

Prehľad výskytu 6 vírusov *A. mellifera* na území Slovenskej Republiky pomocou RT-PCR za obdobie rokov 2007 -2008.

Centrum výskumu živočíšnej výroby – Nitra, Ústav včelárstva – Liptovský Hrádok:

Staroň M., Čermáková T.

Štátny veterinárny a potravinový ústav Dolný Kubín:
Habovštiaková J.

Univerzita veterinárskeho lekárstva Košice:
Toporčák J.

1. Úvod

Viroológia sama o sebe, ako aj virológia v oblasti apidológie je pomerne mladým vedným odborom.

Prvý zreteľnejší rozmach virológie, ako oblasti medicínsko-biologických vied, nastal až v 30 rokoch 20. storočia a to vyvinutím elektrónového mikroskopu, ktorý po prvý raz umožnil vizualizáciu vírusových partikul. História virológie včiel sa začala písať až v 60 rokoch minulého storočia vo Veľkej Británii, kedy vedci Brenda Ball a Leslie Bailey položili základy virológie včiel bližším opisom prvých včelích vírusov (GENERSH, 2008).

Dodnes Nie je presne známy počet týchto patogénov, nakoľko niektoré z doteraz objavených môžu byť len subtypom jedného a toho istého pôvodcu, zatiaľ čo iné ešte neboli objavené. Limitným faktorom v tejto oblasti je vývoj nových, citlivejších metód diagnostiky, ktorý je v poslednom období najmarkantnejší najmä v oblasti molekulárnej biológie. Zároveň sa táto diagnostická metóda zdá byť pre svoju vysokú špecifickosť, vyplývajúcu z génovej variability pôvodcov chorôb, tou najlepšou cestou v určovaní nových vírusových patogénov, vytváraní ich fylogenetických stromov a v objasňovaní epizootologických súvislostí.

Záujem spoločnosti o poznanie vírusových patogénov včiel vzrastal až po udalosti v rokoch 2006/2007 v USA, ktorá bola označená ako Colony Collapse Disorder (CCD) a pravdepodobne bezprostredne súvisela s niektorými vírusovými ochoreniami ako sú DWV, CBPV a IAPV v interakcii s inými faktormi napr. *Varroa destructor* (GENERSH, 2008).

1.1 Prehľad niektorých doteraz známych vírusových ochorení

Vírus deformovaných krídel (DWV)

Pôvodca tohto ochorenia je zaradený medzi iflavírusové ochorenia včiel. Jeho príslušnosť k iflavírusom potvrdzuje aj analýza sekvencií RNA závislej RNA polymerázy, ktorá je na 99% zhodná so sekvenciou iflavírusu (TERIO et al., 2008).

Vírus deformovaných krídel vyvoláva za normálnych okolností latentnú infekciu (covert infection). Samotná prítomnosť vírusu vo včelej populácii a jeho prenos medzi jednotlivými generáciami včiel teda nespôsobuje svojim inaparentným priebehom ochorenia výrazné ekonomické straty (GENERSH, 2008; GISDER et al., 2009).

Vertikálny venerický prenos latentnej formy ochorenia bol potvrdený aj dvomi nezávislými štúdiami vo Švédsku a Nemecku. Obe, prostredníctvom umelej inseminácie, potvrdili, že je možný prenos vírusu na nasledujúcu generáciu tak prostredníctvom vajíčka DWV pozitívnej matky (DWV pozit. trúd F1 generácie) ako aj prostredníctvom semena DWV pozitívneho trúda. Zostáva otáznou, aj keď vysoko pravdepodobnou, či je takáto vertikálna transmisia možná aj počas prirodzeného párenia (Miranda et al., 2008; Yue et al., 2007).

O skutočnosti, že vírus nestratil svoju patogenitu hovorí aj fakt, že akonáhle je vírus prenesený prostredníctvom *V. destructor* na včelí plod, môže dôjsť k výrazným stratám vo včelstve (GENERSH, 2008; GISDER et al., 2009). Výsledky štúdie, ktorú vykonal Inštitút for Bee Research v Nemecku, taktiež podporujú koreláciu medzi vírusovou replikáciou vírusu v roztočoch *V. destructor* a morfológicky deformovanými včelami. Kvantifikácia

ekvivalentov virálneho genómu odhalila, že klieštiky schopné indukovať zjavnú infekciu DWV obsahujú 10(10)-10(12) genómových ekvivalentov na klieštika. V kontraste, klieštiky, ktoré nedokážu klinicky vyvolať ochorenie obsahujú maximálne 10(8) virálnych genómových ekvivalentov na klieštika. Z toho sa dá vyvodiť, že vznik klinicky zjavného ochorenia nie je podmienený len prenosom partikul DWV prostredníctvom *V. destructor*, ale taktiež je závislý na replikácii vírusu v klieštikovi a na samotnom titre DWV vo *V. destructor* (GISDER et al., 2009). Samotná replikácia vírusu vo *V. destructor* je doposiaľ len hypotetická, nakoľko imunohistochemické analýzy nepotvrdili špecifické miesta naviazania protilátok DWV v žiadnom z tkanív *V. destructor*. Tieto boli dokázane len v lúmene stredného čreva *V. destructor* v hmote, ktorá predstavovala fekálne pelety (SENTILLÁN-GALICIA et al., 2008).

V posledných rokoch DWV sa stal najprevalentnejšou vírusovou infekciou u včely medonosnej v spojení s *V. destructor*. DWV je široko rozšírený vo svete a objavuje sa kdekoľvek kde sa objaví *V. destructor*, hoci nízke hladiny vírusu môžu byť nájdené aj u kolónií, ktoré nie sú napadnuté *Varroa* (FORSGREN et al., 2009).

Ďalším z novo objavených vírusov, ktorého prenos bezprostredne súvisí s *V. destructor* a ktorý sa genotypovo veľmi podobá DWV je Kakugo vírus (KV). Patrí medzi iflavírusy s ktorými vykazuje 95% zhodu v sekvencií RNA závislej RNA polymerázy. Typickým symptómom tejto infekcie je zvyšujúca sa agresivita infikovaných jedincov. Prostredníctvom RT-PCR nebol ani v jednom prípade detekovaný vírus v trúdoch, napriek tomu, že práve trúdi plod je spájaný s vysokou invadovanosťou *V. destructor*. Identifikácia tohto vírusu s očividne podobnými črtami medzi DWV a KV otvára nové perspektívy patologicko-

biologickej úlohy iflavírusov v populácii *A. mellifera* (TERIO et al., 2008).

Vreckovitost' včelieho plodu (SBV)

Túto vírusovú chorobu po prvýkrát zistil White v roku 1917 v USA a vírus identifikoval Bailey v roku 1963 zo vzoriek z Európy, Egypta, Austrálie, Nového Zélandu a Novej Guinei.

Choroba sa klinicky prejaví až po zaviečkovaní, skôr ako sa larva zakuklí. Posledná larválna pokožka sa oddelí od novej pokožky kukly, ale nezvliekne sa. Exuviálna tekutina sa nevstrebe, ale hromadí sa medzi starou a novou pokožkou. Pri vytiahnutí pinzetou sa podobá vačku, ktorý je naplnený tekutinou. Nakoniec larva vyschne v čiernohnedý člnku podobný príškvár tvaru gondoly na dne bunky, ktorý sa dá ľahko vytiahnuť (TOPORČÁK, 1997).

Navonok nepostrehnuteľná ale veľmi častá je aj infekcia dospelých robotníc. Tieto jedince sa veľmi rýchlo vyvíjajú, zbierajú a konzumujú málo peľu predčasne starnú a hynú (BIENENINSTITUT KIRCHHEIN, 2005).

V roku 2001 bol na Zhongshan University v Číne izolovaný čínsky vírus vreckovitosti včelieho plodu (CSBV). Analýzy sekvenovaných CSBV RNA fragmentov odhalili homológnu nukleotidovú sekvenciu 87,6% a homológnu aminokyselinovú sekvenciu 94,6% s SBV naznačujúc že CSBV je odlišný ale vysoko homológny vírus s SBV. 3D štruktúra CSBV vytvorená použitím elektrónového kryomikroskopu a pomocou počítačových rekonštrukčných metód bola veľká 2,5 nm a poukazovala na to, že kapsid mal icozahedrálne kapsidové schránku s hladkým povrchom. Bolo na ňom 12 pentónov na icozahedrálnych vrcholoch a 132 pórov penetrujúcich schránku (ZHANG et al., 2001).

Vírus černania materských buniek (BQCV)

BQCV postihuje predovšetkým plod budúcej včelej matky *A. mellifera*. Vo všeobecnosti sú ohrozené materské bunky vykazujúce čierno sfarbené bunky ako typický symptóm. Trúdi a robotníčie plod môže byť infikovaný BQCV ale zvyčajne bez klinických symptómov. Na území Nemecka bol BQCV prvýkrát identifikovaný v trúdom plode v Hessene v roku 2001. Prítomnosť špecifického fragmentu pre BQCV bol potvrdený metódou PCR. Získaný produkt bol sekvenovaný a porovnaný s údajmi v génovej banke. Vykazoval podobnosť z juhoafrickým izolátom (SIEDE, BUCHLER, 2003).

Na spoľahlivú detekciu BQCV a DWV bola v Španielsku vyvinutá špeciálna diagnostická metóda One step real time SG (SZVR GREEN) RT-PCR. Táto diagnostická metóda sa ukázala byť rýchlou, presnou a užitočnou technikou na detekciu a dokonca kvantifikáciu týchto včelích vírusov, ktoré spôsobujú inaparentné infekcie, a môžu prispieť spolu s ostatnými faktormi k narastajúcej depopulácii včelích kolónií (KUKIELKA et al., 2008).

Akútna paralýza včiel (APBV)

Vírus akútnej paralýzy včiel bol prvýkrát detekovaný vo vzorkách z Európy a Austrálie. Pôvodcom je guľovitý vírus o priemere 30 nm. Pribeh choroby je rýchlejší ako pri chronickej paralýze včiel. Včely hynú o 3 až 4 dni po nakazení (TOPORČÁK, 1997).

Je to rozšírené ochorenie včiel. V dospelých včelách sa vírus nachádza najmä v tukovom telese a v slinných žľazách. Napadnutie lariev je taktiež možné. Typické klinické príznaky sa v tomto prípade nedajú pozorovať. Patogenita APBV nie je doposiaľ objasnená. Vo včelách sa môže nachádzať viac ako 10 miliónov vírusových partikul v tukovom telese, pričom infekcia prebieha inaparentne. Injekčné podanie vírusových partikul v laboratórnych podmienkach do

hemolymfy včely vedie v priebehu krátkeho času k smrti. Vo všeobecnosti stačí na takýto priebeh 100 vírusových partikul. Vírus sa teda aktivuje jeho preniknutím do hemolymfy včely, kam sa môže dostať buď priamo z *V. destructor* alebo z tukového telesa, ktoré bolo mechanicky poškodené pri cicaní hemolymfy klieštikom. Bielkoviny obsiahnuté v slinách roztoča podporujú množenie vírusových partikul. Prostredníctvom hemolymfy sa vírusové partikuly dostávajú do ďalších životne dôležitých orgánov ako mozog. Toto môže viesť k zmenám správania, orientačným problémom a poruchám vývoja, čiže v konečnom dôsledku ku predčasnej smrti včiel a samotného včelstva (BIENENINSTITUT KIRCHHEIN, 2005).

Chronická paralýza včiel (CBPV)

Vírusové ochorenie známe svojimi typickými klinickými príznakmi: tmavým až čiernym zfarbením dospelých včiel a vypadávaním ich ochlpenia. CBPV je prenášaný bezprostredným kontaktom. Pri vysokej hustote včiel sa jednotlivým včelám olamujú chlčky a tieto mikrotraumy sú ideálnym miestom pre vstup vírusových partikul (BIENENINSTITUT KIRCHHEIN, 2005).

CBPV je jednovláknitý RNA vírus, ktorý môže zapríčiniť významné straty vo včelích kolóniách. Tento vírus preukazuje neurotropizmus, čo bolo dokázané metódami založenými na in situ hybridizácii, ktoré boli vyvinuté na lokalizáciu genomických a antigenomických CBPV RNA v infikovaných mozgoch včiel. Obe RNA boli detekované v mozgu včiel infikovaných prirodzene aj umelo. Hybridizačné znaky boli dokázané najmä v tých oblastiach mozgu, ktoré sa angažujú vo vyššej neurálnej funkcii a taktiež boli dokázané v oblastiach optických a tykadlových oblastiach mozgu kde sú senzorické zakončenia. Prítomnosť vírusov na týchto úrovniach môže vysvetliť

nervové symptómy pozorované u infikovaných včiel (OLIVIER et al., 2008)

Kašmírsky vírus (KBV) .

Prvý krát bol vírus detekovaný v Indii na včele *A. ceranae*, neskôr v Austrálii a v Kanade, kde bol detekovaný ešte pred príchodom *V. destructor*. Priebehu infekcie pravdepodobne napomáha *V. destructor* ako aj nozematóza včiel (BIENENINSTITUT KIRCHHEIN, 2005).

V roku 2003 bol tento vírus prvý krát detekovaný na území Nemecka v Hessene. Z 56 hessenských kolónií, ktoré podľahli náhlemu kolapsu počas zimy 2002-2003. Vírusová RNA bola purifikovaná z 10 mŕtvych včiel na každú vzorku. KBV bol detekovaný použitím RT-PCR. 13 vzoriek bolo pozitívnych na KBV. PCR amplikon bol sekvenovaný. Génová banka jasne ukázala hessenský amplikon ako KBV fragment. Bola zistená viac ako 85% podobnosť fragmentu. Fylogenetické analýzy odhalili blízky genetický vzťah hessenského izolátu a izolátu z Nového Zélandu. Severoamerické, Ruské a Austrálske údaje génovej banky sa nezhodujú s hessenským izolátom. Jedná sa o prvú zdokumentovanú detekciu KBV v strednej Európe (SIEDE, BUCHLER, 2004).

V Európe bol KBV zaznamenaný v Španielsku (1995), Francúzsku (2004), Nemecku (2004), Luxemburgu (2005) a vo Veľkej Británii (2007) (NIELSEN et al., 2008).

1.2 Prehľad vírusových ochorení v niektorých častiach sveta

Dánsko:

V roku 2007 publikoval Nielsen et al. výsledky svojho prieskumu 6 vírusov (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV a SBV) v Dánsku. RT-PCR analýzu

vykonali na 96 vzorkách zo stanovíšť, ktoré vykazovali výrazné strety vo včelstvách. Vo vzorkách bola potvrdená prítomnosť všetkých 6 vírusov, pričom ich prevalencia bola výrazne odlišná: SBV bola potvrdená v 78 prípadoch, DWV v 55, ABPV v 11, CBPV v 4, BQCV v 1 a KBV v 1. Zároveň bol tento prieskum prvou publikovanou zmienkou výskytu KBV na území Dánska (NIELSEN et al., 2008).

Francúzsko:

Tenceva et al. (2004) študoval výskyt a šírenie 6 včelích vírusov v 36 včelínach vo Francúzsku. V tejto štúdii bol DWV zaznamenaný v 97% prípadov, SBV v 86%, BQCV v 86%, ABPV v 58%, CBPV v 28% a KBV v 17% (NIELSEN et al., 2008).

Nemecko:

Siede a Buchler uskutočnili v roku 2003 prieskum výskytu ABPV, BQCV, CBPV, KBV a SBV v regióne Hessen. Zaznamenali 3 vírusy: ABPV, BQCV a SBV (NIELSEN et al., 2008).

Severné Thajsko:

V severnom Thajsku, v oblasti kde je lokalizovaných približne 80% všetkých thajských úl'ov, vytvoril RT-PCR analýzou Sanpa et al. v roku 2008 prehľad výskytu 6 vírusov. Testované vzorky boli pozitívne na DWV, ABPV, SBV a KBV naopak nebol potvrdený CBPV a BQCV. Najvyššia prevalencia bola zaznamenaná u DWV a hneď druhým najčastejším bol ABPV (SANPA et al., 2009).

Juhovýchodná Brazília:

Tri rôzne včelie vírusy a to APBV, BQCV a DWV identifikoval Teixeira et al. v roku 2008, počas screeningu RNA z 1920 individuálnych včiel, zozbieraných v regióne juhovýchodnej Brazílie, v ktorom boli zaznamenané nezvyčajne vysoké straty. ABPV bol potvrdený v 27,1% vzoriek,

BQCV v 37% a DWV v 20,3% prípadov (TEIXEIRA et al., 2008).

2. *Vlastná vedecká práca*

2.1 *Materiál a metodika*

Vzorky na analýzu boli získavané od jednotlivých chovateľov včiel z plemenných chovov, ktorí vzorky zasielali osobne, alebo u nich bola vykonaná kontrola stavu plemenného chovu a vzorky boli odobraté pracovníkmi Ústavu včelárstva v Liptovskom Hrádku pri tejto príležitosti.

Vzorky boli následne zvoznou linkou prepravené do akreditovaného pracoviska Štátny veterinárny a potravinový ústav Dolný Kubín, kde boli až do analýzy uskladnené pri teplote -20°C .

Vzorky boli vyšetrené na prítomnosť 6 vírusov včiel: ABPV, CBPV, DWV, SBV, KBV, BQCV. Z tiel včiel bola izolovaná vírusová RNA, ktorá bola následne reverzne transkribovaná a amplifikovaná v termocykléry, pričom pre každý jednotlivý vírus sa použil špecifický pár primerov (Tentcheva et al. 2004). Finálny produkt bol následne separovaný pomocou gélovej elektroforézy a vizualizovaný.

Výsledok bol potvrdený sekvenovaním: kde v pozitívnom prúde (na géli bend očakávanej veľkosti – dôkaz prítomnosti konkrétneho vírusu), sa vzniknutý RT-PCR produkt purifikoval a následne sekvenoval. Získaná sekvencia bola porovnaná s génovou bankou v programe BLAST.

2.2 *Výsledky*

Výsledky analýz za rok 2007

Celkovo bolo analyzovaných 55 vzoriek včiel a 4 vzorky plodových plástov.

V analyzovaných vzorkách včiel a plástov

boli diagnostikovaní pôvodcovia 4 vírusových ochorení: ABPV, DWV, KBV a SBV.

Negatívnych bolo 28 vzoriek, 31 vzoriek s pozitívnym nálezom vírusov, z toho 3 vzorky boli pozitívne na 2 pôvodcov vírusových ochorení súbežne – koinfekcia. (Tab. č.1)

Výsledky analýz za rok 2008

Za rok 2008 bolo vyšetrených 14 vzoriek získaných zo včelstiev piatich plemenných chovov, pričom vzorky 4 včelstiev boli pozitívne, čo predstavuje 28,57 % pozitivitu v rámci vyšetrených vzoriek včelstiev z plemenných chovov v danom roku.

Celkovo, bez ohľadu na charakter chovu bolo na prítomnosť SBV vyšetrených 24 vzoriek pochádzajúcich z 15 chovov. V rámci vzoriek bolo SBV pozitívnych 9 vzoriek (37,5%) a v rámci chovov vykazovali pozitivitu 4 chovy (26,7%). (Tab. č.2)

2.3 *Záver*

V roku 2007 boli odobraté vzorky z 27 plemenných chovov za účelom lab. analýzy pre prítomnosť SBV, pričom 4 chovy vykazovali pozitivitu na vreckovitost', čo predstavuje 14,81 % pozitivitu v rámci vyšetrených plemenných chovov. V prípade SBV v porovnaní s rokom 2007 sa javí, aj napriek menšiemu počtu vyšetrených vzoriek v roku 2008, že výskyt vreckovitosti má stúpajúcu tendenciu.

V prípade ostatných vírusových infekcií je situácia v oboch rokoch porovnateľná. Celkovo bolo v roku 2007 analyzovaných 55 vzoriek včiel a 4 vzorky plodových plástov.

V analyzovaných vzorkách včiel a plástov boli diagnostikovaní pôvodcovia 4 vírusových ochorení: ABPV, DWV, KBV a SBV.

Negatívnych bolo 28 vzoriek, 31 vzoriek s pozitívnym nálezom vírusov, z toho 3 vzorky boli pozitívne na 2 pôvodcov vírusových ochorení – koinfekcia.

Pre veľkú variabilitu príznakov sprevádzajúcich zvýšené výpadky včelstiev padá podozrenie na ich pôvodcu práve na vírusové ochorenia včiel. V dnešnej dobe je bližšie známych približne 18 vírusových pôvodcov ochorení včiel. Samotní, u nás sa vyskytujúci, pôvodcovia vírusových ochorení včiel za normálnych okolností svojou invazivitou neprevyšujú imunitné mechanizmy zdravej včely, ktorá je navyše podporovaná obrannými mechanizmami včelstva ako spoločenstva. Pripisovať výpadky včelstiev výlučne virózam by preto nebolo správne.

Iná situácia však nastáva pri súčinnosti vírusov s ďalšími stresovými faktormi vyplývajúcimi jednak z nadmerne zaťažovaného životného prostredia a jednak v súčinnosti s ďalšími pôvodcami chorôb včiel (*V. destructor*, *N. apis*, *N. ceranae* a ďalšie). V niektorých prípadoch sa pôvodcovia primárnych ochorení stávajú priamo vektorom (prenášačom) vírusov. Tak je tomu napríklad pri vzájomnom vzťahu *V. destructor* a DWV (Genersh 2008; Gisder et al., 2009).

Sú to poznatky, ktoré jednoznačne posúvajú priamu prevenciu vírusových ochorení aj do sféry prevencie ochorení oslabujúcich včelstvo (klieštikovitosť, nozematóza) a v neposlednom rade aj do sféry správnych včelárskych techník, predovšetkým pri príprave včelstiev na zimovanie.

V blízkej budúcnosti je nevyhnutné zamerať apidológiu na oblasť skúmania aj vírusových ochorení a to najmä na ich epizootologické súvislosti.

Tabuľka 1.: Prehľad počtu pozitívnych vzoriek jednotlivo pre každý patogénny agens za rok 2007

Vzorky	Vírusy					
	ABPV	DWV	CBPV	KBV	SBV	BQCV
včely	23	2	-	1	3	-
plást	3	-	-	1	1	-

Tabuľka 2.: Prehľad počtu pozitívnych vzoriek jednotlivo pre každý patogénny agens za rok 2008

Vzorky	Vírusy					
	ABPV	DWV	CBPV	KBV	SBV	BQCV
včely	12	-	-	-	7	-
plást	-	-	-	-	2	-

Použitá literatúra:

1. de Miranda, JR., Fries, I.: Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Invertebr. Pathol.*, 98, 2, 2008, 184-189
2. Forsgren, E., de Miranda, JR., Isaksson, M., Wei, S., Fries I.: Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.*, 47, 2, 2009, 87-97
3. Genersch, E.: Häufig, aber meist ohne Symptome. *Adiz*, 42, 9, 2008, 12-13
4. Gisder, S., Aumeier, P., Genersch E.: Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.*, 90, 2, 2009, 463-467
5. Kukielka, D., Esperón, F., Higes, M., Sánchez-Vizcaíno, JM.: A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J. Virol. Methods*, 147, 2, 2008, 275-281
6. Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen, Bieneninstitut Kirchhain: Virosen der Bienen, <http://www.bieneninstitut-kirchhain.de>, 2005
7. Nielsen, S.L., Nicolaisen, M., Kryger, P.: Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie*, 39, 3, 2008, 310-314
8. Olivier, V., Massou, I., Celle, O., Blanchard, P., Schurr, F., Ribiere, M., Gauthier, M.: In Situ hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *J. Virol. Methods*, 153, 2, 2008, 232-237
9. Sanpa, S., Chantawannakul, P.: Survey of six bee viruses using RT-PCR in Northern Thailand. *J. Invertebr. Pathol.*, 100, 2, 2009, 116-119
10. Santillán-Galicia, MT., Carzaniga, R., Ball, BV., Alderson, PG.: Immunolocalization of deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.*, 89, 7, 2008, 1685-1689
11. Siede, R., Büchler, R.: Symptomatic Black Queen Cell Virus infection of drone brood in Hessian apiaries. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 116, 3-4, 2003, 130-133
12. Siede, R., Büchler, R.: First detection of Kashmir bee virus in Hesse, Germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 117, 1-2, 2004, 12-15
13. Teixeira, EW., Chen, Y., Message, D., Pettis, J., Evans, JD.: Virus infection in Brazilian honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 99, 1, 2008, 117-119
14. Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, ME, Bergoin, M.: Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 2004, 7185 – 7191
15. Terio, V., Martella, V., Camero, M., Decaro, N., Testini, G., Bonerba, E., Tantilto, G., Buonavoglia, C.: Detection of a honeybee iflavivirus with intermediate characteristics between kakugo virus and deformed wing virus. *New Microbiol.*, 31, 4, 2008, 439-444
16. Toporčák, J.: Choroby včiel. Košice, Datahelp, ISBN 80-88867-06-1, 1997, s. 97
17. Yue, C., Schröder, M., Gisder, S., Genersch, E.: Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gen. Virol.*, 88, 8, 2007, 2329-2336
18. Zhang, J., Feng, J., Liang, Y., Chen, D., Zhou, ZH., Zhang, Q., Lu, X.: Three-dimensional structure of the Chinese Sacbrood bee virus. *Sci. China C Life Sci.*, 44, 4, 2001, 443-448