Al efecto de la realización de comparaciones detalladas de la variabilidad de la secuencia *inter e intraviral*, los genes de cubierta para el *virus Cachemira de las abejas* (KBV), el *virus de la parálisis aguda de las abejas* (ABPV), el *virus de la cría ensacada* (SBV) y el *virus de la realera negra* (BQCV) se descargaron de la base de datos EMBL. Se efectuaron múltiples alineaciones de la secuencia, empleando el algoritmo CLUSTAL V, en el paquete Megalign (star ADN). Luego, se llevó a cabo el análisis filogenético, calculando la distancia genética entre los pares de la secuencia, empleando el algoritmo de Jukes y Cantor, y formando clústeres de estas matrices, conjuntándolos en TREECON (VAN DE PEER y DE WACHTER, 1994). La significación estadística de la formación de las ramas se valoró realizando 100 repeticiones del nuevo muestreo en "collar", partiendo de los datos originales. Para la secuencia del *virus del ala nublada* (CWV), la secuencia sólo está disponible en el gen de la replicasa y no sucede así en el gen de la proteína de cubierta. La secuencia del gen ARN polimerasa (replicasa) dependiente del ARN fue comparada con el gen de la replicasa para el *virus Cachemira de la abeja* (KBV); no están disponibles otras secuencias de la replicasa.

Sonda TaqMan® y diseño del iniciador

El diseño de los iniciadores y las sondas para los ensayos TaqMan® se realizó empleando el programa informático Primer Express™ (PE-Biosystems), como describen MUMFORD et al. (2000). Iniciadores de avance y regresión, así como una sonda etiquetada FAM se diseñaron para KBV, CWV, SBV y BQCV. Las zonas de la secuencia escogida para el proyecto del ensayo fueron aquellas donde había un alto grado de variación entre las especies virales, pero también un elevado grado de conservación dentro de la especie. Un ensayo testigo interno positivo (IPC) fue concebido para el gen ribosomial 18S de *Apis mellifera*. La sonda para este ensayo fue etiquetada VIC, antes que FAM, pudiendo así servir para múltiples usos con cualquiera de los ensayos virales concebidos. Este testigo permitió el seguimiento de la eficacia del extracto de ARN de las muestras y evitar falsos resultados negativos (cuando no se detectó ningún virus, por la extracción fallada del ARN de las muestras de abejas).

Las pruebas con TaqMan®

Las reacciones TaqMan® se establecieron sobre placas con 96 pocillas, empleando los maletines reactivos de núcleo PCR (PE-Biosystems), según los protocolos facilitados, pero añadiendo 25 unidades de M-MLV (Promega) por reacción. Para cada reacción se añadió 1 µl de extracto de ARN, hasta un volumen final de 25 µl. Se centrifugaron las placas en condiciones genéricas de sistema (48°C/30 min., 95°C/10 min. y 40 ciclos de 60°C/1 min., 95°C/15 seg.), en la secuencia de 7700 ó 7900 del sistema de detección (PE-Biosystems), utilizando la colección de datos en tiempo real.

Resultados

Dispositivos de flujo lateral

Investigaciones iniciales

Se desarrollaron varios anticuerpos activos contra *P. larvae* subesp. *larvae*. Se estudió a los más prometedores y se escogió a uno para continuar estudiando. Este resultó ser completamente específico para *P. larvae* subesp. *larvae*, al mostrar falta de reactividad frente a cualquiera de las siguientes bacterias: *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* subesp. *pulvificiens*, *P. alvei*, una bacteria anaerobia sin identificar, aislada de una muestra infectada por EFB, *Escherichia coli* o *Ralstonia solanacearum* (causante de la pudrición parda de la papa). Este anticuerpo fue introducido en un ensayo LFD, y se le consideró como adecuado.

Validación de laboratorio

La tabla I representa un breve repaso a los resultados de la validación de laboratorio para LFD AFB.

Tabla I

Repaso a los ensayos de validación de laboratorio de LFD AFB

Tipo de la muestra	No. total ensayado	Reacción con LFD
Muestra positiva AFB	77	71
Muestra positiva EFB	87	1
Otras (por ej., cría calcificada)	31	0

Los resultados indican que el ensayo LFD resultó ser altamente específico para las larvas infectadas por AFB. Se registró una sola reacción falsamente positiva, en una larva previamente congelada, infectada por EFB; ésta mostró una débil reacción positiva. Habiendo sido la única reacción falsamente positiva, se consideró que era un caso aislado, con poca probabilidad de repetirse. Las muestras inicialmente diagnosticadas como positivas para AFB, pero que posteriormente no reaccionaron con el maletín LFD, eran muy diluidas; los resultados no sorprenden porque los maletines están concebidos para la detección de gran número de esporas, presentes en una larva sintomática. No se registraron reacciones con otras larvas ensayadas, como aquellas que contenían *P. alvei* o *B. laterosporus*, o las aparentemente saludables, provenientes de los mismos panales que las demás larvas, afectadas por AFB o EFB.

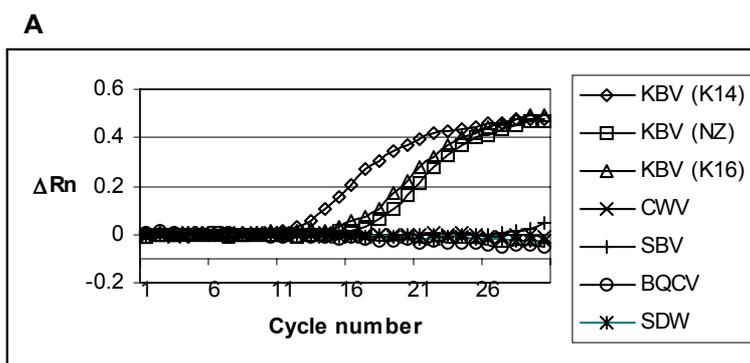
TaqMan® para la identificación de los virus

Análisis de la secuencia

Al comparar las secuencias interesantes de virus, se escogieron zonas aptas para una buena segregación de las especies de virus. Destacables son el *virus Cachemira de las abejas* y el *virus de la parálisis aguda de las abejas*: estas dos especies están estrechamente emparentadas, a pesar de que el análisis ulterior mostró que la proteína de cubierta puede servir para su separación. No llegamos a obtener una muestra purificada de ABPV, para evidenciar la ausencia de reactividad cruzada. La única secuencia disponible para el *virus del ala nublada* fue el gen de replicasa. Siguiendo la comparación por pares de la secuencia, quedó demostrado que el gen de replicasa del *virus del ala nublada* era idéntico al del *virus de Cachemira*, y el ensayo concebido a base de esta secuencia se esperaba que detectara también el *virus de Cachemira*.

Pruebas TaqMan®

Las pruebas TaqMan® diseñadas se utilizaron sobre una gama de preparaciones virales purificadas, adquiridas a CSIRO, Australia. Los resultados se presentan en la figura 1.



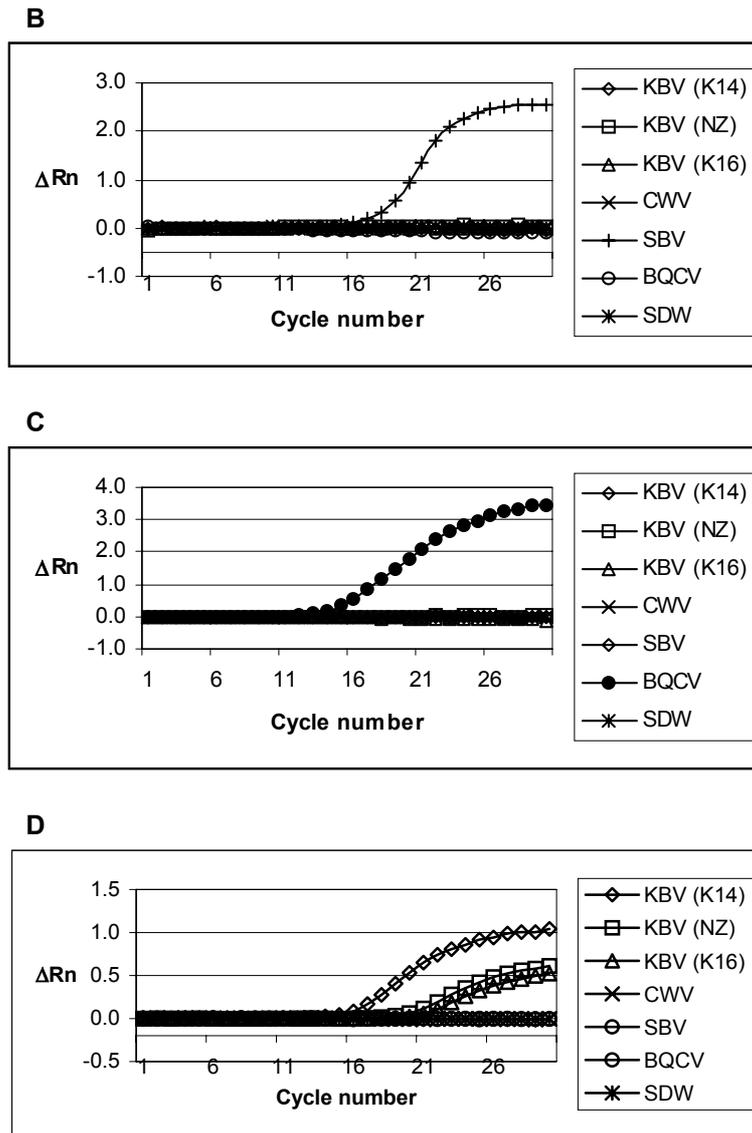


Figura 1 - Ilustración de la detección de los virus de las abejas, utilizando la PCR en tiempo real. A: Detección de KBV, por la prueba KBV, B: SBV, por la prueba SBV, C: BQCV, por la prueba BQCV y D: detección de KBV por la prueba CWV. SDW es el testigo negativo, diluido en agua.

Como se ha visto, en cada caso la prueba dio el resultado esperado. Las pruebas para el *virus de la cría ensacada* y el *virus de la realera negra* son plenamente específicos, mientras que los para el *virus de Cachemira* y el *virus del ala nublada* detectaron todas las formas aisladas del *virus de Cachemira*. No obstante, ninguna de las pruebas detectó el ARN en la preparación del *virus del ala nublada*; hay que seguir investigando, antes de que las causas del fenómeno se puedan confirmar, si bien se sospecha que el ARN de la preparación había sido degradado. La prueba para el *virus de Cachemira* apareció como específica para las formas de KBV aisladas.

Discusiones

Los métodos detallados en el presente trabajo son novedosos para el ámbito de la diagnosis de las enfermedades de la abeja melífera, aunque vienen siendo utilizados, desde hace varios años, para las enfermedades de las plantas (MUMFORD et al., 2000; DANKS y BARKER, 2000). Sin embargo, se los adaptó con éxito para ser utilizaros en las abejas.

Las pruebas *in situ* para la loque americana representan una concepción completamente nueva en la diagnosis de las enfermedades de las abejas. En los países donde las enfermedades de las abejas son

diagnosticadas, los análisis se suelen llevar a cabo en un laboratorio (ALIPPI, 1991; OIE, 2000). La posibilidad de efectuarlos sobre el terreno suscita gran interés, sobre todo en los países donde es imposible que se disponga de amplios servicios de inspección, como es Australia (GOODWIN, comunicación personal). También están en vías de realización maletas para la detección de la loque europea; actualmente en fase de validación en el laboratorio. Se anticipa que la fase de validación sobre el terreno se iniciará, en el Reino Unido, antes de finalizar la temporada de 2003. Esta enfermedad presenta máximo interés en el Reino Unido (THOMPSON y BROWN, 1999).

La detección de los virus mediante la técnica TaqMan® posee un inmenso potencial para la actividad futura, tanto en el Reino Unido como en el extranjero. Hasta ahora, cualquier investigación sobre la presencia de los virus de las abejas en las colonias ha estado en dependencia del acceso a los antisueros. Así, la comparación de los datos ha estado en función de la especificidad de los antisueros realizados en diversos laboratorios. El hecho tiene particular importancia, dada la gran incidencia de las infecciones virales en las abejas y sus colonias (EVANS, 2001). Los ensayos cuantitativos, similares a ELISA, también requieren del acceso a anticuerpos adecuados y a preparaciones virales purificadas (TODD y BALL, 2003). En la mayoría de los casos, los estudios efectuados no lograron detectar infecciones no manifiestas, utilizándoseles básicamente con función de diagnóstico (HORNITZKY, 1987; ALLEN y BALL, 1996). Por las metodologías utilizadas, también están limitados en cuanto al tamaño de las muestras (TODD y BALL, 2003) y, por eso, no proporcionan siempre resultados concluyentes (RIBIERE et al., 2000). Aún así, como muestra el presente estudio, la utilización de la tecnología TaqMan® supera los problemas ligados a la disponibilidad del reactivo, hace posible la aplicación de métodos RT-PCR de alta sensibilidad y carácter específico, y se han de utilizar cuantitativamente (por varios órdenes de tamaños) sobre gran número de muestras, y la utilización del testigo del gen ribosomal interno 18S permite valorar la eficacia de la extracción, asegurando que no habrá resultados falsamente negativos.

Está bien claro que estas nuevas tecnologías se pueden aplicar con éxito para la detección de las enfermedades de las abejas. La continuación de las investigaciones se anticipa para los dos ámbitos en relación con los cuales se aporta información en el presente trabajo. Todo esto puede llevar a una nueva era en el entendimiento de algunas de las incógnitas, en el mundo muchas veces misterioso de estas infecciones y, tal vez, a la instauración de mejores métodos de manejo de las enfermedades de las abejas.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Chris Danks, Victoria Tomkies y Jonathan Flint el haber realizado el LFD, a Neil Boonham la realización de TaqMan® y a Denis Anderson el haberles proporcionado las muestras virales.

BIBLIOGRAFIA

- 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
- Heydrickx 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*) *pulvificiens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvificiens*, *Int. J. Syst. 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