



November 1999

DJF rapport

Nr. 8 • Havebrug



Henrik Hansen & Camilla J. Brødsgaard

Ondartet bipest hos honningbier
– sygdommens biologi, diagnose og bekæmpelse

Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri
Danmarks JordbruksForskning

Ondartet bipest hos honningbier – sygdommens biologi, diagnose og bekæmpelse

Henrik Hansen & Camilla J. Brødsgaard
Afdeling for Plantebeskyttelse
Projektgruppe Biavl
Forskningscenter Flakkebjerg
DK-4200 Slagelse

DJF rapport Havebrug nr. 8 • november 1999

Udgivelse: Danmarks JordbrugsForskning Tlf. 89 99 19 00
Forskningscenter Foulum Fax 89 99 19 19
Postboks 50
8830 Tjele

Løssalg:
(incl. moms) t.o.m. 50 sider 50,- kr.
t.o.m. 100 sider 75,- kr.
over 100 sider 100,- kr.

Abonnement: Afhænger af antallet af tilsendte rapporter,
men svarer til 75% af løssalgsprisen.

Forsidefoto: Honningbi i mælkebøtte. (Foto: H. Hansen)

INDHOLD

	Side
Forord	5
Indledning	6
Udbredelse	7
Biologi	8
Karakteristik af bakterien	8
Klassifikation	8
Overlevelse	9
Larvers modtagelighed	11
Smitteforløb i larven	13
Udbrud i bifamilien	14
Spredning mellem bifamilier	15
Resistens mod ondartet bipest	16
Diagnose	20
Kliniske symptomer	21
Feltdiagnose	23
Rutinediagnose af yngelprøver i laboratoriet	23
Undersøgelse af voksne bier	25
Undersøgelse af honning for <i>P. l. larvae</i> -sporer	25
Undersøgelse af bilarver	26
Bestemmelse af bakteriestammer	27
Forebyggelse og bekæmpelse af ondartet bipest	27
Forurening af biavlsprodukter og -materiel	27
Forebyggelse	29
Aflivning af bifamilier	30
Omsætning	30
Bekæmpelse med lægemidler	35
Rengøring	35
Bekæmpelsen i Danmark	36
Organisation	36
Undersøgelser af bifamilier	36
Undersøgelse af prøver	37
Bekæmpelse	38
Fremskridt	39
Litteratur	40

Forord

Ondartet bipest er en alvorlig bakteriesygdom hos honningbiernes yngel. Bifamilier, der har kliniske symptomer på sygdommen i forseglede yngelceller, dør, hvis bifamilierne ikke behandles. Sygdommen er udbredt over det meste af verden og kan være årsag til store økonomiske tab. Bipest blev første gang beskrevet i 1769. På trods af at der er fokuseret på sygdommen i årtier, er den i de senere år blevet et stigende problem mange steder. Også i Danmark har der i de senere år været stigende problemer med sygdommen med en foreløbig kulmination i antallet af angrebne bigårde i 1999. Denne DJF rapport beskriver sygdommens biologi, diagnose og bekæmpelse.



Over det meste af verden er ondartet bipest en meget alvorlig sygdom hos honningbiernes yngel.

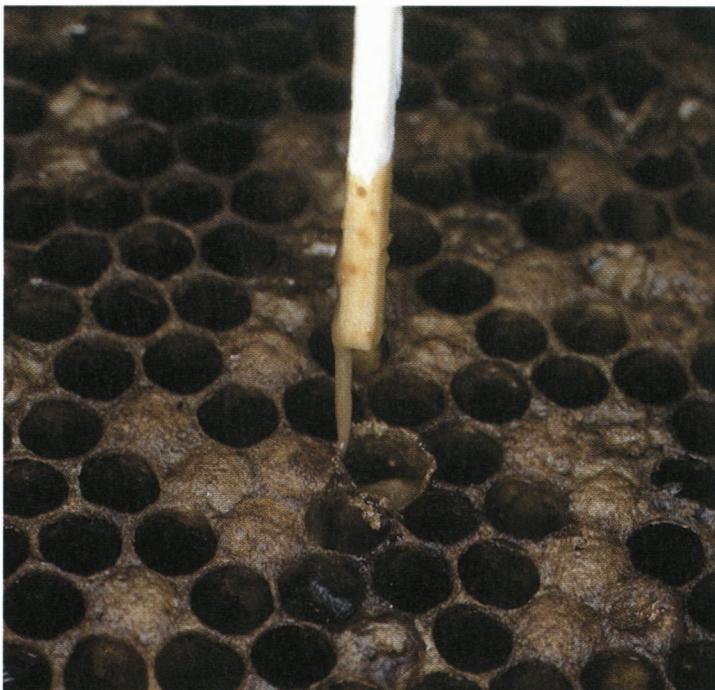
Indledning

Allerede i 1769 navngav franskmanden Schirach¹²⁰ en sygdomslignende tilstand hos honningbierenes yngel “foulbrood”. “Foulbrood” er den engelske betegnelse for bipest (foul: rådden, brood: yngel). Derefter har adskillige forskere kaldt forskellige sygdomstilstande for bipest. Det er ikke klart, hvilken af disse sygdomme, Schirach refererede til. I 1885 forsøgte englænderne Cheshire og Cheyne at klarlægge årsagen til en af bipest-sygdommene. Bakterien, som de isolerede, kaldte de *Bacillus alvei*¹²⁰. Denne sygdom blev senere kaldt europæisk bipest¹²⁰, fordi den blev beskrevet første gang af forskere i Europa. Amerikaneren White^{122,124} viste herefter, at den egentlige årsag til sygdommen var bakterien *Bacillus pluton*. Bakterien blev senere overført til slægten *Streptococcus*⁴ og senere til *Melissococcus*. Dens navn i dag er derfor *Melissococcus pluton*⁵.

I 1903 observerede White en anden bakterie i forbindelse med en af de andre sygdomme, der blev kaldt bipest. Han navngav bakterien *Bacillus larvae*¹²⁰. Denne sygdom blev herefter kaldt amerikansk bipest, fordi undersøgelserne var udført i USA (staten New York). I Danmark kaldes sygdommen ondarten bipest. I 1996 blev bakterien overført til slægten *Paenibacillus* og fik navnet *Paenibacillus larvae larvae*⁵².



Yngel død af ondarten bipest. Sympomerne ses normalt først efter celforseglingen.

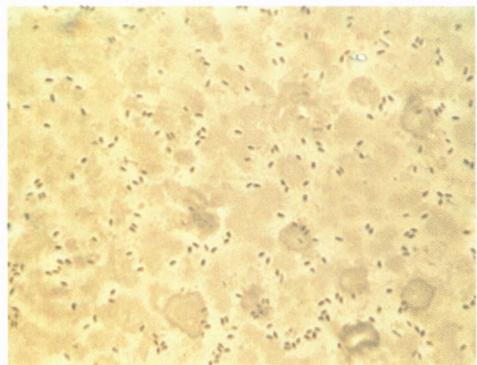
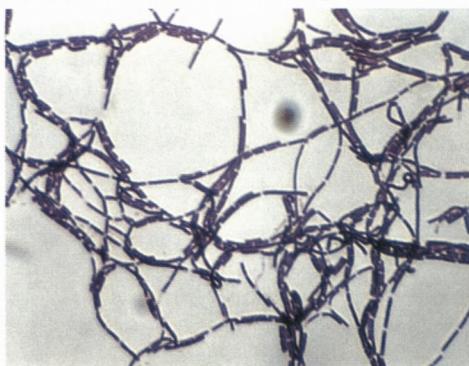


**Den døde yngel
rådner til en tråd-
trækende, slimet
masse.**

Ondartet bipest er en alvorlig yngelsygdom hos honningbierne. Den er således betegnet som den mest ødelæggende yngelsygdom¹³. Normalt vil bifamilier med kliniske symptomer på sygdommen dø, hvis der ikke foretages behandling⁴⁶. Sygdommen kan derfor være meget tabgivende for biavlere samt gartnere og landmænd, der dyrker afgrøder, som er afhængige af insektbestøvning. I det sidste årti er der registreret et stigende antal tilfælde af ondartet bipest i Europa ^{25,39,77,80}. Dette understreger vigtigheden af at forbedre metoder til forebyggelse og bekæmpelse.

Udbredelse

Sygdommen er udbredt i hele verden. Sygdommen er dog ikke registreret i bifamilier i Afrika syd for Sahara eller i Indien⁷¹. I 1980 blev bipest-bakterien fundet i argentinsk honning³⁷. I 1989 blev udbrud af sygdommen registreret for første gang i Sydamerika i argentinske bifamilier¹.



Til venstre ses bipest-bakteriens *P. I. larvae*'s vegetative celler. Stavene er her farvet blå. Til højre ses sporerne. Sporen er bakteriens hvilestadium.

Biologi

Karakteristik af bakterien

I 1906 var White af den opfattelse, at den sporedannende bakterie *Bacillus larvae* var til stede i alle yngelprøver med ondartet bipest¹²⁰. Et år senere kunne han fastslå, at årsagen til sygdommen var *B. larvae*. White var således som den første i stand til at isolere bakterien fra syg yngel, dyrke den i renkultur, inficere yngelen igen, fremkalde symptomer på ondartet bipest og påny isolere den sygdomsfremkaldende bakterie¹²¹.

Bipest-bakterien er temmelig kræsen, hvad angår næringssubstrat. Den er fakultativ anaerob, dvs. at den kan gro uden ilt (i det mindste ved dyrkning på kunstigt substrat). Den er endvidere gram positiv (en blå farvereaktion, som forekommer ved en bestemt faveprocedure) og katalase negativ (en reaktion, som forekommer, når bakteriekolonier udsættes for brintoverilte, hvilket man kan gøre i forbindelse med bestemmelse af bakterien). De aktive bakterieceller (vegetative stave) er bevægelige og optræder enkeltvis eller i kæder og er mellem 0,0025 og 0,005 mm lange³³. Bakteriens hvilestadium, sporerne, er ca. 0,0013 mm x 0,0006 mm. På kunstigt substrat (J-agar) er bakterie-kolonierne små, hvidlige, konkave og har en ru overflade. De er ca. 4-5 mm i diameter³⁷.

Klassifikation

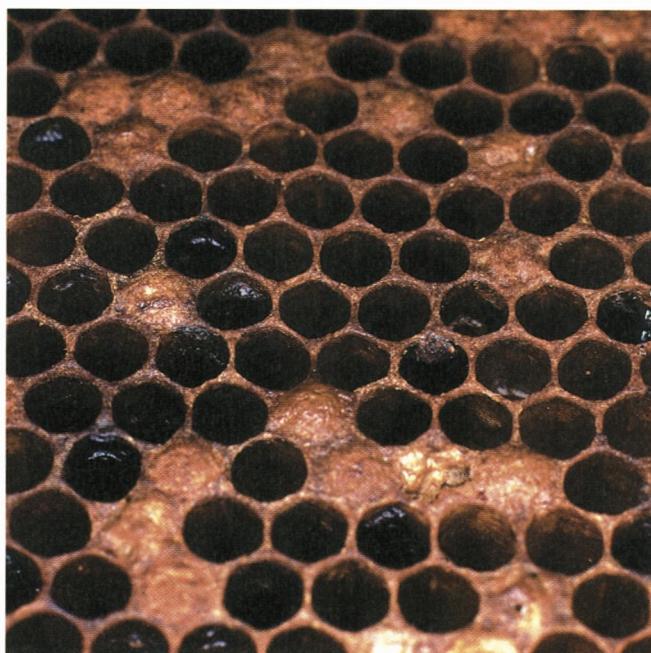
Siden 1984 har en sygdom, hvis symptomer ligner ondartet bipest, optrådt i Tjekkiet og Slovakiet. Det er rapporteret²⁶, at sygdommens årsag var en sporedannende *Bacillus*, der viste

fysiologiske og biokemiske egenskaber som *B. larvae*. Men bakterien danner orange-pigmenterede kolonier. En fedtsyreanalyse af bakterierne viste, at der ikke var forskel mellem de orange og hvide bakterier. Det blev ud fra dette konkluderet, at de to typer skulle betragtes som én art²³. Der blev imidlertid fundet et tæt slægtskab med bakterien *Bacillus pulvifaciens*, som er årsag til en bipest-lignende yngelsygdom, som på engelsk kaldes “powdery scale disease” (støvende-skorpe-sygdom). Der er kun registreret udbrud af “powdery scale disease” i USA^{28,64}. Men vi har dog fundet bakterien i honning fra Mexico indkøbt i Danmark³⁷.

Slægtskabet mellem *B. larvae* og *B. pulvifaciens* blev yderligere bekræftet ved molekylærbiologiske PCR undersøgelser (Polymerase Chain Reaction), og begge bakterier blev henført til slægten *Paenibacillus*³. I 1996 blev arterne *P. larvae* og *P. pulvifaciens* ved hjælp af DNA teknikker henført som underarter af arten *Paenibacillus larvae*. Navnene på de to underarter er herefter *Paenibacillus larvae larvae* (årsag til ondartet bipest) og *Paenibacillus larvae pulvifaciens* (årsag til “powdery scale disease”)⁵².

Overlevelse

P. l. larvae sporer kan overleve i biernes larvefoder, jord og skorper (indtørrede rester af yngel død af ondartet bipest) i mange år¹²³. Overlevelsесforsøg har vist, at sporerne fra skorper kan spire efter selv 35 år⁵¹. Det formodes imidlertid, at sporerne kan overleve meget længere.



Når den døde yngel tørrer ind, dannes skorper. På billedet ser man ovenfra ned i celler med skorper. Sporerne i skorperne kan overleve i årtier.

Sammenhæng mellem den temperatur og tid der er nødvendig for at ødelægge *P. l. larvae*

Medium	Stadium	°C	Minutter
Bouillon	Vegetative celler	60	15 ⁹⁷
Vand	Sporer	100	30 ¹²³
Voks	Sporer	121	30 ⁶⁷
Honning	Sporer	100	160 ¹⁴
	Sporer	110	41 ¹⁴
	Sporer	121	8,6 ¹⁴
	Sporer (220.000 pr. g honning)	100	20 ⁴⁴
	Sporer (7,5 mio. pr. g honning)	100	35 ⁴⁴

Bakterien er meget modstandsdygtig over for varme (jf. tabel). Det er sandsynligt, at forskellige *P. l. larvae* bakteriestammer har forskellig modstandskraft over for varme. I et forsøg, hvor voks fra bifamilier med kliniske symptomer på ondartet bipest blev smeltet med vanddamp på et vokssmelteri, blev der efter behandlingen fundet en let forurening i ét af seks partier⁴⁴. Det er endvidere vist, at flambering af opstablingskasser af træ med en gasbrænder ikke vil ødelægge alle sporerne⁴⁴.



Sporerne er meget modstandsdygtige over for kemiske og fysiske påvirkninger. Selv længere tids flambering med en gasbrænder vil ikke slå alle sporerne ihjel.

Larvers modtagelighed

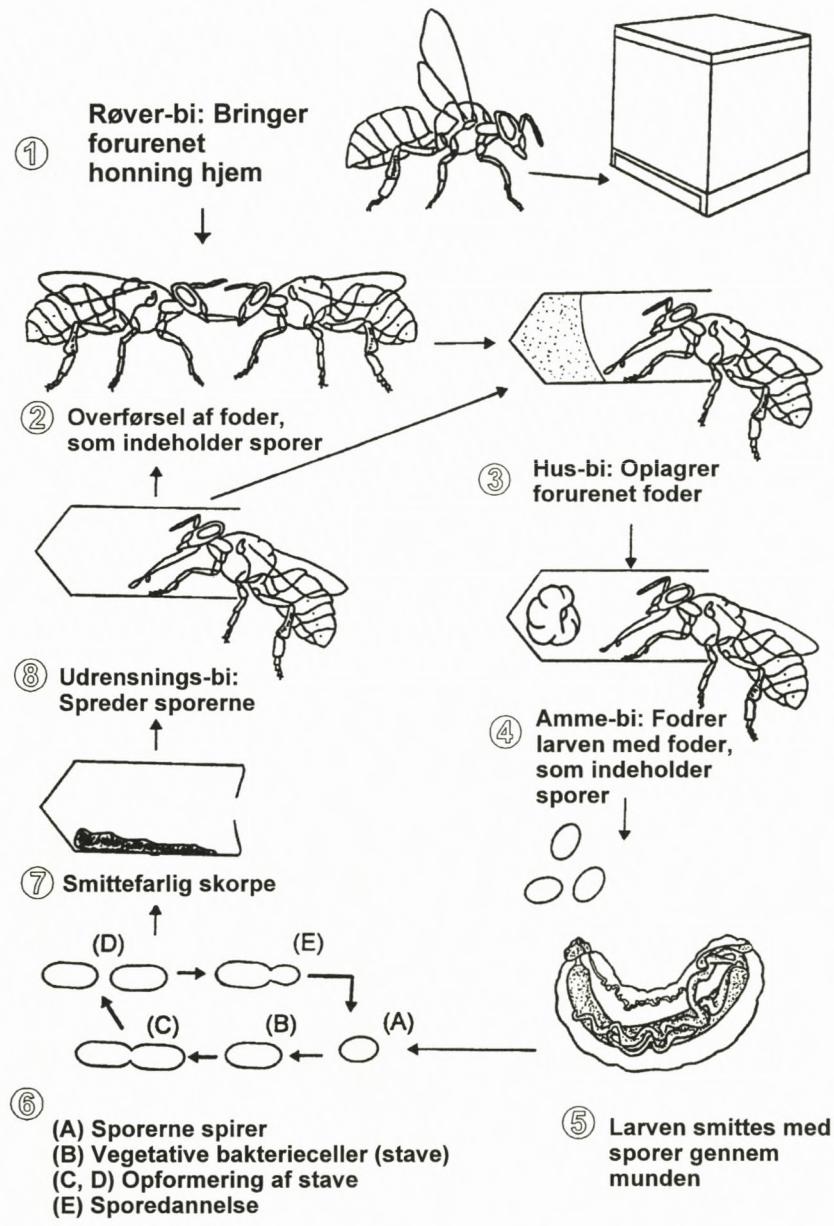
Både arbejder-, dronning- og dronelarver kan smittes med *P. l. larvae* sporer¹³⁰. Der er foretaget forsøg med honningbi-larvers modtagelig ved at tilsætte sporer til de enkelte larvers foder^{129,130}. Forsøgene viste, at larver mindre end 24 timer gamle er mest modtagelige. Larvernes modtagelighed er endvidere genetisk betinget^{7,54,69,103}. Det er vist⁵⁴, at 18-24 timer gamle larver fra en resistent bistamme havde en LD₅₀ (den sporedosis, hvor 50% af larverne slås ihjel) på 2.500 sporer, mens en lidt mindre resistent stamme havde en LD₅₀ på 1.300 sporer.

I modsætning til disse forsøg er nye danske undersøgelser foretaget med larver, som er opdrættet i laboratoriet⁹. Med denne metodik er det muligt at udelukke stadebiernes indflydelse og dermed få et mere præcist billede af forholdet mellem sporedosis og den enkelte larves modtagelighed (dosis-respons forholdet). Undersøgelsen viste, at 24-28 timer gamle larver er mest modtagelige for *P. l. larvae* infektion, og at der er en klar dosis-respons sammenhæng. Den anvendte bistamme var en almindelig dansk gul stamme (*Apis mellifera ligustica*), som havde en LD₅₀ på 8,49. Ældre larver bliver mere og mere resistent, og der er ikke nogen signifikant dosis-respons sammenhæng, når larverne er mere end 48 timer gamle.

En beregning på en ældre undersøgelse af følsomheden hos larven citeres ofte¹². LD₅₀ blev udregnet til 35 sporer. Men det er imidlertid ikke klart, hvordan dette resultat blev opnået⁹. Det er derfor svært at sammenligne resultatet med andre tilsvarende undersøgelser.



Der kan foretages smitteforsøg med bipest-bakterien i laboratoriet. Bi-larverne opdrættes i kunstige celler (fingerbøl) og smittes her.



P. I. larvae's livscyklus og overførsel i bifamilien. Omarbejdet fra Pohl⁸³.

Smitteforløb i larven

En honningbilarve smittes med foder, som er forurenset med bipestsporer. Sporerne spiser til aktive vegetative bakterieceller i larvens midttarm. Disse celler opformerer sig i tarmen og trænger gennem en meget tynd hinde afsondret af tarmcellerne (den peritrofe membran). Derefter trænger stavene igennem tarmväggen ved at blive optaget af tarmcellerne (fagocytose) og kommer over i den fyldte kropshule (haemocoellet)²¹. Bakterien spreder og formerer sig yderligere i kropshulen^{6,62}. Denne opformering af bakterier i hele blodsystemet indtræffer, når larven er ca. 234 timer gammel²¹, og medfører dens død. Samtidig danner bakterien sporer, som er dens overlevelsessstadium^{6,21,62}. I én enkel rådnende larve dannes ca. 2,5 mia. sporer¹¹³.

I slutningen af sygdomsforløbet udskiller *P. l. larvae* et protein-nedbrydende enzym. Dette enzym, som frigøres, når bakterien danner sporer, kan hæmme nogle af biens antistoffer (apidaeciner). Det er imidlertid stadig uklart, hvilken rolle enzymet spiller i sygdomsforløbet af ondartet bipest. Bakterien angriber således kun larver, som i modsætning til de voksne bier ikke kan danne egentlige antistoffer, men kun forløbere for disse (proapidaecin)¹¹⁸.

Voksne bier er resistente mod ondartet bipest og kan derfor ikke smittes, når de fodres med *P. l. larvae* sporer²⁰. Nogle af sporerne bliver i spiserøret i mere end to måneder hos bier, som er forurenset med bipestsporer f.eks. fra udrensningen af døde larver. Disse sporer kan smitte de unge bilarver, når de fodres af de voksne bier^{125,126}.



Undersøgelser af honning har vist, at mange bifamilier har honning forurenset med bipest-bakterien, uden at de har kliniske symptomer på ondartet bipest.

Udbrud i bifamilien

Mange undersøgelser har vist, at honning fra bifamilier uden kliniske symptomer på ondartet bipest kan være forurenset med *P. l. larvae*-sporer^{22,27,34,35,41,42,59,77,91,92,111}. I årene (1978-1981 og 1985-1990) havde 9,7% af undersøgte danske bifamilier honning forurenset med *P. l. larvae* sporer. Samtidig havde kun 3,7% af bifamilierne kliniske symptomer på ondartet bipest³⁸. Bifamilier kan have honning med et stort antal bipestsponer i adskillige år og stadig ikke få kliniske symptomer på ondartet bipest⁴¹. Endvidere har smitteforsøg med bifamilier vist, at der ikke er en simpel sammenhæng mellem antallet af sporer i honningen og de første synlige tegn på ondartet bipest i de forseglede yngelceller⁴⁶.

Bifamilier fodret med sukkervand tilsat *P. l. larvae*-sporer fik kliniske symptomer på ondartet bipest, når hver bifamilie fik 50 mio. sporer¹¹³. Andre forsøg, som anvendte samme fodringsteknik, viste, at hver bifamilie skulle have mindst 500 mio. *P. l. larvae*-sporer for at få udbrud af sygdommen⁶⁸. I danske forsøg er bifamilier fodret med honning tilsat *P. l. larvae* sporer. I disse forsøg kom der kliniske symptomer i nogle af bifamilierne, når hver bifamilie fik 2 mia. sporer⁴⁸. Når aflægger-bifamilier blev fodret med sukkervand tilsat forskellig sporedoser, kunne der fremprovokeres kliniske symptomer, når hver aflægger fik 5 mio. sporer³¹.

Der kan være mange forklaringer på, hvorfor der ikke er en simpel sammenhæng mellem antallet af sporer i honningen og de første kliniske symptomer på ondartet bipest i bifamilierne samt



Ondartet bipest kan overføres til bifamilier, hvis de fodres med honning forurenset med bipest-bakterien.



Der kan også ske smitteoverførsel ved fodring med forurenet pollen.

mellem det antal sporer, som bifamilier skal fodres med, og udbrud af ondartet bipest. Mulige forklaringer er forskellig resistens hos forskellige honningbistammer, bifamiliernes størrelse, forholdet mellem voksne bier og yngel samt forskelle i nektartræk og indsamling af pollen hos de forskellige bifamilier og imellem de forskellige år.

I forsøg med en bestemt dansk gul bistamme (*A. m. ligustica*) er det vist, at den sporedosis, som er nødvendig for at give kliniske symptomer på ondartet bipest i alle bifamilier, der blev fodret med kontamineret honning, er imellem 5,43 mia. og 36,3 mia. sporer pr. bifamilie. LD₅₀ for denne bistamme er 2,66 mia. sporer⁴⁸.

Spredning mellem bifamilier

Den naturlige spredning af *P. l. larvae* er lille. Dette skyldes hovedsagelig, at de fleste sporer bliver fjernet på grund af de voksne biers hygiejniske adfærd, og at kun de yngste larver er modtagelige. Ondartet bipest kan spredes ved fodring af bifamilier med honning kontamineret med *P. l. larvae* sporer, med bier som røver honning fra inficerede bifamilier⁴³ eller ved at fodre bifamilier med kontamineret pollen⁴⁵. Infektion kan også spredes med kontaminerede yngeltavler, med jomfrutavler der har været brugt som honningtavler i inficerede bifamilier samt ved at anvende kontaminerede bistader⁸ og andet kontamineret biavlssudstyr.

Kun få bier (ca. 6% af mærkede forsøgsbier) fejlflyver mellem bifamilierne i en bigård, og de fleste medbringer ikke sporer nok til at udløse infektion. Man kan således regne med, at fejlflyvning ikke er egentlig årsag til smittespredning af ondartet bipest³¹. Dronninger fra syge bifamilier kan i nogle tilfælde indeholde et lille antal *P. l. larvae* sporer. Arbejdere fra samme bifamilier kan derimod have et stort antal sporer i tarmen. Selv om dronninger er bærere af sporer, kan de ikke fremprovokere kliniske symptomer på ondartet bipest, når de indføres i sunde bifamilier¹²⁸.

Resistens mod ondartet bipest

Udbrud af ondartet bipest afhænger ikke kun af antallet af sporer i honningen, men også af bifamiliens resistens mod bipest-bakterien. Hos tolerante bifamilier vil antallet af sporer i honningen normalt ikke overstige 200.000-500.000 sporer pr. gram honning⁴⁶. Ingen bistamme er imidlertid immun over for ondartet bipest, men der findes forskellig grader af resistens, hvilket er beskrevet udførligt i adskillige oversigtsartikler^{98,99,100,101,103,109,110,115,117,118,131}.

Forskelle i resistensen mellem dronninger, arbejdere og droner er knyttet til føden. Dronninglarver, som bliver fodret med mindst pollen, er mest modtagelige, dronelarver, som fodres med mest pollen, er mindst modtagelige, mens arbejderlarver, som fodres med en moderat mængde pollen,

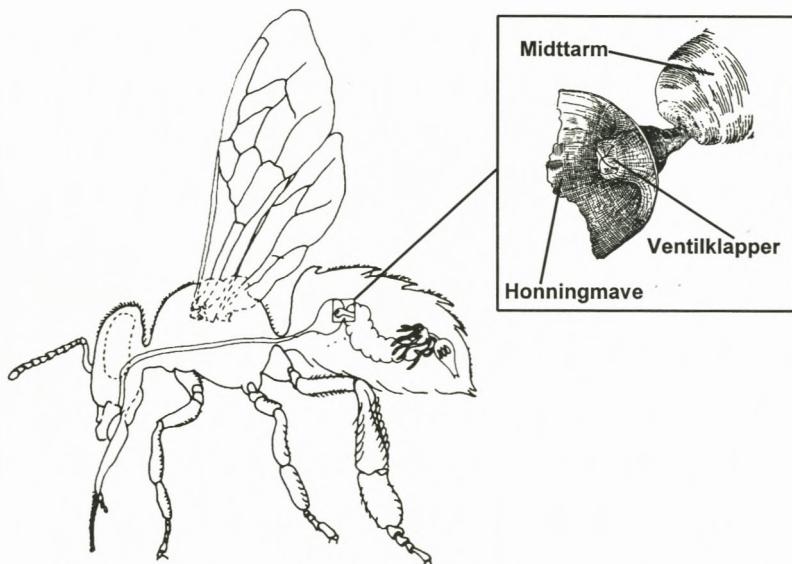
Ammebi, som fodrer en lille larve. Larvefoderet hæmmer spiringen af bipest-sporerne.



har en modtagelighed, som ligger mellem de to andre kasters⁸⁷. Pollen indeholder mikroorganismer, som hæmmer vækst af *P. l. larvae* (antagonister)⁸⁷. Disse antagonister, der er isoleret fra larvernes midttarm, fra de voksne biers tarm og fra pollen, kan hæmme *P. l. larvae*-sporernes spiring og koloniernes vækst under laboratorieforhold. Denne hæmning vil sandsynligvis også finde sted i larvens tarm, da fodring af 6-18 timer gamle larver med pollen reducerede dødeligheden signifikant hos disse eksperimentelt inficerede larver⁹⁰. På den anden side producerer *P. l. larvae* både under laboratorieforhold og i inficerede bilarver antibiotiske substanser, som hæmmer den naturlige bakterieflora i midttarmen⁸⁷.

Udover pollen er der også andre stoffer i larvefoderet, der spiller en rolle i resistensen mod ondartet bipest. I resistente honningbistammer hæmmer larvefoderet spiringen af *P. l. larvae* sporer mere effektivt end i foderet fra modtagelige stammer. Herudover vil larvefoderet fra resistente stammer også reducere antallet af bakteriens vegetative celler mere effektivt end foderet fra modtagelige stammer. Nogle af de komponenter, som hæmmer, er sandsynligvis fedtsyrer i gelée royale⁹⁸.

Honingmavens opbygning hos den voksne bi har også indflydelse på resistens mod sygdommen. Sporer fjernes fra føden i honningmaven ved hjælp af nogle ventilklapper. Denne funktion vil i nogen udstrækning forhindre, at sporer bliver overført til larverne med foderet¹¹⁵. Resistente bistammer filtrerer sporerne mere effektivt fra end modtagelige stammer^{84,115}.



Ventilklapperne i ventiltragten ved overgangen mellem honningmave og midttarm fjerner sporer fra føden i honningmaven. Omarbejdet fra Ritter⁹³ og Snodgrass¹⁰⁷.

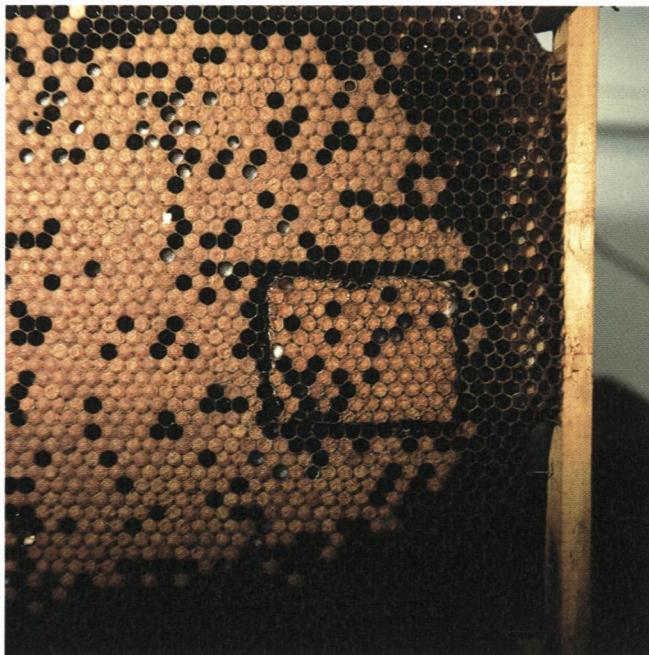
Når forskellige stammer af honningbilarver blev smittet, når de var mindre end 24 timer gamle, blev forskellige niveauer af medfødt resistens klarlagt¹⁰³. Denne medfødte resistens viser sig ved, at tarmmiljøet hos larver fra resistente stammer var mindre gunstigt for bakterien at spire og formere sig i¹⁰². Men mekanismerne bag denne tidlige resistens kendes ikke. I nogle honningbistammer blev hovedparten af de eksperimentelt inficerede larver helt resistente over for infektion med *P. l. larvae* i en alder af ca. 1½ døgn^{7,54}. Først i denne alder er den peritrofe membran tydelig i et lysmikroskop⁶. Man troede derfor, at hele resistensen skyldes denne membran. Elektronmikroskopi har imidlertid vist, at membranen allerede findes, når larven er 8 timer gammel. Membranens tilstedevarelse er altså ikke årsag til resistensen. Når larven udvikles, ændres membranen og bliver tykkere. Den er derfor i stand til at begrænse forekomsten af bakterien til tarmlysningen^{20,21}. Samtidig har tarmepithelet en betydning for resistensen over for *P. l. larvae*, da det fungerer som en fysisk og kemisk barriere²¹.

En anden meget vigtig resistensmekanisme er bifamiliens evne til at opdage og fjerne syg yngel. Forsøg med enkeltvis infektion af larver med *P. l. larvae* har vist, at resistente familier fjerner inficerede larver meget hurtigere end modtagelige bifamilier. I en resistent bifamilie blev der ikke registreret nogen sporedannelse, mens der blev dannet sporer i adskillige larver i den modtagelige familie¹³¹.

Normalt ser man først symptomer på ondartet bipest i de forseglede celler. Man har derfor traditionelt ment, at bier med hygiejnisk adfærd både skal fjerne celleforseglingen og den syge



Eksperimenter, hvor larverne er inficéret enkeltvis, har vist, at mange larver dør, før cellerne bliver forseglet.



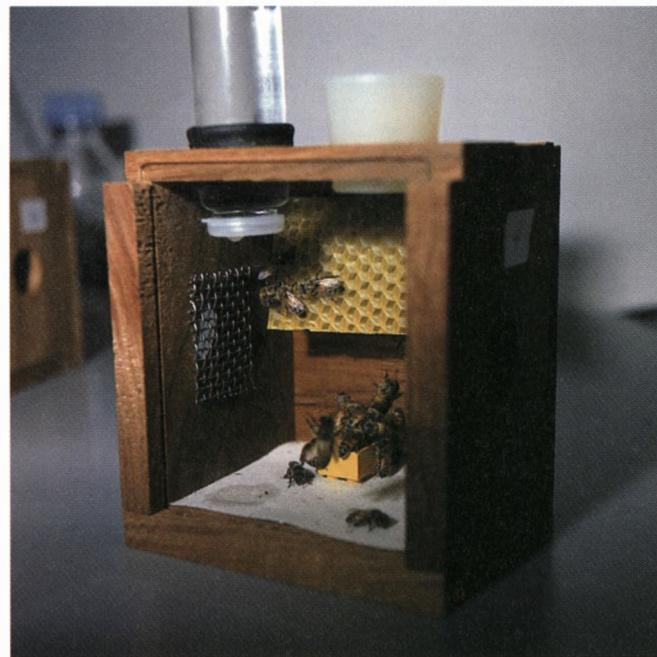
En vigtig resistensmekanisme mod sygdommen er biernes evne til at udrense syg yngel. Man kan teste bifamiliens resistens ved at lade bierne udrense frysdræbt yngel i små tavlestykker. Det lille tavlestykke ses til højre i billedet. I dette tilfælde har bierne kun udrenset ganske få døde larver og har altså en særdeles dårlig hygiejniske adfærd.

yngel. Denne adfærd kræver mindst to gener, som begge er vigende¹⁰¹. En ny dansk undersøgelse¹¹, hvor larverne er inficeret enkeltvis, viser, at mange larver dør før celleforseglings-tidspunktet. I bifamilier kan kliniske symptomer på ondartet bipest være synlige for det menneskelige øje, når larverne er fire dage gamle. Imidlertid udrensede bierne allerede på trejdedagen ca. 50% af et hold larver, som hver havde fået tilført 1.386 sporer. Evnen til tidlig udrensning må således være en meget vigtig egenskab at inddrage i avlen mod resistens mod sygdommen.

Der en god sammenhæng mellem biernes udrensning af syg yngel i forseglede celler og udrensning af frysdræbt forseglet yngel¹⁹. På nuværende tidspunkt er det ikke klart, om der også er en sammenhæng mellem udrensning af inficeret og syg yngel i åbne celler og frysdræbt yngel i åbne celler. I første omgang må det dog være et stort skridt i retning af væsentlig mere resistente bier, hvis dronningavlerne kun anvender avlsfamilier, som viser god hygiejniske adfærd i forhold til frysdræbt forseglet yngel.

Udrensnings-testen kan udføres ved at udskære et fuldt forseglet tavlestykke på 5 cm x 6 cm, som indeholder ca. 100 celler på hver side¹¹⁶. Tavlestykket fryses i et døgn ved -20 °C og anbringes derefter påny i bifamilien. Bifamilier, som fjerner den frysdræbte yngel inden for to døgn, har

Udrensningsadfærden kan også registreres i mikrobifamilier i laboratoriet. Samtidig kan man registrere larvefoderets hæmmende effekt på bipest-sporernes spiring.



en god hygiejniske adfærd. Testen kan også foretages med nåledræbt yngel⁷⁵. Ved denne metode stikkes en fin insektnål gennem celleforseglingen og ind i larven eller puppen, og biernes udrensning af den døde yngel registreres. Denne metode er mindre arbejdskrævende end testen med frysedræbt yngel. Til gengæld er testen med frysedræbt yngel mere pålidelig¹⁰⁸.

Vi har netop udviklet en hel ny metodik til undersøgelse af bifamiliens tolerance mod ondartet bipest^{9,11}. Ved at opdrætte og smitte bilarver i kunstige celler i laboratoriet kan larvernes følsomhed over for bipest-bakterien bestemmes. Det er endvidere vist, at der er god sammenhæng mellem stadebiernes udrensningsadfærd over for inficeret yngel i fuldgode bifamilier og i mikrobifamilier i laboratoriet. I mikrobifamilierne er det samtidig meget nemmere at registrere udrensning af inficeret yngel i åbne celler, og man kan også registrere den hæmmende effekt på sporernes spiring fra forskellige bistammers larvefoder. Mikrobifamilier kan således anvendes som en model for fuldgode bifamilier og kombineres med laboratorietesten af larveresistens, når resistens hos udvalgte bifamilier skal undersøges i forbindelse med avlsprogrammer.

Diagnose

Tilsyneladende kan mange biavlere i staten New York ikke diagnosticere ondartet bipest⁸⁶. Dette

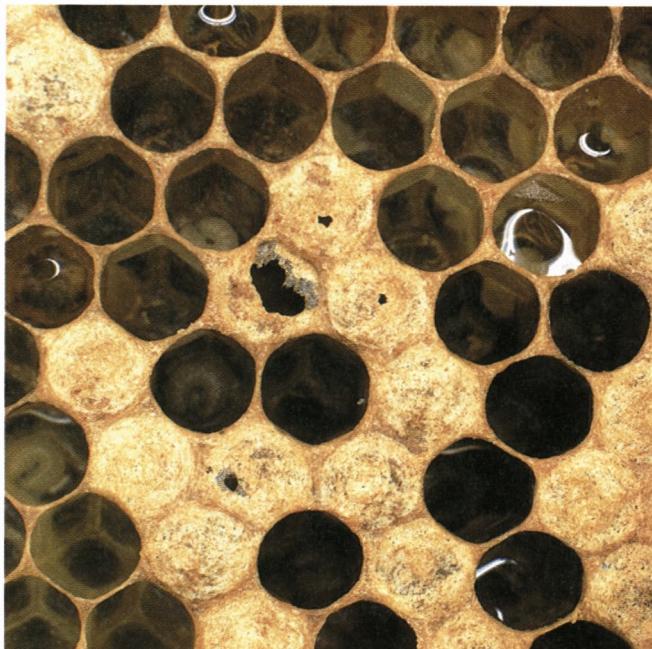
gælder sandsynligvis også for biavlere i mange andre områder af verden. En tidlig diagnose er imidlertid nødvendig for effektivt at forebygge og bekæmpe sygdommen. Mange lande har derfor offentlige undersøgelses- og bekæmpelsesprogrammer, som også omfatter diagnose.

Kliniske symptomer

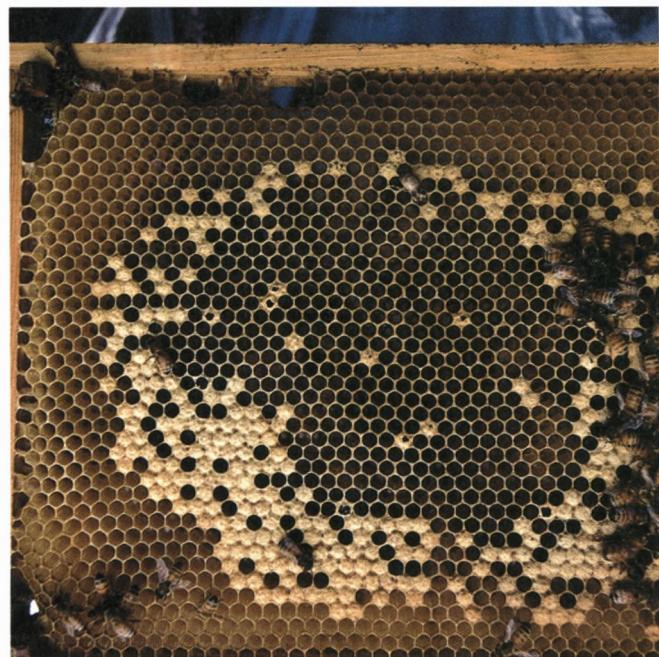
I bifamilier med kliniske symptomer på ondartet bipest ser man normalt først død yngel i det sene larvestadium og i puppestadiet, efter at cellerne er forseglet. Celleforseglingerne over død yngel kan være indsunkne og mørke. Celleforseglingerne er ofte gennembidte af stadebierne, som forsøger at fjerne den døde yngel. Yngellejet i en døende bifamilie får et saltbøsselignende udseende med død yngel i celler, hvor forseglingen er fjernet¹²³. Yngellejet er ofte hullet, fordi de voksne bier har fjernet den inficerede yngel¹⁰¹.

Larver og pupper, som er døde af ondartet bipest, rådner først til en brunlig tyktflydende, slimet masse. Med en lille pind kan den trækkes ud til en lang tynd tråd, som vil smække tilbage, hvis den trækkes meget langt ud. Den rådne yngel lugter som surdej og tørrer efterhånden ind til skorper. Skorperne hænger fast i cellevæggene, og bierne kan kun vanskeligt fjerne dem. Døde pupper ligger fladt på cellebunden, og resterne af tungten stikker op. I sjældne tilfælde vil resterne af et eller flere ben også stikke op¹²³.

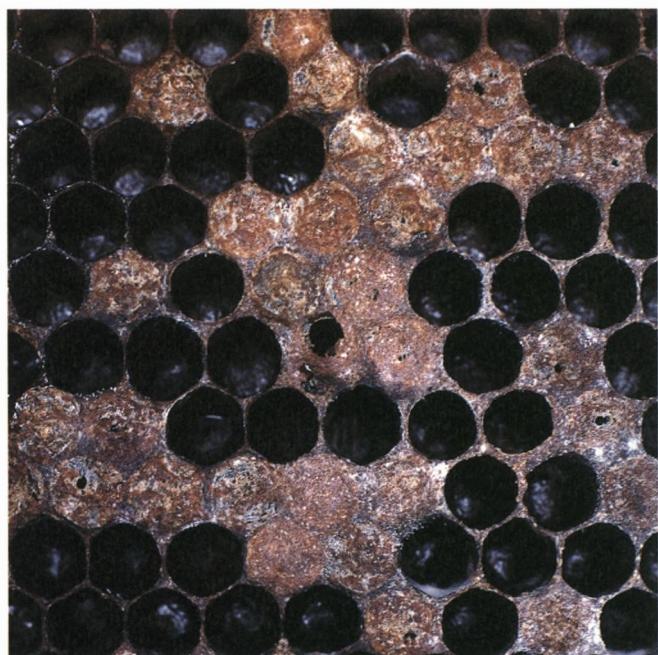
**Celleforseglingen over
yngel død af ondartet
bipest vil ofte være
gennembidt af stadebier-
ne.**

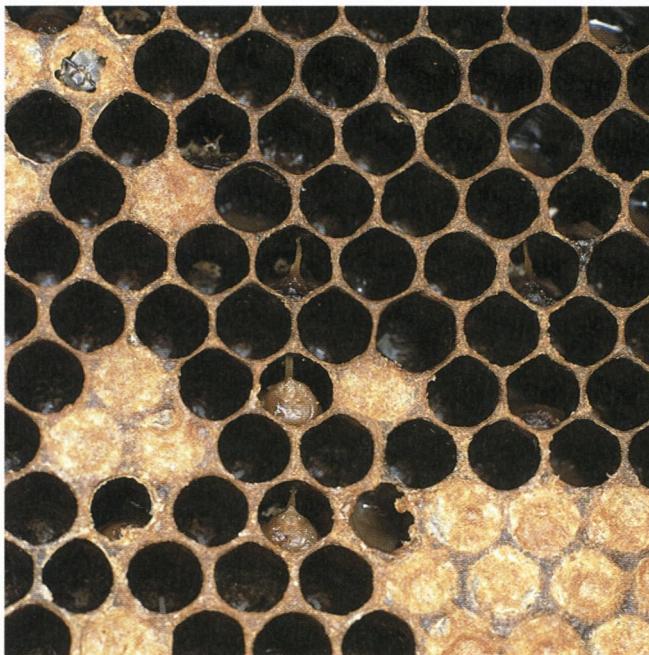


I midten af tavlen er der enkelte celler med gennembidte celleforseglinger og død yngel.



Angrebne tavler får mange tomme celler.





Bierne har fjernet celleforseglingen over døde pupper. Puppens tungestikker op igennem cellen.

Feltdiagnose

Kliniske symptomer på ondartet bipest kan diagnosticeres i felten af erfarne biavlere eller af specielt uddannede biavlere efter de symptomer, som er nævnt ovenfor. For at få en mere sikker diagnose er det nødvendigt at anvende forskellige laboratorieteknikker.

Rutinediagnose af yngelprøver i laboratoriet

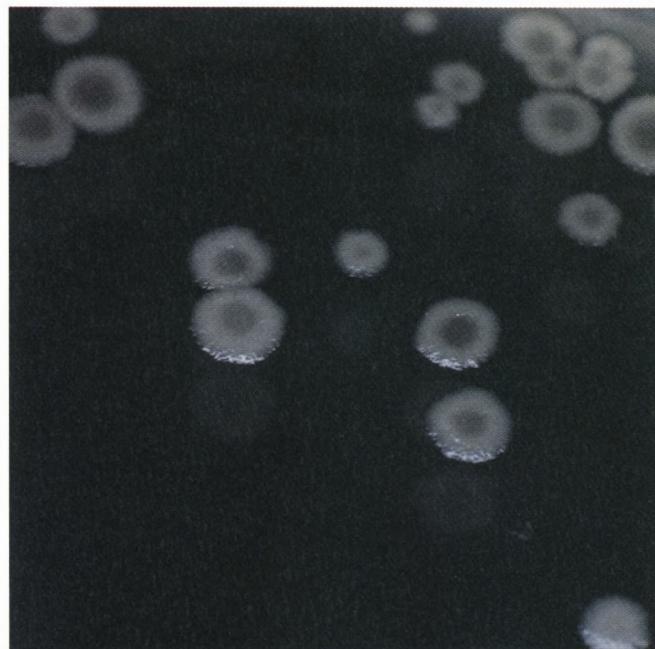
En rutineundersøgelse i laboratoriet sker normalt ved at undersøge prøver af yngeltavler. Prøverne bliver undersøgt for kliniske symptomer¹²³, inklusive lugt-symptomer. Der foretages endvidere en mikroskopisk undersøgelse f.eks. med fasekontrast-udrustning for sporer i udstrygningspræparater.

Der kan også dyrkes fra udstrygningspræparater af døde larver eller pupper på forskellige kunstige substrater f.eks. J-agar³⁷ eller MYPGP-agar²⁴. Bakteriekolonierne kan undersøges visuelt³⁷ og for katalase aktivitet³³. Herudover kan det anbefales at foretage mikroskopi af gramfarvede vegetative celler ved at anvende lysfeltudrustning samt at foretage mikroskopi af sporer ved hjælp af fasekontrast. Holst's mælkeprøve⁵⁵, som bygger på, at en suspension af *P. l. larvae* sporer ved ca. 35 °C koagulerer skummetmælk, bliver anbefalet i mange diagnosebeskrivelser. Ifølge vores og andres erfaringer¹⁰⁵ er denne diagnosemetode ikke altid pålidelig.

Bipest-sporer i honning kan påvises ved en direkte udstrygning af honning på et kunstigt næringssubstrat for bakterier.



Bipest-sporer fra honningen vil spire til små, hvide kolonier. Kolonierne er ru og konkave.





Der skal bruges ca. 50 g honning pr. bigård til honning-diagnosen for bipest-bakterien. Der kan udtages flere prøver i forbindelse med slyngningen. Alle prøver blandes, og en samleprøve indsendes til undersøgelse.

Undersøgelse af voksne bier

Der er udviklet en dyrkningsteknik på et kunstigt substrat (agar med fåreblod) til påvisning af *P. l. larvae* sporer på og i voksne bier⁵⁸. Ved hjælp af denne metode kan der også påvises sporer på og i bier fra inficerede bifamilier uden kliniske symptomer på ondartet bipest. Som det kan forventes, er det bedst at udtage prøver af voksne bier til denne diagnose fra yngeltavler³².

Undersøgelse af honning for *P. l. larvae*-sporer

P. l. larvae sporer kan påvises i honning ved sporeniveauer, som ikke giver udbrud af ondartet bipest i den pågældende bifamilie. Den første metode, som blev beskrevet, er både kvalitativ og kvantitativ^{113,114}. I metoden indgår en centrifugering og en mikroskopisk undersøgelse. Det er imidlertid svært at adskille sporerne fra de andre bestanddele i centrifugatet. Herudover er den kvantitative del af metoden meget tidskrævende.

Vi har senere udviklet en ny enkel metode til at påvise *P. l. larvae* sporer i honning^{36,37}. Metoden bygger på en direkte podning af honning på det kunstige substrat J-agar. Metodens følsomhed er efterfølgende forbedret ved i stedet at anvende substratet MYPGP-agar⁹⁶, ved at anvende MYPGP-agar i en inkubationsatmosfære med 5% CO₂⁷⁶, eller ved at anvende modificeret

TMYGP-agar eller J-agar tilsat 0,1% natriumpyruvat¹¹². Der er endvidere foretaget en sammenlignende undersøgelse af forskellige substrater til dyrkning af *P. l. larvae* sporer fra honning⁶⁰. Undersøgelsen viste, at J-agar er bedre end agar med føreblod og "Brain Heart Infusion Agar". En inkubationsatmosfære med 5% CO₂ forbedrede også her følsomheden af metoden.

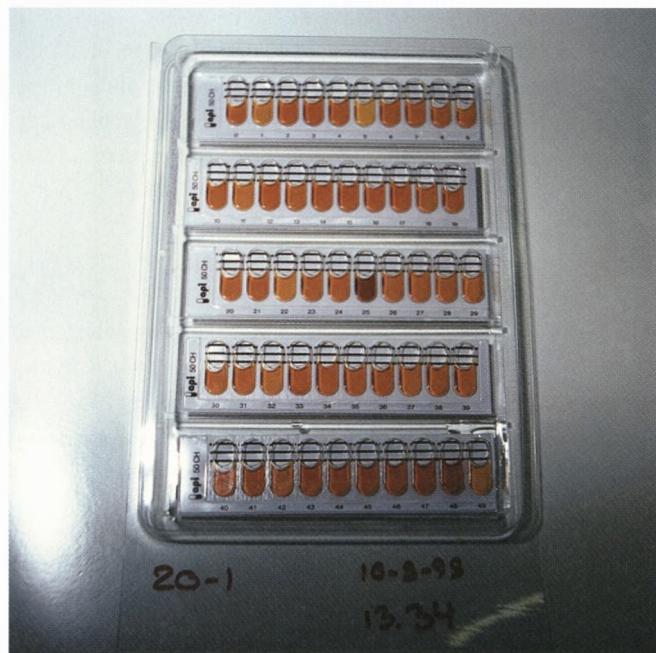
Både samleprøver af honning fra alle bifamilier i en bigård og honningprøver fra enkeltfamilier kan bruges i en rutine undersøgelse. For at mindske omkostningerne til analysen bliver der normalt undersøgt én samleprøve fra én slyngning.

Som nævnt ovenfor kan man finde sporer både på voksne bier og i honning fra bifamilier uden kliniske symptomer. Det er ikke undersøgt, hvilken af disse metoder, der er den mest følsomme. En fordel ved honningundersøgelsen er, at biavleren let kan sende prøven med posten til laboratoriet. På laboratoriet kan prøven opbevares ved stuetemperatur og undersøges, når det passer ind i de øvrige arbejdsopgaver.

Undersøgelse af bilarver

Der er udviklet flere metoder, som bygger på antigen-antistof, til undersøgelse af larver for ondartet bipest (immun-fluorescens^{79,82,119}, immundiffusion⁸² og ELISA⁷⁸). Disse metoder bruges dog ikke i den almindelige rutinediagnose.

Forskellige *P. l. larvae* stammer kan bestemmes ved at lade dem gøre forskellige sukkerarter. På billedet ses et system, som kaldes API50 Chβ. Her sammenlignes 49 forskellige sukkerarter. Et farveskift fra rødt til orange viser, at bakterien kan udnytte det pågældende sukker.



Bestemmelse af bakteriestammer

Kromatografi af celle-fedtsyrer er en vidt udbredt og god metode til at bestemme bakterier. *P. l. larvae* celle-fedtsyrerne er således blevet bestemt med gaskromatografi⁶⁵. Denne metode er også brugt til at karakterisere forskellige stammer af *P. l. larvae* og *P. l. pulvifasciens*²⁶. DNA bestemmelse har også været brugt til at karakterisere geografisk forskellige stammer af *P. l. larvae* på øer i det sydlige Stillehav²³. API50 CHB og BIOLOG har også vist sig at være nyttige til bestemmelse af *P. l. larvae* stammer^{17,88}. Disse systemer bygger på bakteriernes evne til at gøre forskellige sukkerarter. Det kan forventes, at forskellige *P. l. larvae* stammer også vil have forskellig patogenitet over for bilarverne. Undersøgelser på dette område er derfor sat i gang⁸⁸.

Forebyggelse og bekæmpelse af ondartet bipest

Forurening af biavlspprodukter og -materiel

Som beskrevet ovenfor kan honning fra bifamilier inficeret med bipest-bakterien indeholde sporer, selv om bifamilierne ikke har kliniske symptomer på ondartet bipest.

Nogle biavlere indsamlar pollen i pollenfælder, når pollenforsyningen er rigelig. Senere, når pollenforsyningen er dårlig, fodrer de bifamilierne med det indsamlede pollen. Det er også muligt



**Pollenfælde på bifamilie.
Man skal kun indsamle
pollen til bifoder, hvis
bifamilien er undersøgt
og fundet fri for infektion
af bipest-bakterien.**

at købe pollen og blandinger med pollentilskud til fodringsformål. Det er almindelig accepteret, at *P. l. larvae* sporer kan overføres ved pollenfodring. Det anbefales derfor, at man kun indsamler pollen fra sunde bifamilier⁷³.

I nogle undersøgelser^{30,53} er *P. l. larvae* sporer fundet i pollen indsamlet i pollensæder fra bifamilier med kliniske symptomer på ondartet bipest, men ikke i bifamilier uden³⁰. I en dansk undersøgelse⁴⁵ er der fundet *P. l. larvae* sporer i alle pollenprøver fra pollensæder på bifamilier med kliniske symptomer, og i nogle prøver fra *P. l. larvae* inficerede bifamilier uden kliniske symptomer. Der er altså risiko for at få overført *P. l. larvae* sporer til sunde bifamilier ved pollenfodring, selv om pollenet er indsamlet fra bifamilier uden kliniske symptomer på ondartet bipest.

Biavlsmateriel fra inficerede og syge bifamilier kan være forurenset med *P. l. larvae* sporer. Der er således fundet 360.000 *P. l. larvae* sporer i afskrab fra 100 cm² stadeside i bifamilier kraftigt angrebet af ondartet bipest³⁰. Danske undersøgelser har vist, at forurenede bistader, som genanvendes uden at være rengjorte, kan oversøre smitstoffet til andre bifamilier⁸. I voksforselinger er der fundet 9 mio. sporer pr. 5 g³⁰.

I Rusland er der fundet forskellige bakterier udeover *P. l. larvae* i yngeltavler fra bifamilier med kliniske symptomer på ondartet bipest¹⁰⁶. Antallet af bakterier er færre i tavler, som er brugt i ét til tre år, end i tavler, der er brugt i mere end tre år.



Udbrud af ondartet bipest kan forebygges ved kun at udvide bifamilierne med kunsttavler.

Forebyggelse

Det anbefales generelt at udskifte tavlerne jævnligt for at forebygge ondartet bipest, og at yngeltavler ikke bruges i mere end tre år¹⁰⁶. I nogle lande f. eks. de skandinaviske er det almindelig praksis ikke at bruge yngeltavler i mere end ét år, hvilket er en god forebyggende foranstaltning.

Det anbefales også generelt, at placere bifamilier i områder med et godt nektartræk og en god pollenforsyning i hele biavlssæsonen, at skifte til dronninger fra resistente honningbistammer, at rengøre biavlsmateriellet samt at fodre bifamilier i perioder, hvor der er et dårligt nektartræk.

Da bipestsporer af og til findes i honning fra bifamilier uden kliniske symptomer, tilrådes det kun at fodre med honning, hvis honningen før fodringen er undersøgt og fundet fri for sporer. Det er endvidere tilrådeligt kun at indsamle pollen til fodringsformål fra bifamilier, der er undersøgt og fundet fri for infektion.

I de fleste tilfælde kan *P. l. larvae* sporer findes i honning mindst året før, man ser kliniske symptomer på ondartet bipest i bifamilierne⁴¹. Undersøgelse af honning kan derfor være et væsentligt element i forebyggelse af sygdommen. Honningundersøgelser indgår på nuværende tidspunkt obligatorisk i nationale bekæmpelsesprogrammer for ondartet bipest i Danmark⁴¹, Australien⁷⁰, Finland⁶³ og Tyskland⁹⁴.



**Bier, der indsamler pol-
len i krokus. Bifamilier
bør placeres i områder
med god pollenforsyning.**



Dronning omgivet af arbejderbier. Der bør kun anvendes dronninger fra bipest-resistente honningbistammer.

Aflivning af bifamilier

Syge bifamilier kan slås ihjel og brændes sammen med biavlsmateriellet. Dette er naturligvis en effektiv måde at ødelægge sporerne på, og metoden bruges i mange lande. Men der vil sandsynligvis samtidig i bigården være bifamilier, der er inficeret, uden at de har de kliniske symptomer. Og sporerne i disse bifamilier bliver ikke fjernet. Aflivning og afbrænding er uacceptabelt for mange biavlere i bl.a. USA, fordi metoden giver store økonomiske tab⁸⁵. En konsekvent afbrænding kan således kun anbefales i områder, hvor forekomsten af ondartet bipest er lav.

Omsætning

Omsætning af bifamilier er en gammel metode til bekæmpelse af ondartet bipest, som stadig anvendes. Metoden blev oprindelig foreslået af Schirach i 1769¹²⁰. Senere blev den genopdaget af den amerikanske bisygdomsinspektør McEvoy⁶¹. Metoden indebærer, at de voksne bier overføres til rengjorte stader uden udbyggede tavler, og at yngeltavler destrueres eller omsmeltes sammen med andre udbyggede tavler. Den kontaminerede honning, som bierne har i honningmaven, bliver brugt, mens de bygger nye tavler ud. Herefter er bierne normalt ikke en infektionskilde af betydning.

De voksne bier kan også rystes over i en kasse lukket med net og blive der i adskillige timer ved udetemperatur⁷⁰ eller i nogle få dage i en kold kælder. På denne måde sikrer man sig, at bierne bruger den kontaminererede honning, som de har fyldt sig med. Efter opholdet i kassen overføres bierne til stader med kunsttavler.

I Danmark anvendes en anden variant af denne dobbelte omsætning. Her rystes de voksne bier over på voksstrimler i rengjorte kasser, hvor de opholder sig i tre til fire dage. Herefter rystes de over på kunsttavler i andre rengjorte stader. Hvis der er ringe nektar-indbæring, kan bierne fodres lige efter, at de er rystet over på kunsttavlerne^{40,41}.

I nogle tilfælde er der fundet *P. I. larvae* sporer i honning, som er slynget 2 måneder til ét år efter, at bifamilierne er dobbelt omsat⁴¹. Behandlingen udrydder altså ikke *P. I. larvae* sporerne, men antallet er mindsket så meget, at infektionen er under kontrol. Men det er vigtigt at kombinere omsætningen med rengøring af biavlsmateriellet og omsmeltnings tavlér fra syge bifamilier og udbyggede tavler fra lager. Fordele ved omsætningen er, at bifamilierne reddes, og at der ikke er rester af antibiotika i honning og voks efter behandlingen. En ulempe er, at metoden er arbejdskrævende.

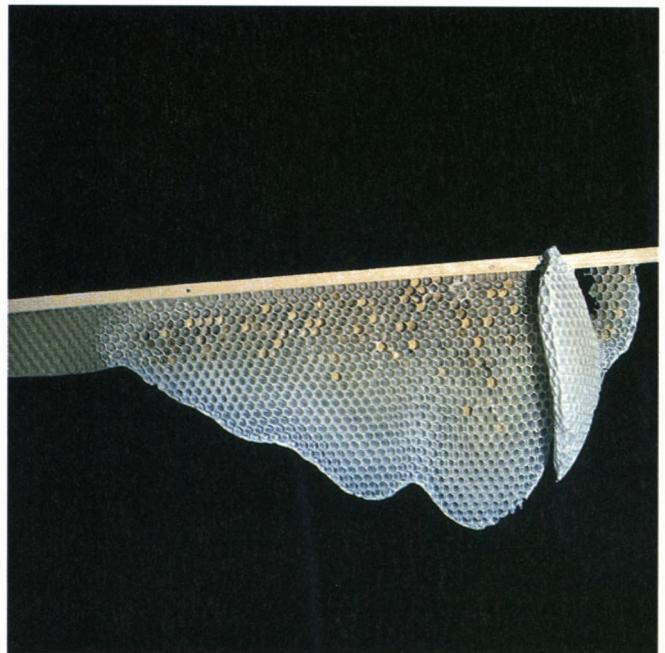


Ved den dobbelte omsætning anbringes ledere (trælister med voksstrimler) i en rengjort kasse. Kassen lukkes i bunden med et drønninggitter for at forhindre, at bierne skal sværme under behandlingen.

Bierne fra den syge bifamilie rystes over på lederne.



Udbygget leder. Bierne sidder på lederne i tre-fire dage. Når de bygger lederne ud, forbrænder de den smittefarlige honning, som de har i hønningmaven.



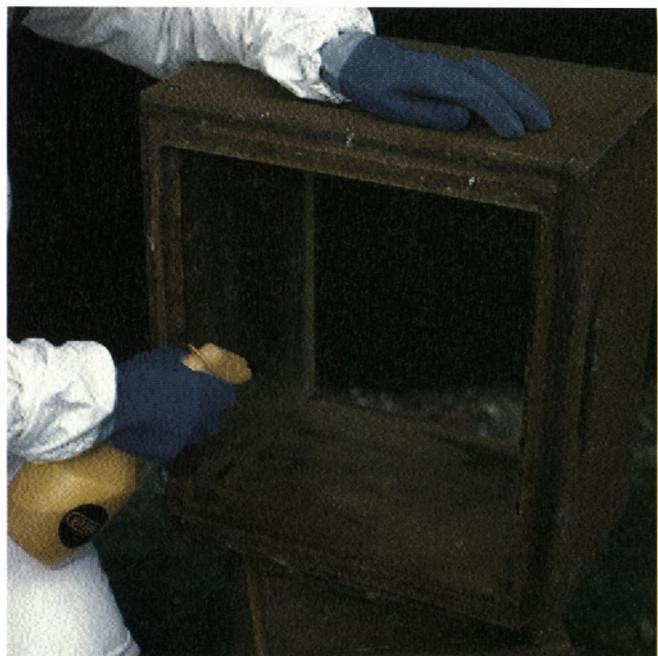


Bierne rystes fra de udbyggede ledere over på kunsttavler.



Biavlsmateriellet - her en dækplade - skrubes rent.

Bistader og andet forurenet materiel rengøres ved hjælp af enten flambering, skrubning med grydesvamp og sæbevand, højtryksspulning eller Virkon®S. På billede rengøres en kasse fra et opstablingsstade med Virkon®S.



Alle tavler fra syge bifamilier samt lagertavler bliver omsmeltet med vanddamp.

Bekæmpelse med lægemidler

Det er i amerikanske undersøgelser vist, at både omsætning med efterfølgende fodring med oxytetracyklin-hydroklorid (OTC), som er et antibiotikum, og omsætning uden brug af OTC, kan bekæmpe ondartet bipest⁶⁶. En konsekvens heraf er, at det ikke er nødvendigt at bruge OTC.

Sulfatiazol (som også er et antibiotikum) og mere almindeligt OTC anvendes alligevel i mange lande til bekæmpelse af ondartet bipest. En forebyggende anvendelse af disse stoffer i sunde bifamilier kan hjælpe bifamilierne til at komme af med infektionen, før *P. l. larvae* danner sporer⁸⁵. Men samtidig vil brugen forhindre en avl mod resistente bistammer. Syge bifamilier kan fodres med lægemidler for at undertrykke infektionen, så bifamilierne fortsat kan producere honning. Sådanne bifamilier vil dog hurtigt få symptomer på ondartet bipest, når brugen af lægemidlet ophører. Årsagen er, at lægemidlet ikke dræber sporerne⁶⁶.

Rester af OTC er fundet i honning fra yngellejet hos bifamilier, der er fodret med foderkager, som indeholder antibiotika, der langsomt friges¹²⁷. *P. l. larvae* stammer kan udvikle resistens mod sulfatiazol og OTC ved fortsat brug af disse lægemidler⁷⁴. Fornylig er der rapporteret om stigende problemer med resistens mod OTC^{2,109}. OTC anvendes også til behandling af bakterielle infektioner hos mennesker, hvorfor brug af midlet til bekæmpelse ikke kan anbefales. Der er bl.a. derfor ikke registreret antibiotika i Skandinavien og Tyskland til bekæmpelse af ondartet bipest.

Rengøring

Det er almindelig praksis i mange lande at sterilisere forurenede bistader og andet biavlssudstyr af træ ved at flambere med en gasbrænder. Før flamberingen skal materiellet skrabes rent for voks og propolis. Denne metode ødelægger dog ikke alle sporerne⁴⁴. Højtryksspulning med vand opvarmet til 90°C efterlader også sporer⁵⁶.

Vi har foretaget en sammenligning af effektiviteten af forskellige rengøringsmetoder anvendt på opstablingsstader af træ fra bifamilier med kliniske symptomer på ondartet bipest⁴⁷. Efter afskrabning med en stadekniv blev følgende rengøringsmetoder anvendt: 1. Flambering med gasbrænder, 2. Skrubning med grydesvamp og varmt sæbevand, 3. Højtryksspulning med koldt vand, 4. Behandling med en 1% opløsning af Virkon®S (som er et biologisk nedbrydeligt desinfektionsmiddel) eller 5. Behandling med damp, derefter neddyppning i en kogende ludopløsning og til sidst højtryksspulning med koldt vand. Ingen af disse metoder fjernede sporerne helt. Metoderne 1-4 havde en effektivitet på omkring 80% og metode 5 en effektivitet på 99.9%. I en efterfølgende feltundersøgelse blev ikke inficerede bifamilier overført til kasserne, der var rengjort ved hjælp af de første fire metoder. Undersøgelsen viste, at der fra disse kasser ikke blev overført smitstof til bifamilierne. Dette resultat stemmer overens med resultaterne fra danske og tyske bekæmpelsesprogrammer, hvor antallet af sporer efter flambering af materiellet er reduceret

til et niveau, hvor de normalt ikke giver kliniske symptomer^{49,93}. Det kan derfor konkluderes, at rengøring med metoder, der har en effektivitet på 80%, kan anbefales til praktisk brug.

Dypning af kontaminerede stader i varm paraffin er anvendt med godt resultat i mange år i et bekæmpelsesprogram i New Zealand⁷⁰. Behandling med ætylen oxid (EtO) dræber *P. l. larvae* sporer^{16,72} og anvendes til at sterilisere kontamineret materiel. (EtO) er imidlertid meget giftigt for mennesker⁷⁴, og resterne er mistænkt for at være kræftfremkaldende⁷⁰. Gamma bestråling bruges også til at sterilisere materiel⁵⁷. Kobolt 60, som er bestrålingskilden, vil desinficere effektivt for *P. l. larvae*¹⁵. Metoden er brugt med godt resultat i Australien, som er det eneste land, hvor gamma bestråling bruges kommersielt⁵⁷.

Bekæmpelsen i Danmark

Organisation

I 1909 blev der for første gang bevilget penge til bekæmpelse af bipest i Danmark⁵⁰. I begyndelsen blev arbejdet foretaget amtsvis på initiativ af de lokale biavlerforeninger under ledelse af Danmarks Biavlerforening. I 1949 overtog det offentlige bekæmpelsen af ondartet bipest. Det overordnede ansvar for bekæmpelsen er hos Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri. Plantedirektoratet og Danmarks JordbrugsForskning (DJF) har den daglige administration af lovgivningen, mens den daglige organisation af bisygdomsarbejdet udføres af DJF. Der er endvidere nedsat et udvalg, Statens Bisygdomsnævn, som er et rådgivende organ for Plantedirektoratet.

Bisygdomsarbejdet udføres lokalt i 48 lokalområder. I hvert område har DJF ansat en bisygdomsinspektør, der har det daglige ansvar for bekæmpelsen. I hvert område er der normalt også ansat et par tilsynsmænd, som kan hjælpe bisygdomsinspektøren med undersøgelses- og bekæmpelsesarbejdet. Der er endvidere registreret knap 1.000 kyndige biavlere, som kan foretage ettersyn i forbindelse med flytning og ejerskifte af bifamilier.

Undersøgelser af bifamilier

Alle bifamilier skal undersøges i forbindelse med flytning, vandring og ejerskifte⁴⁰. Undersøgelserne foretages af kyndige biavlere, som kan undersøge både egne og andres bifamilier. Hvis der ikke findes kliniske symptomer på bl.a. ondartet bipest udsteder den kyndige biavler en attest, og bierne kan flyttes.

I forbindelse med fund af ondartet bipest i en bigård, skal alle biavlernes andre bigårde også



Alle bifamilier skal undersøges af en kyndig biavlere i forbindelse med ejerskifte eller flytning.

undersøges, ligesom alle bigårde inden for 2 km fra bigården med ondartet bipest. Efter bekæmpelse af ondartet bipest i en bigård, bliver bifamilier undersøgt igen efter otte uger og året efter otte ugers-synet. Det er den lokale bisygdomsinspektør, der organiserer disse undersøgelser. Bisygdomsinspektøren kan endvidere undersøge andre bigårde, hvis der er mistanke om sygdom.

Undersøgelse af prøver

Hvis der ved undersøgelse af bifamilier er mistanke om ondartet bipest, skal der indsendes tavleprøver til DJF⁴⁰. Når DJF's diagnose bekræfter, at der er kliniske symptomer på ondartet bipest, iværksætter bisygdomsinspektøren bekæmpelse.

Honningdiagnose indgår som et fast forebyggende element. Alle biavlere, der har fået konstateret ondartet bipest i deres bifamilier, får således tilbuddt undersøgelse af honning for bipest-bakterien. Tilbuddet gælder alle biavlernes bigårde. Biavlere i 2 km-zonerne om bigårde med ondartet bipest får også tilbuddt en honningundersøgelse. Når der findes bipestsporer i honningen, foretager bisygdomsinspektøren året efter en traditionel undersøgelse af bifamilierne. Bisygdomsinspektøren iværksætter herefter kun bekæmpelse, hvis der findes kliniske symptomer på sygdommen. I alle tilfælde får biavleren vejledning om, hvordan man med biavlstekniske metoder kan modvirke udbrud af ondartet bipest.

Bekæmpelse

Der foretages dobbelt omsætning af bifamilier med kliniske symptomer på ondartet bipest (se side 30-34). Hvis de syge bifamilier er for svage til at klare omsætningen, bliver de slået ihjel med benzin⁴⁰. Alle tavler fra omsatte bifamilier med kliniske symptomer på sygdommen samt alle udbyggede tavler på lager bliver omsmeltet med vanddamp. Tavler fra aflivede bifamilier bliver brændt, da vokset er forurennet med benzin. Bistader og andet biavlsmateriel bliver rengjort ved hjælp af enten flambering, skrubning med grydesvamp og sæbevand, højtryksspuling eller Virkon®S.

For at forebygge smittespredning er de behandlede bigårde i karantæne, indtil behandlingen i bigården er afsluttet. Det betyder i praksis, at bigården er i karantæne i ca. otte dage. Plantedirektoratet udbetaler erstatning i forbindelse med bekæmpelsen. Formålet med erstatningen er at få så mange biavlere som muligt til at anmeldte ondartet bipest. Herved sikres en effektiv bekæmpelse, og smittespredningen til andre bigårde kan mindskes.

Når der ved undersøgelse af bifamilier er mistanke om bl.a. ondartet bipest, skal der indsendes en tavleprøve til DJF, Projektgruppe Biavl, som foretager en nærmere diagnose.



Fremitid

Der kan være mange grunde til den stigende forekomst af ondartet bipest i de senere år. I det tidligere Tjekkoslovakiet²⁵ og i Østrig³⁴ formoder man, at det hænger sammen med de stigende angreb af Varroa-miden. Fra tysk side er det anført, at der tilsyneladende ikke er en direkte sammenhæng mellem udbrud af ondartet bipest og forekomst af Varroa-miden^{81,83}.

Resultater fra danske forsøg tyder ikke på, at Varroa-miden virker som stressfaktor i forbindelse med udbrud af ondartet bipest hos larver opdrættet i laboratoriet¹⁰. Imidlertid er larver fra bifamilier angrebet af Varroa mindre, og deres vægt er meget mindre end larvernes vægt i bifamilier, der ikke er angrebet¹⁰⁴. Det må derfor forventes, at de mindre larver fra Varroa-angrebne familier kan inficeres med et væsentligt mindre antal sporer end larverne fra ikke angrebne bifamilier.

Brug af honningbistammer med lille resistens mod sygdommen³⁹ eller forskellig virulens hos forskellige *P. l. larvae* stammer⁸⁸ kan være andre årsager til stigningen i forekomsten af ondartet bipest. Endvidere er der rapporteret om stigende problemer med *P. l. larvae*'s resistens mod OTC^{2,109}.

Det kan derfor anbefales, at man anvender resistente honningbistammer, generelt har en god biavlshygiejne, ser efter symptomer på sygdom og anvender bekämpelsesmetoder uden antibiotika. Herudover er det nødvendigt at intensivere forskningen i de ovennævnte forhold, som har indflydelse på udbrud af ondartet bipest, og i nye bekämpelsesmetoder.

Litteratur

1. ALIPPI, A M (1991) A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research* 30: 75-80.
2. ALIPPI, A (1994) Sensibilidad 'in vitro' de *Bacillus larvae* frente a diferentes agentes antimicrobianos. *Vida Apicola* 66: 20-24.
3. ASH, C; PRIEST, F G; COLLINS, M D (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Willbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek* 64: 253-260.
4. BAILEY, L (1957) The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* (*Bacillus pluton* White) and further observations on *Bacterium euridice* White. *Journal of General Microbiology* 17: 39-48.
5. BAILEY L; COLLINS, M D (1982) Reclassification of *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *Journal of Applied Bacteriology* 53: 215-217.
6. BAMRICK, J F (1964) Resistance to American foulbrood in honey bees. V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. *Journal of Insect Pathology* 6: 284-304.
7. BAMRICK, J F; ROTHENBUHLER, W C (1961) Resistance to American foulbrood in honey bees. IV. The relationship between larval age at inoculation and mortality in a resistant and in a susceptible line. *Journal of Insect Pathology* 3: 381-390.
8. BRØDSGAARD, C J ; HANSEN, H (1999) Decontamination of beehives containing spores of the foulbrood bacterium *Paenibacillus larvae larvae*. *Apacta* XXXIV: 26-32.
9. BRØDSGAARD, C J; RITTER, W; HANSEN, H (1998) Response of *in vitro* reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. *Apidologie* 29:1-10.
10. BRØDSGAARD, C J; RITTER, W; HANSEN, H (accepted) Interactions among varroa mites, Acute Paralysis Virus, and *Paenibacillus larvae larva* and their influence on mortality on larval honeybees *in vitro*. *Apidologie*
11. BRØDSGAARD,C J; HANSEN, H; RITTER, W (in press) Progress of *Paenibacillus larvae larvae* infection in individually inoculated honey bee larvae reared singly *in vitro*, in micro colonies, or in full size colonies. *Journal of Apicultural Research*.
12. BUCHER, G E (1958) General summary and review of utilization of disease to control insects. *Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology* 4: 695-701.
13. BURNSIDE, C E; STURTEVANT, A P; HOLŠT EC (1949) *Diagnosing bee diseases in the apiary*. US Department of Agriculture Circular 392; 31 pp.
14. CALESNICH, E J; WHITE, J W (1952) Thermal resistance of *Bacillus larvae* spores in honey. *Journal of Bacteriology* 64: 9-15.

15. CANTWELL, G E (1970) The feasibility of using irradiation to control AFB. *American Bee Journal* 8: 310.
16. CANTWELL, G E , LEHNERT, T; TRAVERS, R S (1975) USDA research on fumigation for control of bee diseases and pests of the honey bee. *American Bee Journal* 115: 96-97.
17. CARPANA, E, MAROCCHI, L; GELMINI, L (1995) Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie* 26: 11-16.
18. CASTEELS, P; AMPE, C; JACOBS, F; VAECK, M; TEMPST, P (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO Journal* 8: 2387-2391.
19. COSENZA, G W; SILVA, T (1972) Comparação entre a capacidade de limpeza de favos da abelha africana, da abelha caucasiana e de suas híbridas. *Ciência e Cultura* 24: 1153-1158. (Fra SPIVAK, M; GILLIAM, M (1998)).
20. DAVIDSON, E W (1970) Ultrastructure of peritrophic membrane development in larvae of the worker honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 451-454.
21. DAVIDSON, E W (1973) Ultrastructure of American foulbrood disease pathogenesis in larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 21: 53-61.
22. DERAKSHIFAR, I (1995) Das Auftreten von Faulbrutsporen in Österreichischen Honigen als diagnostische Methode zur Früherkennung von Faulbrutherden. *Bienenvater* 11: 464-469.
23. DJORDJEVIC, S, HO-SHON, M; HORNITZKY, M (1994) DNA restriction endonuclease profiles and typing of geographically diverse isolates of *Bacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research* 33: 95-103.
24. DINGMAN, D W; STAHLY, D P (1983) Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 860-869.
25. DROBNÍKOVÁ, V (1992) Bösartige Faulbrut. *Vcelarství* 11: 254-255. (Fra *Deutsches Bienen Journal* 1993, 3: 30).
26. DROBNÍKOVÁ, V; RICHTER, V; HÄUSLER, J; PYTELOVÁ, I (1994) Characterization of *Bacillus larvae* and related bacilli by chromatography of cell fatty acids. *Journal of Apicultural Research* 33: 69-74.
27. FERRARO, R (1996) Faulbrutsporen in Honig - Situation in der Schweiz. *Schweizerische Bienenzeitung* 119: 513-515.
28. GILLIAM, M; DUNHAM, D R (1978) Recent isolations of *Bacillus pulvifasciens* of powdery scales of honey bee, *Apis mellifera*, larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 32:222-223.
29. GLINSKI, Z; JAROSZ, J (1998) Exoproteinase of *Bacillus larvae* destroys the “in vitro” antibacterial activity of cecropins of lepidopteran insects and antibacterial response peptides from the honeybee. *Apiacta* 33: 1-8.

30. GOCHNAUER, T A (1981) The distribution of *Bacillus larvae* spores in the environments of colonies infected with American foulbrood disease. *American Bee Journal* 121: 332-335.
31. GOODWIN, R M; PERRY, J H; HOUTEN A T (1994) The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. *Journal of Apicultural Research* 33: 209-212.
32. GOODWIN, R M; PERRY, J H; HAINE, H M (1996) A study on the presence of *Bacillus larvae* spores carried by adult honey bees to identify colonies with clinical symptoms of American foulbrood disease. *Journal of Apicultural Research* 35: 118-120.
33. GORDON, R E; HAYNES, W C; PANG, C H (1973) *The Genus Bacillus*. Agriculture Handbook, US Department of Agriculture No. 427 ; 283 pp.
34. GRIMM, M; MOOSBECKHOFER, R (1993) Untersuchung Österreichischer Honige auf das Vorhandsein von *Bacillus larvae*-sporen. *Bienenvater* 4: 167-171.
35. HAGEN, A; HETLAND, A (1988) Forekomst av yngelråtebakterien (*Bacillus larvae*) i honning. *Aktuelt fra Statens Fagtjeneste for Landbruket* 1: 389-392.
36. HANSEN, H (1984) Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honey. *Tidsskrift for Planteavl* 88: 325-328.
37. HANSEN, H (1984) The incidence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honeys retailed in Denmark. *Tidsskrift for Planteavl* 88: 329-336.
38. HANSEN, H (1992) Forekomst af ondaret bipest og bipest-bakterien i Danmark. *Tidsskrift for Biavl* 126: 125-128.
39. HANSEN, H (1996) Bipest-situationen 1996. *Tidsskrift for Biavl* 130: 356-357.
40. HANSEN, H (1998) Forskrift for undersøgelse og behandling af honningbier for sygdomme. *Danmarks JordbruksForskning*, 7pp.
41. HANSEN, H; RASMUSSEN, B (1986) The investigation of honey from bee colonies for *Bacillus larvae*. *Tidsskrift for Planteavl* 90: 81-86.
42. HANSEN, H; RASMUSSEN, B; CHRISTENSEN, F (1988) A preliminary experiment involving induced infection from *Bacillus larvae*. *Tidsskrift for Planteavl* 92: 11-15.
43. HANSEN, H; RASMUSSEN, B; CHRISTENSEN, F (1989) Infection experiments with *Bacillus larvae*. *Proceedings of the XXXII nd International Apicultural Congress of Apimondia, Rio de Janeiro;* Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania; pp 207-212.
44. HANSEN, H; RASMUSSEN, B (1990) The sensitiveness of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* to heat treatment. *Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology, Gent;* 146-148.
45. HANSEN, H; BRØDSGAARD, C J (1993) Examination of pollen for the foulbrood bacterium *Bacillus*

- larvae. Proceedings of the XXXIIrd International Apicultural Congress of Apimondia, Beijing.*
Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania; pp 136-140.
46. HANSEN, H; BRØDSCGAARD, C J (1995) Field trials with induced infection of *Bacillus larvae*.
Proceedings of the XXXIV th International Apicultural Congress of Apimondia, Lausanne. Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania; pp 166-171.
47. HANSEN, H; BRØDSCGAARD, C J (1997) Cleaning of beehives contaminated with spores of the foulbrood bacterium *Paenibacillus larvae larvae*. *Proceedings of the XXXVth International Apicultural Congress of Apimondia, Antwerp.* Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania; (in press).
48. HANSEN, H; BRØDSCGAARD, C J (1997) Der Verlauf der Amerikanischen (Bösartigen) Faulbrut in künstlich infizierten Völkern. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung / die biene* 3: 11-14.
49. HANSEN, H; BRØDSCGAARD, C J (1997): Rengøring af bilstader forurenede med bipestsporer. *Tidsskrift for Biavl* 11: 327-329.
50. HANSEN, H; BRØDSCGAARD, C J (1999) Den danske bekämpelse af ondaret bipest. *Særnummer af Tidsskrift for Biavl 5, Offentlig bekämpelse af bisygdomme i 50 år:* 3-8.
51. HASEMAN, L (1961) How long can spores of American foulbrood live? *American Bee Journal* 101: 298-299.
52. HEYNDRICKX, M; VANDEMEULEBROECKE, K; HOSTE, B; JANSEN, P; KERSTERS, K; DE VOIS, 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 Description of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 270-279.
53. HITCHCOCK, J D; REVELL I L (1963) The spread of American foulbrood from pollen trapped from bees' legs. *American Bee Journal* 103: 220-221.
54. HOAGE, T R; ROTHENBUHLER, W C (1966) Larval honey bee response to various doses of *Bacillus larvae* spores. *Journal of Economic Entomology* 59: 42-45.
55. HOLST, E C (1946) A single field test for American foulbrood. *American Bee Journal* 86: 14, 34.
56. HORNITZKY, M A Z (1992) Salvage of American brood diseaseinfected hive boxes by the use of high pressure water sprays. *NSW Apiarists' Association Inc. News November-December:* 3.
57. HORNITZKY, M A Z (1994) Commercial use of gamma radiation in the beekeeping industry. *Bee World* 75: 135-142.
58. HORNITZKY, M A Z; KARLOVSKI, S (1989) A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honey bees. *Journal of Apicultural Research* 28: 118-120.
59. HORNITZKY, M A Z; CLARK, S (1991) Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the

- detection of American foulbrood. *Journal of Apicultural Research* 30: 13-16.
60. HORNITZKY, M A Z; NICHOLLS, P J (1993) J medium is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *Journal of Apicultural Research* 32: 51-52.
61. HOWARD, L O (1907) Report of the meeting of inspectors of apiaries, San Antonio, Texas, November 1906. *USDA, Bureau of Entomology, Bulletin* 70.
62. JAECKEL, S (1930) Zur pathologischen Anatomie der Biene *Apis mellifica* L. während der Metamorphose bei bösartiger Faulbrut (*Bacillus larvae* White). *Archives für Bienenkunde*, 11: 41-92.
63. JORD- OCH SKOGSBRUKSMINISTERIET (1996) Bekämpande av amerikansk yngelröta hos bin. *Beslut nr. 2/VLA/96*, 12 pp.
64. KATZNELSON, H (1950) *Bacillus pulvifasciens* (n. Sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *Journal of Bacteriology* 59: 153-155.
65. KANEDA, T (1969) Fatty Acids in *Bacillus larvae*, *Bacillus lentimorbus*, and *Bacillus popilliae*. *Journal of Bacteriology* 98: 143-146.
66. KNOX, D A; SHIMANUKI, H; CARON, D M (1976) Ethylene oxide plus oxytetracycline for the control of American foulbrood in honey bees. *Journal of Economic Entomology* 69: 606-608.
67. KOSTECKI, R; JELINSKI, M (1977) Investigation on the sterilization of beewax for foundation production. *Buletyn Instytutu Weterynarii Pulawy* 21, 6-9.
68. L'ARRIVÉ, J C M (1958) *Survival of honey bee larvae following colony inoculation with various dosages of Bacillus larvae*. PhD thesis; W. Iowa State College, USA; *Dissertation Abstracts* 19: 195-196.
69. LEWIS, L F; ROTHENBUHLER, W C (1961) Resistance to American foulbrood in honey bees: III. Differential survival of the two kinds of larvae from two drone matings. *Journal of Insect Pathology* 3: 197-215.
70. MATHESON, A (1992) Strategies for prevention and control of American foulbrood. *American Bee Journal* 132: 399-402, 471-475, 534-537, 547.
71. MATHESON, A (1996) World bee health update 1996. *Bee World* 77: 45-51.
72. MICHAEL, A S (1964) Ethylene oxide, a fumigant for control of pests and parasites of the honey bee. *Gleanings in Bee Culture* 98: 102-104.
73. MORSE, R; HOOPER, T (1985) *The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping*. Blandford Press, Dorset; 432 pp.
74. MORSE, R A; SHIMANUKI H (1990) *Summary of control methods*. In: (Ed. Morse, R. A.) *Honey Bee, Pests, Predators, and Diseases*. Cornell University Press, Ithaca; 342-361.

75. NEWTON, D C; OSTASIEWSKI, N J JR (1986) A simplifies bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *American Bee Journal* 126: 278-281.
76. NORDSTRÖM, S; FRIES, I (1995) A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *Journal of Apicultural Research* 34: 97-103.
77. OHE, W VON DER; SCHÜTZE, K; LIENAU, F W (1996) Arealuntersuchungen auf *Bacillus larvae* Sporen im Honig als prophylaktikum. *Apidologie* 17: 123.
78. OLSEN, P E; GRANT, G A, NELSON, D L, RICE, W (1990) Detection of American foulbrood disease of honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 732-735.
79. OTTE, E (1973) Ein Beitrag zur Labordiagnose der Bösartigen Faulbrut der Honigbiene unter besonderer Berücksichtigung der Immunofluoreszenzmethode. *Apidologie* 4: 331-339.
80. OTTEN, C (1991) Untersuchungen zur Ausbreitung der Bösartigen Faulbrut. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* 12: 13-14.
81. OTTEN, C (1993) Amerikanische Faulbrut. Mögliche Ursachen des gehäuften Auftretens. *Imkerfreund* 8: 6-9.
82. PENG, Y; PENG, K (1979) A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as the diagnostic methods for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 33: 284-289.
83. POHL, F (1998) *Multiple Krankheitserreger der Honigbiene Apis mellifera L. in Abhängigkeit von der Parasitierung durch die Milbe Varroa jacobsoni*. PhD thesis; Universität Bremen, Germany; 240pp.
84. PLURAD, S B; HARTMAN, P A (1965) The fate of bacterial spores ingested by adult honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 7: 449-459.
85. RATNIEKS, F L W (1992) American foulbrood: The spread and control of an important disease of the honey bee. *Bee World* 73: 177-191.
86. RATNIEKS, F L W; NOLAN, T A (1988) New York beekeepers and their knowledge and need for information on brood diseases. *American Bee Journal* 128: 761-764.
87. REICHE, R, MARTIN, K; MÖLLMANN, U; HENTSCHEL, E J (1996) Beitrag zur Klärung der Resistenz der Bienenlarven gegen den Erreger der Amerikanischen Faulbrut *Paenibacillus* (voher *Bacillus*) *larae* (White 1906), *Apidologie* 27: 296-297.
88. REICHE R; OTTEN, C; MARTIN, K; HENTSCHEL, E J (1997) Vergleichende Untersuchungen an *Paenibacillus larvae* subsp *larae* - Stämmen unterschiedlicher Herkunft. *Apidologie* 28: 176-177.
89. RINDERER, T E; ROTENBUHLER, W C (1969) Resistance to American foulbrood in honey bees. X. Comparative mortality of queen, worker and drone larvae. *Journal of Invertbrate Pathology* 13: 81-86.

90. RINDERER, T E; ROTHENBUHLER, W C; GOCHNAUER, T A (1974) The influence of pollen on the susceptibility of honey bee-larvae to *Bacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 23: 347-350.
91. RITTER, W (1990) Bösartige Faulbrut: Wie ist das Vorkommen von Sporen der bösartigen Faulbrut im Honig zu bewerten. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* 9: 13-16.
92. RITTER, W (1993) Eignet sich die Untersuchung von Honigproben zum erkennen der Amerikanischen (Bösartigen) Faulbrut? *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* 1: 13-16.
93. RITTER, W (1994) *Bienenkrankheiten*. Ulmer; Stuttgart, Germany; 128 pp.
94. RITTER, W (1996) Amerikanische (bösartige) Faulbrut der Honigbiene. *Deutsche Bienen Journal* 5: 19.
95. RITTER, W (1996) *Diagnostik und Bekämpfung der Bienenkrankheiten*. Gustav Fischer Verlag; Jena; 230 pp.
96. RITTER, W; KIEFER, B (1993) Eine Methode zum nachweis von *Bacillus larvae* in Honigproben. *Tierärztliche Umschau* 48. 806-811.
97. ROSE, R I (1969) *Bacillus larvae* isolation, culturing and vegetative death point. *Journal of Invertebrate Pathology* 14: 411-414.
98. ROSE, R I; BRIGGS, J D (1969) Resistance to American foulbrood in honey bees. IX. Effects of honey bee larval food on the growth and viability of *Bacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 13: 74-80.
99. ROTHENBUHLER, W C (1958) Genetics and breeding of honey bee. *Annal of Review of Entomology* 3: 161-180.
100. ROTHENBUHLER, W C (1964) Behavioral genetics of nest cleaning in the honeybee. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Animal Behaviour* 4: 578-583.
101. ROTHENBUHLER, W C (1964) Behavioral genetics of nest cleaning in the honeybee. IV Responses of F₁ and back cross generation to disease-killed brood. *American Zoologist* 4: 111-123.
102. ROTHENBUHLER, W C (1967) American Foulbrood and bee biology. *Proceedings of the XXIst International Apicultural Congress of Apimondia, Maryland*. Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania; pp 179-188.
103. ROTHENBUHLER, W C; THOMPSON, V C (1956) Resistance to American foulbrood in honey bees. I. Differential survival of larvae of different genetic lines. *Journal of Economic Entomology* 49: 470-475.
104. SCHNEIDER, P; DRESCHER, W (1987) Einfluß der Parasiterung durch die Milbe *Varroa jacobsoni* Oud. auf das Schlupfgewicht, die Gewichtsentwicklung, die Entwicklung der Hypopharynxdrüsen und die Lebensdauer von *Apis mellifera* L. *Apidologie* 18: 101-110.

105. SHIMANUKI, H; KNOX, D A; FURGALA, B; CARON, D M; WILLIAMS, J L (1992) Diseases and pests of honey bees. In: (Ed. Graham, J. M.) *The hive and the honey bee*. Dadant & Sons, Hamilton; 1083-1151.
106. SMIRNOV, A M (1982) Study of microbial contamination of hives and combs, and methods of disinfection. *Apacta* 17: 100-104, 119.
107. SNODGRASS, R E (1956) *Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York; 334 pp.
108. SPIVAK, M; DOWNEY, D L (1998) Field assays for hygienic behavior in honey bees (Apidae: Hymenoptera). *Journal of Economic Entomology* 91: 64-70.
109. SPIVAK, M; GILLIAM, M (1998) Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part I. Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee World* 79: 124-134.
110. SPIVAK, M; GILLIAM, M (1998) Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee World* 79: 169-186.
111. STEINKRAUS, K H; MORSE, R A (1992) American foulbrood incidence in some US and Canadian honeys. *Apidologie* 23: 497-501.
112. STEINKRAUS, K H; MORSE, R A (1996) Media for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *Acta Biotechnologica* 16: 57-64.
113. STURTEVANT, A P (1932) Relation of commercial honey to the spread of American foulbrood. *Journal of Agricultural Research* 45: 257-285.
114. STURTEVANT, A P (1936) Quantitative demonstration of the presence of spores of *Bacillus larvae* in honey contaminated by contact with American foulbrood. *Journal of Agricultural Research* 52: 697-704.
115. STURTEVANT, A P; REVELL, I L (1953) Reduction of *Bacillus larvae* spores in liquid food of honey bees by action of the honey stopper, and its relation to the development of American foulbrood. *Journal of Economic Entomology* 46: 855-860.
116. TABER, S; GILLIAM, M (1987) Breeding honey bees for resistance to diseases. *Korean Journal of Apiculture* 2:15-20.
117. THOMPSON, V C (1964) Behaviour genetics of nest cleaning in the honeybee. III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. *Journal of Apicultural Research* 1: 25-30.
118. THOMPSON, V C; ROTHENBUHLER, W C (1957) Resistance to American foulbrood in honey bees. I. Differential protection of larvae by adults of different genetic lines. *Journal of Economic Entomology* 50: 731-737.

119. TOSCHKOV, A VON; VALLERIANOV, T, TOMOV, A (1970) Die Immunfluoreszenz-methode und die schnelle und spezifische Diagnostik der Amerikanischen Faulbrut bie der Bienenbrut. *Bulletin Apicole de Documentation Scientifique et Technique et d'Information* 13: 13-24.
120. WHITE, G F (1906) *The bacteria of the apiary with special reference to bee disease*. US Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Technical Series, No. 14; 50 pp.
121. WHITE, G F (1907) *The cause of American foulbrood*. US Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Circular 94; 4 pp.
122. WHITE, G F (1912) *The cause of European foulbrood*. US Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Circular 157; 15pp.
123. WHITE, G F (1920) *American foulbrood*. US Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Bulletin 809; 54 pp.
124. WHITE, G F (1920) *European foulbrood*. US Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Bulletin 810; 47pp.
125. WILSON, W T (1971) Resistance to American foulbrood in honey bees. XI. Fate of *Bacillus larvae* ingested by adults. *Journal of Invertebrate Pathology* 17: 247-255.
126. WILSON, W T (1972) Resistance to American foulbrood in honey bees. XII Persistence of viable *Bacillus larvae* spores in the feces of adults permitted flight. *Journal of Invertebrate Pathology* 20: 165-169.
127. WILSON, W T (1974) Residues of oxytetracycline in honey stored by *Apis mellifera*. *Environmental Entomology* 3: 674-676.
128. WILSON, W T; ALZUBAIDY, M (1975) The role of the adult queen (*Apis mellifera*) in the epizootiology of American foulbrood disease. *Proceedings of the 25th International Apicultural Congress 25, Grenoble*; 372-374.
129. WOODROW, A W (1941) Susceptibility of honey bee larvae to American foulbrood. *Gleanings in Bee Culture* 69: 148-151, 190.
130. WOODROW, A W (1942) Susceptibility of honey bee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *Journal of Economic Entomology* 35: 892-895.
131. WOODROW, A W; HOLST E C (1942) The mechanism of colony resistance to American foulbrood. *Journal of Economic Entomology* 35: 327-330.

POSTB. BLAD 7401 HRC 50866
695
Danmarks JordbruksForskning
Afd. for Plantebiologi
Flakkebjerg

4200 Slagelse

DJF Foulum

Postboks 50, 8830 Tjele
Tlf. 89 99 19 00. Fax 89 99 19 19

Direktion
Direktionssekretariat, Økonomisekretariat

Afdeling for Animalske Fødevarer
Afdeling for Husdyravl og Genetik
Afdeling for Husdyrnærings og Fysiologi
Afdeling for Husdysundhed og Velfærd
Afdeling for Jordbrugssystemer
Afdeling for Plantevækst og Jord

Afdeling for Markdrift
Afdeling for Stalddrift
Centrallaboratoriet
Informationsenhed
IT-funktion
Biblioteksfunktion
International Enhed

DJF Årslev

Kirstinebjergvej 10, 5792 Årslev
Tlf. 63 90 43 43. Fax 63 90 43 90

Afdeling for Prydplanter
Afdeling for Vegetabiliske Fødevarer
Afdeling for Infrastruktur

DJF Flakkebjerg

Flakkebjerg, 4200 Slagelse
Tlf. 58 11 33 00. Fax 58 11 33 01

Afdeling for Plantebiologi
Afdeling for Plantebeskyttelse
Afdeling for Infrastruktur

DJF Bygholm

Postboks 536, 8700 Horsens
Tlf. 75 60 22 11. Fax 75 62 48 80

Afdeling for Jordbrugsteknik
Driftsfunktion

Enheder på andre lokaliteter

Afdeling for Sortsafprøvning
Teglværksvej 10, Tystofte
4239 Skælskør
Tlf. 58 16 06 00. Fax 58 16 06 06

Askov Forsøgsstation
Vejnvej 55, 6600 Vejen
Tlf. 75 36 02 77. Fax 75 36 62 77

Bioteknologigruppen
(Afd. f. Plantebiologi)
Thorvaldsensvej 40, 1.
1871 Frederiksberg C
Tlf. 35 28 25 88. Fax 35 28 25 89

Borris Forsøgsstation
Vestergade 46, 6900 Skjern
Tlf. 97 36 62 33. Fax 97 36 65 43

Den Økologiske Forsøgsstation
Rugballegård
Postboks 536, 8700 Horsens
Tlf. 75 60 22 11. Fax 75 62 48 80

Foulumgård, Postboks 50
8830 Tjele
Tlf. 89 99 19 00. Fax 89 99 19 19

Jyndevad Forsøgsstation
Flensborgvej 22, 6360 Tinglev
Tlf. 74 64 83 16. Fax 74 64 84 89

Rønhave Forsøgsstation
Hestehave 20, 6400 Sønderborg
Tlf. 74 42 38 97. Fax 74 42 38 94

Silstrup Forsøgsstation
Højmarken 12, 7700 Thisted
Tlf. 97 92 15 88. Fax 97 91 16 96

Tylstrup Forsøgsstation
Forsøgsvej 30, 9382 Tylstrup
Tlf. 98 26 13 99. Fax 98 26 02 11