

РАЗДЕЛ 3.2.

НАСТОЯЩИЕ ПЧЕЛЫ

ВВЕДЕНИЕ В БОЛЕЗНИ ПЧЕЛ

Пчелы – это насекомые, близкородственные муравьям и осам. Существует много тысяч видов пчел, большая часть которых не являются социальными насекомыми и живут уединенной жизнью. Медоносные пчелы, виды Apis, живут в колонии и являются семейством социальных насекомых. Существует множество видов и подвидов медоносных пчел, которые адаптированы к окружающей среде.

Для пчеловодства важны два вида – западная медоносная пчела Apis mellifera и восточная медоносная пчела A. cerana. Восточная медоносная пчела обитает на Европейском и Африканском континентах, и является самой крупной из дупло-гнездовых пчел. В настоящее время выявлено 24 подвидов A. mellifera. По крайней мере, два подвидов A. mellifera представляют интерес для пчеловодства. Африканская пчела, A.m. scutellata случайно завезена в Южную Америку и известна своим оборонительным поведением. Капская пчела, A.m. capensis, может представлять большую проблему для других подвидов A. mellifera, т.к. она является серьезным социальным паразитом для последних с точки зрения пчеловодства.

Считается, что все пчелы восприимчивы к известным болезням пчел, но различные подвиды могут обладать различной восприимчивостью. Диагностика и контроль болезней медоносных пчел на уровне колонии достаточно сложны. Больше чем в случае других животных применяемые возможности и методы клинического наблюдения и диагностики зависят от сезонных условий. В основном, это осложняется в регионах со снижением вывода расплода в определенное время года, обычно зимой, и ограниченным во времени производством продуктов пчеловодства. Что касается обработки лекарственными препаратами и применения методов химической дезинфекции, следует всегда учитывать производство меда, т.к. данные обработки могут контаминировать продукты пчеловодства, например, мед, воск и пыльцу.

При отборе проб в колонии пчел для диагностики болезней, отбор проб мертвых пчел, если таковые имеются внутри или вне улья, может наилучшим образом отражать состояние здоровья колонии. Если производится отбор живых пчел, их сначала следует умертвить диэтиловым эфиром или глубокой заморозкой (-20°C) в течение ночи. Пчел можно также умертвить погружением в 70% этиловый спирт, например, при отборе проб для диагностики акариоза (Ascarapis). При исследовании на болезни расплода следует приготавливать мазки из личинок и куколок, или можно направить в лабораторию часть соты с расплодом, демонстрирующим видимые признаки болезни. Медоносные пчелы восприимчивы к болезням, вызываемым паразитами, грибами, бактериями и вирусами. На

колонии медоносных пчел могут также воздействовать различные вредители, хищники и нежелательные факторы окружающей среды.

*

* *

ГЛАВА 2.2.1.

АКАРОПИДОЗ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ (ИНФЕСТАЦИЯ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ *ACARAPIS WOODI*)

РЕЗЮМЕ

Акаропидоз или акариоз или клещевая болезнь – это болезнь взрослых пчел Apis mellifera L. и других видов Apis. Он вызывается Тарзонемидным клещом, известным как трахеальный клещ, Acarapis woodi (Rennie). Размер клеща около 150 мкм, он является внутренним паразитом дыхательной системы, который живет и размножается, в основном, в проторакальной трахее пчел. Иногда их также можно обнаружить в голове, грудном и брюшном воздушных мешках. Клещи питаются гемалимфой своего хозяина.

Патогенные воздействия, выявляемые у инфицированных пчел, зависят от количества паразитов в трахее и обусловлены как механическими повреждениями, так и физиологическими расстройствами вследствие преграждения воздушных каналов, поражений стенок трахеи и истощения гемалимфы. Так как популяция паразитов растет, стенки трахеи, в обычном состоянии белые и прозрачные, становятся мутными, с черными пятнами, вероятно, вследствие меланиновых корок.

Смертность может варьироваться от умеренной до высокой. Первые проявления инфекции обычно проходят незамеченными, и только когда инфекция становится сильной, она становится видимой. Обычно это происходит ранней весной. Инфекция передается при прямом контакте. Как правило, восприимчивы только новорожденные пчелы в возрасте до 10 суток. Репродукция происходит в трахее взрослых пчел, где самки клеща могут отложить 8-20 яиц. Самок в 2-4 раза больше, чем самцов. Самцы развиваются в течение 11-12 дней, самки – 14-15 дней.

Идентификация возбудителя: *Паразиты выявляются только лабораторными методами и под микроскопом. Клещей следует наблюдать в трахеях или удалять из них для исследования под микроскопом. Для выявления клещей используется несколько методов, такие как препарирование, размалывание и окрашивание.*

Проводится рассечение грудных отделов пчел, и извлекаются трахеи. Каждую трахею изучают под препаровальной лупой (x18-20); клещи видны через прозрачную стенку в виде небольших овальных телец.

При другом подходе более крупные образцы пчел с подозрением можно перемолоть и гомогенизировать в воде с последующей грубой фильтрацией суспензии и центрифугированием. Осадок обрабатывают неразведенной молочной кислотой в течение 10 минут. Затем его фиксируют для исследования под микроскопом.

Паразитов можно окрашивать гистологическим методом, чтобы рассмотреть их в трахее пчелы. Трахеи отделяют, очищают 8% гидроокисью калия и окрашивают 1% метиловым синим. Это наилучший метод в случае большого количества образцов.

Серологические тесты: *Серологические тесты отсутствуют.*

Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам: Биологические препараты отсутствуют. Уровень клещей позволяет держать под контролем кристаллический ментол или масляные лепешки с растительным маслом (не с животным жиром) и белый сахарный песок.

А. ВВЕДЕНИЕ

Акаропидоз – это болезнь взрослых пчел *Apis mellifera* L. и других видов *Apis*. Он вызывается Тарзонемидным клещом, *Acarapis woodi* (Rennie). Размер клеща около 150 мкм, он является внутренним паразитом дыхательной системы (Рисунок 1). Эти трахеальные клещи проникают, живут и размножаются, в основном, в проторакальной трахее всех пчел, питаясь гемалимфой своих хозяев (Рисунок 2). Иногда их также можно обнаружить в голове, грудном и брюшном воздушных мешках (Giordani, 1965; Wilson *et al.*, 1997).

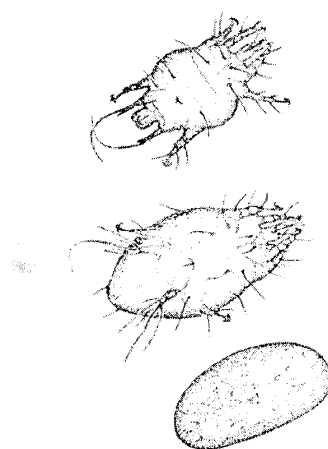


Рис. 1. *Acarapis woodi* (Rennie). Верх: взрослый самец; в центре: взрослая самка; внизу: яйцо.

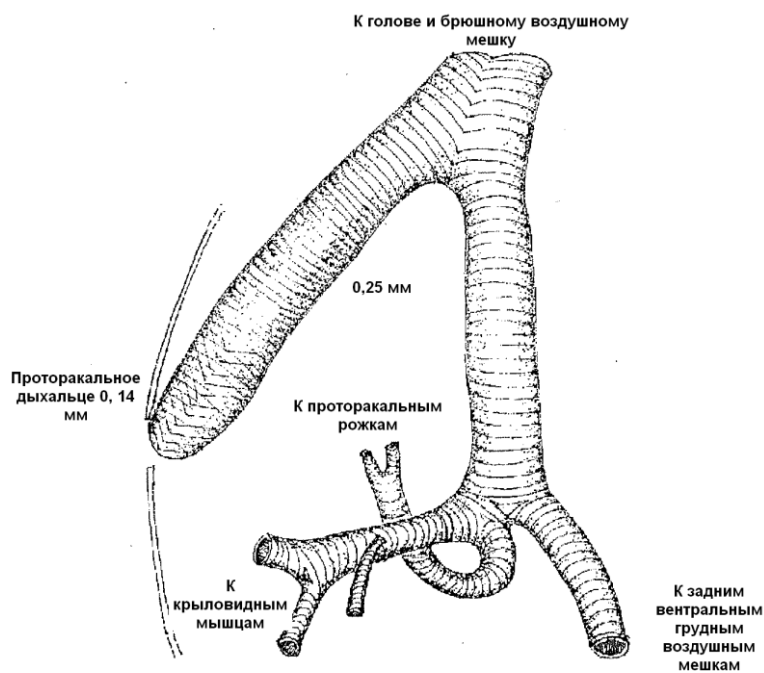


Рис. 2. Главная грудная трахея медоносной пчелы, где обычно выявляют *Acarapis*; небольшое заражение наблюдается около отверстия дыхальца

Патогенные воздействия у отдельных пчел, зависят от количества паразитов в трахее и обусловлены как механическими повреждениями, так и физиологическими расстройствами вследствие преграждения воздушных каналов, поражений стенок трахеи и истощения гемолимфы. Так как популяция паразитов растет, стенки трахеи, в обычном состоянии белые и прозрачные, становятся мутными, с черными пятнами, вероятно, вследствие меланиновых корок (Giordani, 1964).

Смертность может варьироваться от умеренной до высокой. Первые проявления инфекции обычно проходят незамеченными, за исключением случаев уменьшения размера колонии. Только когда инфекция становится сильной, она становится видимой. Обычно это происходит ранней весной, после периода зимнего клуба, когда клещи вывелись, и количество их беспрепятственно увеличилось у долгоживущих зимних пчел. В основном, это относится к Северному полушарию, где присутствуют сезонные различия репродукции пчел.

Инфекция передается от одной пчелы к другой при прямом контакте. Как правило, восприимчивы только новорожденные пчелы в возрасте до 10 суток. Попытки вывести *A. woodi* на искусственном и синтетическом рационе не принесли успеха, но их культивирование на незрелых стадиях самой медоносной пчелы было частично успешно (7). Время жизни клещей в мертвой пчеле составляет около 1 недели. Репродукция происходит в трахее взрослых птиц, где самки клеща могут отложить 8-20 яиц. Самок в 2-4 раза больше, чем самцов; самцы развиваются в течение 11-12 дней, самки – 14-15 дней.

Отсутствуют надежные клинические признаки для диагностики акаропидоза, т.к. признаки инфекции не специфичны, и пчелы ведут себя также как и пчелы, пораженные другими болезнями или расстройствами. Они ползают перед ульем и залезают по стеблям травы в попытке взлететь. Может наблюдаться дизентерия.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

1. Идентификация возбудителя

Акаропидоз может быть выявлен только в лаборатории с использованием микроскопии или твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Отсутствует надежный метод выявления очень низких уровней инфекции. Количество отобранных пчел определяет пороговые значения метода. Показано, что степень заражения 1-2% может быть выявлена при отбор 50 проб и наличии последовательного набора данных об отборе проб (Frazier *et al.*, 2000; Tomasko *et al.*, 1993). Наилучшее время для отбора проб – ранняя весна или поздняя осень (Северное полушарие), когда высока численность популяции *Acarapis*. Визуализацию клещей легче проводить на взрослых пчелах, у которых больше клещей. Можно использовать пробы маток, трутней или рабочих пчел, но *Acarapis* предпочитают трутней.

1.1. Препарирование (Giordani, 1974)

Проба, состоящая из 50 пчел (см. выше) отбирается случайным образом в колонии с подозрением на болезнь. В основном ее составляют пчелы, ползающие или не могущие летать, обнаруженные в пределах 3 метров от передней части улья. Предпочтительно отбирать случайным образом в пределах колонии. Пчелы могут быть живые, умирающие или мертвые. Живых пчел следует сначала умертвить этиловым спиртом или глубокой заморозкой (-20°C); пчелы не должны быть мертвы больше 2-3 дней, если их не хранили

при температуре 4°C до 4 недель или при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Их можно хранить бесконечно долго в консервирующем составе, например, в растворе Oudemann: ледяная уксусная кислота (80 мл); глицерин (50 мл); 70% этанола (870 мл).

1.1.1. Процедура тестирования: прямое препарирование (Ritter, 1996; Wilson *et al.*, 1997)

- i) Удалить брюшко и грудной отдел пчел (см. рисунок 3).
- ii) Подцепить грудной отдел с основанием головы и исследовать под бинокулярной лупой при 20-30- кратном увеличении.
- iii) Микропинцетом удалить плевральный склерит первого грудного сегмента с первой парой ног. В округлом отверстии можно увидеть основное направление грудной трахеи и ответвления головной трахеи.
- iv) Посредством тонкого микропинцета удалить торакальную спинную пластинку и часть второй торакальной спинной пластинки. После удаления налегающей мускулатуры вынуть две грудные трахеи. О положительном диагнозе говорит либо четко видимое в трахее наличие черного пигмента в одной или в обеих трахеях или, при небольшом заражении, наличие овальных просвечивающих телец (яйца и т.д.).
- v) Для последующих исследований через микроскоп (например, подтверждение легкого заражения) удалить трахеи и поместить их на предметное стекло с каплей воды. Под микроскопом со 100-кратным увеличением можно распознать взрослых клещей и отдельные стадии их развития.

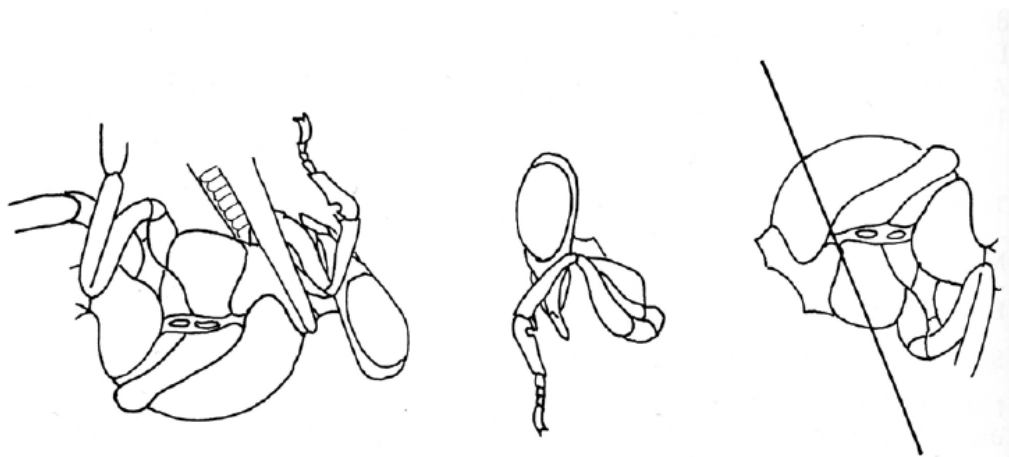


Рис. 3. Препарирование пчел для выявления *Acarpis woodi* в первой трахеальной паре трахеи.

1.1.2. Процедура исследования: размягчение (Ritter, 1996)

- (i) Положить пчел на спинку и закрепить или придерживать большим и указательным пальцами.
- (ii) Используя малый пинцет удалить голову и передние лапки, а также удалить окружающую шейное отверстие переднегрудь, чтобы открыть трахею (рисунок 4). Проверить трахею около дыхальца (т.к. клещи проникают через дыхальце) на предмет небольших заражений. От застарелых и тяжелых заражений трахея становится коричневой или черной.

- (iii) Острой бритвой рассечь грудь от средней пары ног до передних крыльев. Эти тонкие диски впоследствии можно обработать для очистки мышечной ткани.
- (iv) Размягчить либо при умеренном нагревании в 8% растворе гидроксида калия в течение около 20 минут, либо оставив на ночь без нагревания.
- (v) Исследовать первую пару трахей, которая покрыта мышечной тканью, под препаровальной лупой при увеличении $\times 18-20$, или перенести трахеи на другое предметное стекло, добавить глицерин или воду и рассматривать при большем увеличении.
- (vi) Через прозрачную стенку клещи хорошо видны в виде небольших, овальных телец.

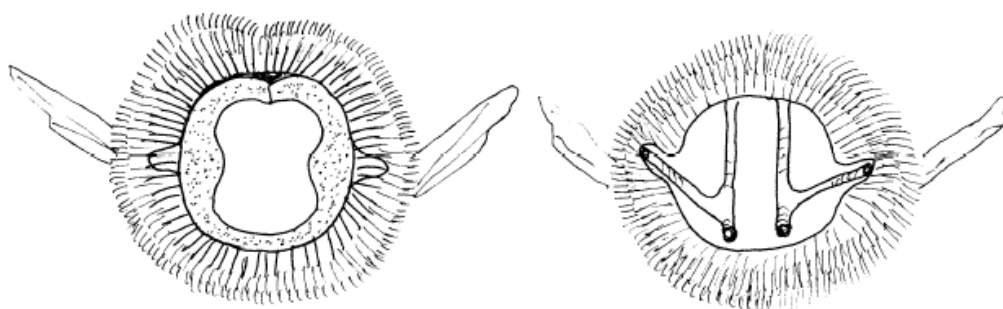


Рис. 4. Слева: вид спереди: грудь пчелы с удаленной головой и неудаленной переднегрудью.

Справа: Переднегрудь удалена и трахеи выведены в отверстие дыхальца.

Это самый простой и самый надежный метод лабораторной диагностики акарапидоза, который позволяет выявлять заражение на ранней стадии и устанавливать степень заражения. В ходе данного метода, используя препаровальную лупу, можно выявить даже легкие заражения. Только в очень исключительных случаях будет необходимо задействовать большее увеличение для постановки диагноза. Однако это трудоемкий метод, особенно когда нужно поставить больше количество диагнозов акарапидоза. Если необходимо провести дифференциацию между сильно зараженными или незараженными колониями, препарирование можно завершить на п. ii и рассмотреть цвет трахей.

1.2. Измельчение (Colin et al., 1979)

В колонии с подозрением случайным образом отбирают образец, состоящий из 200 пчел. Крылья и ножки каждой пчелы отделяют от грудного отдела, а тельца складывают в 100 мл контейнер, на одну четверть заполненный водой. Данную суспензию гомогенизируют трижды, каждый раз по несколько секунд, в гомогенизаторе при 10 000 об/мин с добавлением воды. Полученную суспензию пропускают через сито (ячейка сита 0,8 мм), а сито промывают водой до получения конечного объема около 50 мл. Фильтрат центрифугируют при 1500 g в течение 5 минут, надосадочную жидкость отбраковывают. Несколько капель неразведенной молочной кислоты добавляют в дебрис осадка, который должен содержать клещей. Оставляют на 10 минут для разрушения мышечных волокон, а затем закрепляют под покровным стеклом для исследования под микроскопом. Данный метод более быстрый, чем препарирование, но он может быть менее точным. Внешние клещи *A. externus*, *A. vagans* и *A. dorsalis*, которые морфологически схожи с *A. woodi*, зачастую обнаруживают на грудном отделе здоровых пчел, и их можно ошибочно принять за *A. woodi* (Таблица 1). Однако существует вероятность, что они не представляют какой-либо серьезной угрозы для пчел или пчеловодства. Следовательно, данный метод следует

использовать, только если необходима грубая оценка степени заражения в регионе. Он не подходит для определения первой вспышки.

Таблица 1. Дифференциальная диагностика видов *Acarapis* (Ritter, 1996)

Характеристика	A.dorsalis	A.externus	A.woodi
Выемка на коксальной пластине	Глубокая	Короткая	Плоская
Пространство между стигмами	16,7 мкм	16,8 мкм	13,9 мкм
Длина предплюсного сустава	7,6 мкм	11,4 мкм	7,5 мкм

1.3. Окрашивание (Peng & Nsar, 1985)

Клещей и трахею можно специфично окрашивать, делая их видимыми под микроскопом.

1.3.1. Процедура исследования 1

- (i) Удалить голову и передние лапки.
- (ii) Сделать поперечный разрез через мембранные зоны позади лапок.
- (iii) Сделать второй поперечный разрез перед средней парой лапок в основании передних крыльев.
- (iv) Приготовить срезы (1-1,5 мм толщиной), пометить их в 8% раствор гидроокиси калия.
- (v) Аккуратно перемешать и нагревать почти до кипения в течение 10 минут, пока мягкие внутренние ткани не растворятся и не станут прозрачными, и пока не останутся хитиновые ткани.
- (vi) Восстановить срезы посредством фильтрации и промывки водопроводной водой.
- (vii) Окрасить и закрепить срезы.
- (viii) Исследовать на наличие клещей через микроскоп с малым увеличением.

Перманентные предметные стекла готовят с использованием обычных гистологических методов.

Катионные красители наиболее подходящие и специфичные, т.к. они сильно окрашивают клещей, но трахеи окрашивают слабо. Раствор 1% водного метиленового синего наиболее подходящий, он подготовлен посредством растворения метиленового синего и последующего добавления хлорида натрия до получения 0,85% раствора NaCl.

1.3.2. Процедура исследования 2

- (i) Провести окрашивание в 1% водном метиленовом синем.
- (ii) Провести дифференциацию срезов в дистиллированной воде в течение 2-5 минут.

(iii)Промыть срезы в 70% спирте.

При хранении в 95% этаноле клещи будут сохранять окраску в течение 6 часов (Bancroft & Stevens, 1982). В данном методе обязательно правильно размочить ткани в растворе гидроокиси калия. Используя данный метод, можно быстро и удобно обработать большое количество образцов.

1.4. Твердофазный иммуноферментный анализ

Разработан ИФА для трахеальных клещей (Grant et al., 1993; Ragsdale & Furgala, 1987; Ragsdale & Kjer, 1989). Данный тест может давать ложноположительные результаты, и, следовательно, он рекомендуется только для обзорных исследований. Еще одним методом является визуализация гуанина, азотосодержащих продуктов жизнедеятельности клещей (Mozes-Koch & Gerson, 1997).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

Биологические препараты отсутствуют. Кристаллический ментол (50 г на двухъярусный улей) позволяет контролировать клещей, если оставить его в улье на 28 дней, при условии, что температура окружающей среды составляет 18°C. Оптимальный диапазон температур для функционирования паров составляет 27-29°C. Небольшие лепешки с растительным комбижиром (например, маргарин, но не животный жир) и белый сахарный песок позволят держать количество клещей на уровне 10%. Лепешку (массой около 100 г) следует положить на верхние перекладки рамы гнездовой секции осенью и весной (Sammataro & Needham, 1996). Для обработки зараженных колоний может быть использована муравьиная кислота (Hood & McCreadie, 2001).

Некоторые расы пчел, например, бакфастские пчелы (Brother, 1968), и некоторые виды пчел-санитаров, менее восприимчивы к заражению *Acarapis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. BANCROFT J.D. & STEVENS A. (1982). Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.
2. BROTHER A. (1968). 'Isle of Wight' or acarine disease: its historical and practical aspects. *Bee World*, **49**, 6–18.
3. COLIN M.A., FAUCON J.P., GIANFERT A. & SARRAZIN C. (1979). A new technique for the diagnosis of Acarine infestation in honey bees. *J. Apic. Res.*, **18**, 222–224.
4. FRAZIER M.T., FINLEY J., HARKNESS W. & RAJOTTE E.G. (2000). A sequential sampling scheme for detecting infestation levels of tracheal mites (Heterostigmata: Tarsonemidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Economic Entomol.*, **93** (3), 551.
5. GIORDANI G. (1964). Recherches au laboratoire sur *Acarapis woodi* (Rennie), agent de l'acariose des abeilles (*Apis mellifera* L.). Note 3. *Bull. Apic.*, **7**, 43–60.

6. GIORDANI G. (1965). Recherches au laboratoire sur *Acarapis woodi* (Rennie), agent de l'acariose des abeilles (*Apis mellifera* L.). Note 4. *Bull. Apic.*, **8**, 159–176.
7. GIORDANI G. (1970). Ricerche di laboratorio su *Acarapis woodi* (Rennie), agente dell'acarosi delle api mellifiche (*Apis mellifera* L.) Nota 6. *Ann. Acc. Naz. Agric.*, **90**, 69–76.
8. GIORDANI G. (1974). Méthodes de diagnostic des maladies des abeilles adultes. Diagnostic de l'acariose. *Bull. Apic.*, **17**.
9. GRANT G., NELSON D., OLSEN P. & RICE W.A. (1993). The ELISA detection of tracheal mites in whole honey bee samples. *Am. Bee J.*, **133**, 652–655.
10. HOOD W.M. & MCCREADIE J.W. (2001). Field tests of the Varroa Treatment Device using formic acid to control Varroa destructor and *Acarapis woodi*. *J. Agric. Urban Entomol.*, **18** (2), 87. *Chapter 2.2.1. - Acarapisosis of honey bees* 394 OIE *Terrestrial Manual* 2008
11. PENG Y. & NASR M.E. (1985). Detection of honey bee tracheal mites (*Acarapis woodi*) by simple staining techniques. *J. Invertebr. Pathol.*, **46**, 325–331.
12. MOZES-KOCH R. & GERSON U. (1997). Guanine visualization, a new method for diagnosing tracheal mite infestation of honey bees. *Apidologie*, **28**, 3–9.
13. RAGSDALE D. & FURGALA B. (1987). A serological approach to the detection of *Acarapis woodi* parasitism in honey bees using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Apidologie*, **18**, 1–10.
14. RAGSDALE D. & KJER K.M. (1989). Diagnosis of tracheal mite (*Acarapis woodi* Rennie) parasitism of honey bees using a monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Bee J.*, **129**, 550–553.
15. RITTER W. (1996). Diagnostik und Bekämpfung der Bienenkrankheiten (Diagnosis and control of bee diseases). Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Germany.
16. SAMMATARO D. & NEEDHAM G.R. (1996). Host-seeking behaviour of tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **20**, 121–136.
17. TOMASKO M., FINLEY J., HARKNESS W. & RAJOTTE E. (1993). A sequential sampling scheme for detecting the presence of tracheal mite (*Acarapis woodi*) infestations in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Penn. State Agric. Exp. Stn Bull.*, 871.
18. WILSON W.T., PETTIS J.S, HENDERSON C.E. & MORSE R.A. (1997). Tracheal mites. *In: Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, Third Edition. AI Root publishing, Medina, Ohio, USA, pp 255–277.

*

* *

NB: Функционируют Референтные лаборатории МЭБ по болезням пчел (См. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или получите обновленный список на веб-сайте МЭБ: www.oie.int).