

ГЛАВА 3.2.2.

АМЕРИКАНСКИЙ ГНИЛЕЦ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ (ИНФЕКЦИЯ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ *PAENIBACILLUS LARVAE*)

РЕЗЮМЕ

*Описание болезни: Американский гнилец пчел поражает личиночную стадию медоносной пчелы *Apis mellifera* и других *Apis* spp., и наблюдается во всем мире. *Paenibacillus larvae*, организм-возбудитель, это бактерия, которая может продуцировать более одного миллиарда спор в каждой инфицированной личинке. Споры чрезвычайно резистентны к воздействию температур и химических веществ и могут выживать в течение многих лет в корочках (от заболевшего и погибшего расплода), продукции пчеловодства и оборудовании. Только споры способны индуцировать заболевание.*

Соты инфицированных семей имеют пеструю окраску вследствие комбинации здорового запечатанного расплода, незапечатанных ячеек с остатками погибших личинок и пустых ячеек. Это является характерной чертой не только американского гнильца пчел. Крышечки ячеек заболевших личинок кажутся влажными и потемневшими, с прогрессированием инфекции становятся вдавленными и иногда продырявленными. Цвет личинки или куколки меняется на кремово-коричневый, а затем на темно-коричневый, становясь тягучими при высыхании. В некоторых случаях остатки личинок остаются довольно водянистыми. Заболевший расплод в итоге высыхает и формирует характерные хрупкие корочки, которые крепко прилипают к нижним стенкам ячейки. Формирование язычка куколки один из наиболее характерных, но редких признаков болезни, который предшествует формированию корочки. Клинические признаки американского гнильца пчел очень разнообразны и зависят от вовлеченного генотипа, стадии болезни и выносливости пчелиной колонии (и возможно ее резистентности к американскому гнильцу пчел). Все генотипы ERIC I-IV патогенны для медоносных пчел.

Идентификация возбудителя: *Диагностика американского гнильца пчел основана на идентификации патогенного возбудителя и наличии клинических признаков. Работник, осуществляющий исследования, может использовать множество различных типов проб. Однако на практике выбор отбираемых проб будет зависеть от того, касается ли это заболевшей семьи медоносных пчел/пасечного хозяйства или вызывающих подозрение на болезнь, или исследования в контексте программы мониторинга/профилактики американского гнильца пчел. Некоторые из способов идентификации требуют предварительного этапа культивирования, в то время как другие можно проводить непосредственно на отобранных пробах. Рекомендуются четыре твердых питательных среды: PLA (*Paenibacillus larvae* агар), MYPGP агар, ВНИТ агар и агар на основе крови овцы колумбийской породы. Два протокола проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) описаны в этой главе и могут использоваться для экспресс подтверждения клинического американского гнильца пчел и для идентификации бактериальных колоний после этапа культивирования. Биохимический анализ *P. larvae* основан на каталазном тесте, продуцировании кислоты из углеводов и гидролизе казеина, в зависимости от вовлеченного генотипа. Далее описываются методы, основанные на определении антител и микроскопическая идентификация патогенного возбудителя.*

Серологические тестирования: Серологические тестирования не применяются.

Требования к вакцинам: Вакцин не существует.

А. ВВЕДЕНИЕ

Американский гнилец пчел – инфекционное заболевание личиночной стадии медоносной пчелы *Apis mellifera* и других *Apis spp.*, и наблюдается во всех регионах мира, где содержат пчел такого вида. *Paenibacillus larvae*, организм-возбудитель, это грамположительная бактерия, которая может продуцировать более одного миллиарда спор в каждой инфицированной личинке. Бактерия представляет собой округлую прямую, иногда изогнутую палочку с закругленными концами, со значительными вариациями в размере (0,5 мкм шириной и от 1,5 до 6 мкм длиной), возникающую отдельно, а также в цепочках или нитях; некоторые штаммы подвижны. Спорангии часто проникают *in vitro*, а овальные, центрально или термально расположенные споры, которые могут увеличиться до спорангия, часто обнаруживаются свободными, размером 0,6 x 1,3 мкм (Heyndrickx *et al.*, 1996).

Посредством повторяющейся элементной полимеразной цепной реакции (гер-ПЦР) и праймеров ERIC1R-ERIC2, можно различить четыре различных генотипа (ERIC I, II, III и IV) (Genersch *et al.*, 2006). Генотипы ERIC I и II соответствуют бывшим подвидам *P. I. larvae*, в то время как генотипы ERIC III и IV соответствуют бывшим подвидам *P. I. pulvifaciens* (Genersch, 2010). Все четыре генотипа различны в морфологии колоний и спор, в своем метаболизме источника углерода, и самое главное в вирулентности. Биопробы с подверганием воздействию возбудителя обнаружили, что генотипы ERIC II, III и IV высоковирулентны в отношении личинок в плане временной динамики смертности. Все личинки, инфицированные этими генотипами, погибают в течение приблизительно 7 дней (Genersch *et al.*, 2005, 2006). Это означает, что только малый процент личинок погибает после запечатывания ячеек, приводя к описываемым клиническим признакам американского гнильца пчел (вязкость, корочка, вызванная гнильцом). В противоположность генотипу ERIC I необходимо около 12 дней, чтобы убить всех инфицированных личинок и, тем самым он считается менее вирулентным, чем ERIC II, III и IV для отдельных личинок (Genersch *et al.*, 2005, 2006; Genersch, 2010; Djukic *et al.*, 2014). Эпидемиологические исследования продемонстрировали, что только ERIC I и ERIC II часто выделяют из пчелиных семей, пораженных американским гнильцом. *Paenibacillus larvae*, генотип ERIC I - наиболее часто встречающийся генотип, в то время как генотип ERIC II является, по-видимому, менее распространенным, несмотря на то, что оба генотипа регистрируются по всему миру. Генотипы ERIC III и IV не идентифицировались в поле десятилетиями, но существуют как отдельные изоляты в коллекциях культур (Genersch, 2010; De Graaf *et al.*, 2013). Так как профили метода идентификационных отпечатков, полученные с помощью электрофореза ДНК, амплифицированной гер-ПЦР, не всегда воспроизводимы между разными лабораториями, необходимо включить эталонные штаммы *P. larvae*, типированные в прошлом. С целью повышения уровня различия между штаммами исследование с помощью праймеров ERIC можно дополнить применением других праймеров (De Graaf *et al.*, 2013). Схема мультилокусного типирования последовательностей выявила распределение и биогеографию 294 проб *P. larvae* на шести континентах (Morrissette *et al.*, 2015).

Споры чрезвычайно устойчивы к воздействию тепла и резистентны к химическим веществам. Только споры способны индуцировать болезнь. Инфекция может передаваться личинкам пчелами-кормилицами или спорами, остающимися в основании расплодной ячейки. Несмотря на то, что личиночные стадии рабочих пчел, трутней и маток

восприимчивы к инфекции, инфицированные личинки маток и трутней редко встречаются в естественных условиях. Восприимчивость личинок к американскому гнильцу увеличивается с возрастом (Woodrow, 1941); личинки не могут заразиться позднее 53 часов после выведения из яйца. Средняя инфицирующая доза (LD_{50} = количество спор, при котором погибают 50% личинок), необходимая для возникновения инфекции, хотя цифры варьируют, равна $8,49 \pm 1,49$ спор в личинке пчелы в возрасте 24-48 часов (Hansen & Brødsgaard, 1999). Обмен сотами, с остатками заболевшего расплода, является основным способом распространения болезни от колонии к колонии. К тому же кормление или воровство зараженного спорами меда или перги, пакетных пчел и введение маток из инфицированных колоний, также может способствовать распространению заболевания. Воск, контаминированный спорами *P. larvae*, используемый для производства искусственных воцин, также может содействовать распространению болезни. Раннее выявление американского гнильца помогает предотвратить дальнейшее распространение.

Несмотря на то, что в целом риск заражения человека организмами американского гнильца пчел довольно низок, следует отметить, что у наркоманов, вколовших себе мед, контаминированный спорами *P. larvae* (Rieg *et al.*, 2010), регистрировалась смертельная бактериальная септицемия. Меры биосдерживания следует определять на основе анализа риска, как описано в Главе 1.1.4 Биозащита и биобезопасность: Стандарт управления биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и виварии.

1. Эпизоотология и клинические признаки

Споры *P. larvae* могут выживать в продуктах пчеловодства (мед, воск, мертвые личинки) и в окружающей среде в течение 3 – 10 лет, и в течение 35 лет в высохших личиночных корочках (Haseman, 1961). Очищенные споры могут выживать в течение даже более 70 лет (Rudenko, 1987).

Клинические признаки американского гнильца очень многообразны и зависят от задействованного генотипа, стадии заболевания и выносливости пчелиной семьи (и возможно ее резистентности к американскому гнильцу) (Genersch *et al.*, 2005). Личинки могут погибать быстро в раннем возрасте, когда они скручиваются в основании незапечатанных расплодных ячеек. Взрослые рабочие пчелы удаляют этих мертвых личинок, оставляя только пустую ячейку (Brødsgaard *et al.*, 2000). Другие личинки погибают позднее в процессе своего развития, когда они находятся в вертикальном положении, заполняя большую часть расплодной ячейки. Часто личинки или куколки погибают после запечатывания расплодной ячейки.

В тяжело пораженных семьях соты имеют пеструю окраску вследствие комбинации здорового печатного расплода, незапечатанных ячеек с остатками погибших личинок и пустых ячеек. Крышечки ячеек, в которых находятся заболевшие личинки, кажутся влажными и потемневшими, с прогрессированием инфекции становятся вдавленными и иногда продырявленными (Рисунок 1а). Также цвет личинки или куколки меняется на кремово-коричневый, и в итоге на темно-коричневый. Личинка может стать вязкой по консистенции, и ее можно вытянуть в нити при введении пробоотборника в остатки личинки и ее удалении из ячейки (тест спичкой) (Рисунок 1б). Это возможно является самым известным методом полевой диагностики заболевания, но в некоторых случаях остатки личинки довольно водянистые, что приводит к отрицательным результатам в тесте спичкой. В итоге через месяц или более, после того, как личинки становятся тягучими, остатки заболевшего расплода высыхают и образуют типичные твердые, темные хрупкие корочки, которые прочно прикрепляются к доньшку ячейки (Рисунок 1.д

в 2). Выступающий язычок – один из наиболее характерных признаков заболевания, несмотря на редкость наблюдения (Рисунок 1с). Язычок может оставаться только на высохшей корочке. При проведении дифференциальной диагностики следует учитывать и Европейский гнилец пчел.

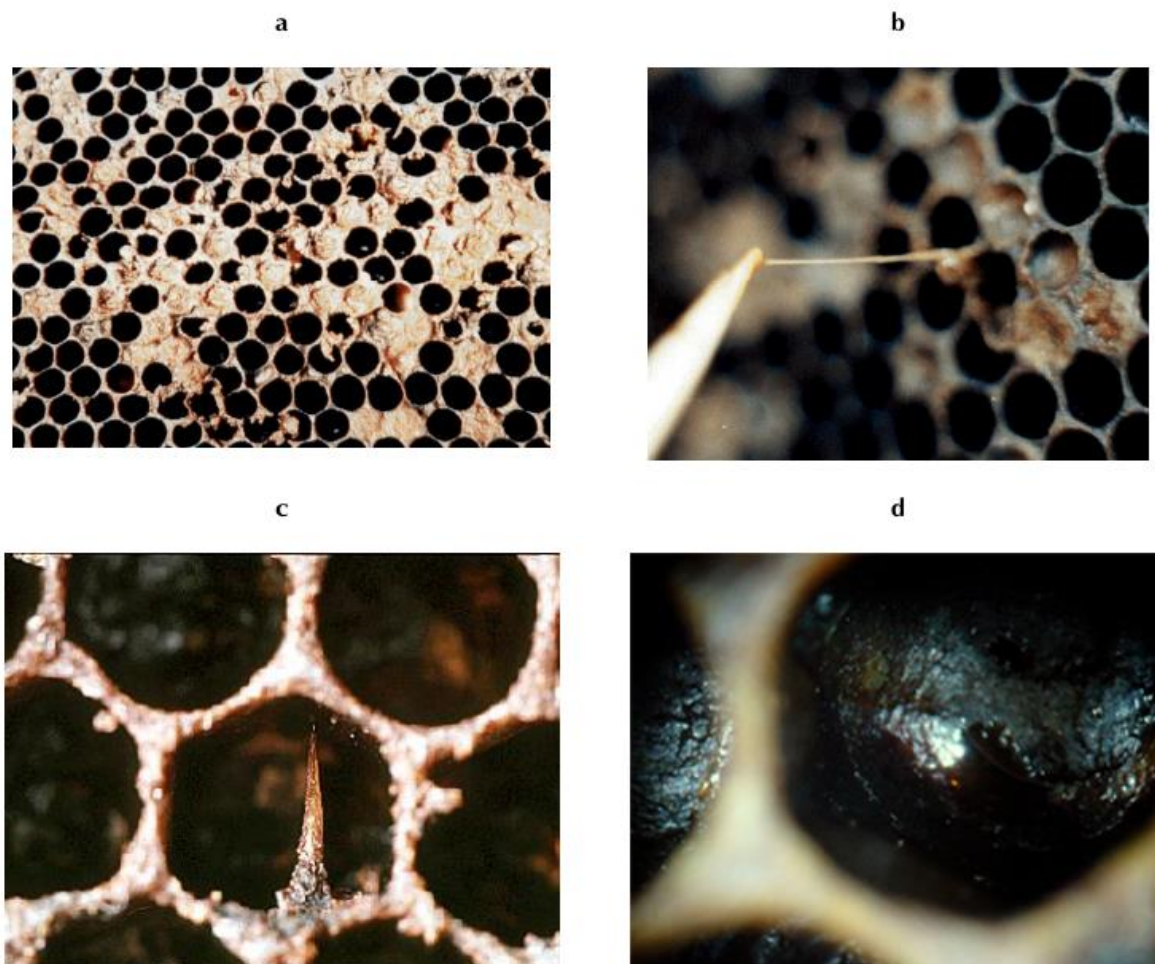


Рис. 1. Клинический американский гнилец пчел (a – d): (a) Соты имеют пестрый вид. (b) Спичка вытягивает коричневые, полужидкие остатки в тягучую нить. (c) Образование язычка куколки является очень характерный признаком, но наблюдается редко. (d) Остатки корочки, прилипшей к доньшку ячейки. Фотографии a, b и d получены от: А.М. Alippi; фотография (c) от: MAAREC-Mid Atlantic Apiculture and Extension Consortium (на <https://agdev.anr.udel.edu/maarec/honey-bee-biology/honey-bee-parasites-pests-predators-and-diseases/diseases-of-honey-bees/nggallery/show--photocrati->

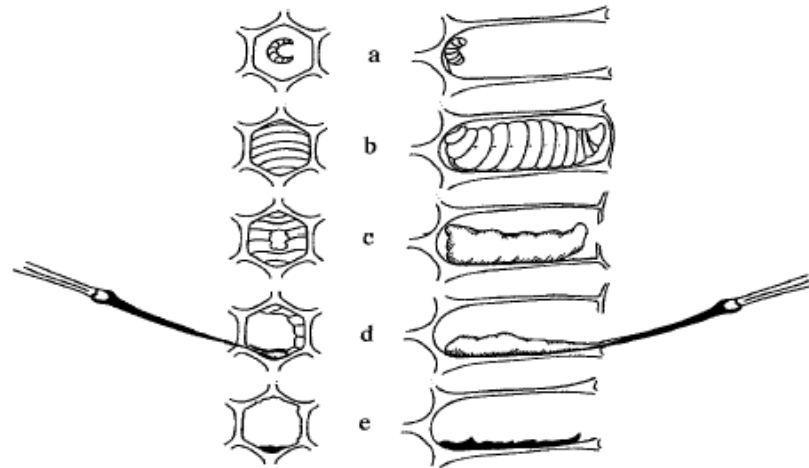


Рис.2. Прогрессирование болезни: (a) Момент инфицирования. (b) Развитие личинки до стадии предкуколки. (c) Содержимое ячейки усыхает, а крышечка вдавлена внутрь или продырявлена. (d) Содержимое ячейки становится вязким. (e) Остающаяся корочка крепко прилипает ко дну ячейки.

Было продемонстрировано, что различные генотипы различаются по вирулентности; штаммы ERIC I ведут к 100% смертности инфицированных личинок в течение 12 дней, в то время как штаммы ERIC II убивают инфицированные ячейки в течение около 7 дней (Djukic *et al.*, 2014; Genersch, 2010; Genersch *et al.*, 2005;). Чем быстрее *P. larvae* убивает инфицированные личинки, тем больше инфицированных личинок будет удалено, так как пчелы-кормилицы, по-видимому, распознают мертвые личинки в меньших количествах после запечатывания ячеек (Rauch *et al.*, 2009). Поэтому соотношение личинок, превращающихся в тягучую массу под крышками ячеек выше в отношении инфекций со штаммами генотипа ERIC I. Так как ветеринары и пчеловоды ищут тягучую массу внутри запечатанных ячеек, как основного признака болезни, возможна постановка ложноотрицательных диагнозов, если семьи, пораженные американским гнильцом пчел, инфицированы штаммами генотипа ERIC II, так как может присутствовать лишь малое количество инфицированных ячеек (Genersch, 2007; Rauch *et al.*, 2009).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследования, доступные для диагностики американского гнильца пчел и их назначение

Метод	Назначение					
	Благополучие популяции по инфекции	Индивидуальное благополучие животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегию искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Бактериальное выделение	+++	+++	+++	+++	+++	н/д

¹ Рекомендуется комбинация методов идентификации возбудителя, применяемых на одном и том же клиническом образце.

Микроскопия	++	++	++	+++	+++	н/д
Выявление антигена	++	++	++	++	++	н/д
Традиционная ПЦР	+++	+++	+++	+++	+++	н/д
ПЦР в реальном времени	+++	+++	+++	+++	+++	н/д
Масс спектрометрия	н/д	н/д	н/д	++	н/д	н/д

Объяснение: +++ = рекомендуемый метод, валидированный для данной цели; ++ = подходящий метод, но может требовать дополнительной валидации; + = может использоваться в некоторых ситуациях, но затраты, надежность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для этих целей; н/д = назначение не применимо. ПЦР = полимеразная цепная реакция.

1. Идентификация возбудителя

Диагностика американского гнильца пчел основана на идентификации патогенного возбудителя и наличия клинических признаков. Работник, осуществляющий исследования, может использовать множество различных типов проб. Однако на практике выбор отбираемых проб будет зависеть от того, касается ли это заболевшей семьи медоносных пчел/пасечного хозяйства или вызывающей подозрение на болезнь, или исследования в контексте программы мониторинга/профилактики американского гнильца пчел. Общее описание клинических признаков болезни приведено в разделе А этой главы. Методы идентификации включают микробиологическую характеристику, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), биохимическое профилирование, методы, основанные на определении антител, и микроскопию. Работник, осуществляющий исследования, должен знать о различиях в чувствительности между представленными подходами и должны выбрать наиболее подходящий подход для данной ситуации.

1.1. Выбор проб

1.1.1. Отбор проб от подозрительной/заболевшей колонии/пчелиного хозяйства

При содержании пчелиных семей владельцы часто обнаруживают расплодные соты с признаками болезни. В этом случае следует брать расплод для диагностики. Если можно, следует представить целую рамку в лабораторию, во избежание риска искажения результатов из-за транспортировки. Альтернативным образом, пробы расплода отбираются посредством отрезания части соты размером около 20 см², содержащей как можно больше мертвого или обесцвеченного расплода. Опытный специалист может взять пробы инфицированных остатков личинок/куколок непосредственно из ячеек стерильным тампоном, что значительно сокращает размер пробы и облегчает упаковку и транспортировку пробы в лабораторию (см. ниже). Если выбирается исследование микроскопом, то мазки остатков заболевших личинок также можно сделать в пасечном хозяйстве (Hornitzky & Wilson, 1989). После высыхания на воздухе отпечатки упаковывают и передают в лабораторию для микроскопического исследования и культивирования.

Каждую пчелиную семью по соседству с таким клиническим случаем американского гнильца пчел следует считать подозрительной, и для подтверждения следует отобрать большое количество проб. Помимо проб расплода для выявления наличия спор *P. larvae* можно использовать продуктовые магазины (мед [Ritter & Kiefer, 1995; von der Ohe & Dustmann, 1997], пыльца [Gochnauer & Corner, 1987] и маточное молочко), взрослые работники (Lindström & Fries, 2005) и обломки воска (Bzdil, 2007; Titera & Naklova, 2003). Пробы меда можно отбирать из ячеек, расположенных близко к

расплоду, с помощью отдельных одноразовых ложек для профилактики перекрестной контаминации между пробами; однако мед уже может находиться в сотах в течение нескольких месяцев к моменту отбора проб. Взрослых пчел можно вытряхнуть или вычистить щеткой из сот расплодной части гнезда или медовых надставок в пластиковый пакет или контейнер. Чтобы получить более достоверную картину действительной ситуации, следует исследовать пчел из расплодного гнезда (а не из медовых надставок). Остатки воска можно собирать на дне улья в течение всего года.

1.1.2. Пробы, отбираемые в рамках программ мониторинга/профилактики американского гнильца пчел

С целью профилактики размножения заболевшего расплода, можно использовать пробы меда, взрослых пчел и остатков для выявления американского гнильца пчел в семьях, где не наблюдаются клинические признаки. Рутинный отбор проб от семей или из собранного меда можно применять как часть действующей или региональной программы по выявлению американского гнильца пчел.

Микроскопическое исследование мазков личинок без клинических признаков менее чувствительно при выявлении спор в семьях, по сравнению с бактериологическими методами или методами, основанными на ПЦР. В действительности бактериологические методы или методы, основанные на ПЦР, часто выявляют споры в семьях, в которых вообще отсутствуют клинические признаки американского гнильца пчел. Большое количество спор, культивированных из проб меда или пчел с помощью бактериологических методов, однако, может часто указывать на присутствие клинических признаков американского гнильца пчел на уровне семьи, пасеки или хозяйства.

1.2. Упаковка и транспортировка проб в лабораторию

Для транспортировки расплодные соты следует завернуть в бумажный пакет, бумажное полотенце или газету и положить в деревянную или плотную картонную коробку. Мазки с остатками личинок можно поместить в соответствующие опытные пробирки с крышечкой. Зажимы для предметных стекол имеются в продаже. Взрослых пчел можно хранить в замороженном виде или в 70% спирте в непроницаемых контейнерах во время транспортировки, хотя высушенные пчелы тоже подходят, но объем пробы должен составлять 30 штук. Пищевые материалы можно поместить в опытную пробирку или подходящую емкость или завернуть в пластиковый пакет вместе с ложкой. Необходимо избегать утечки или перекрестной контаминации. При возможности свежий материал для лабораторных тестов следует отправлять замороженным.

Дебрис из улья и воск должны быть завернуты в бумажный пакет, пластиковые сосуды с бумажной крышкой или в бумажные пробирки с пластиковой крышкой. Вторичная упаковка состоит из пластикового пакета в качестве защитного материала от перекрестной контаминации. Что касается объемных проб, то их можно хранить даже в третичной упаковке (большие картонные коробки), которые защищают пробы от механического повреждения.

Минимальное количество меда для выявления жизнеспособных спор *P. larvae* составляет 50 г, он должен быть помещен в герметичный пластиковый контейнер (один на пробу с идентификационной отметкой).

1.3. Культивирование

1.3.1. Пробоподготовка

i) Пробы для культивирования

В целом для дальнейшего анализа следует приготовить водный раствор, содержащий споры *P. larvae*. Эту суспензию со спорами подвергнуть тепловому шоку при 80 °С в течение 10 минут или при 95 – 96 °С в течение 3 – 5 минут с целью уничтожения вегетативных форм других микроорганизмов, включая других спорообразующих микроорганизмов. Различные генотипы *P. larvae* демонстрируют различия в способности развиваться, а их реакция на тепловую обработку также не идентична (Forsgren et al., 2008). Непосредственное культивирование остатков личинок на агаре без тепловой обработки также возможно.

Остатки личинок/куколок из расплодного сота собрать стерильным тампоном и суспендировать в 5 – 10 мл стерильной воды или физиологического раствора (фосфатно-буферного раствора или 0,9 % NaCl) в опытной пробирке. В отношении остатков личинок или куколок, представленных на стеклянном слайде, добавить 2 – 3 капли стерильной воды. Приготовить эмульсию с помощью апельсиновой палочки или стерильной петли. Поместить целую петлю эмульгированного материала на подходящий агар и нанести полосы стерильной петлей для получения изолированных колоний. Планшеты инкубировать в 5 – 7 % CO₂ и исследовать ежедневно до семи дней. Колонии становятся различимы со второго дня.

Каждая проба с суспензией спор должна быть поделена и обработана трижды:

- a) без тепловой обработки;
- b) с тепловой обработкой при 80°С в течение 10 минут;
- и
- c) с тепловой обработкой при 95°С в течение 3 минут.

Этапы ii) и iii) предназначены для уничтожения вегетативных форм других микроорганизмов. Этап тепловой обработки значительно сократит риск того, что колонии *P. larvae* будут замаскированы этими конкурентами. Тем не менее бактерии рода *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Brevibacillus* могут продолжать обширно расти на планшетах, что делает необходимым использование полу-избирательных сред, посредством добавления антибиотиков налидиксовой кислоты (Hornitzky & Clark, 1991) и пипемидовой кислоты (Alipri, 1992; 1995). При этапе i) (нет тепловой обработки), оба антибиотика, амфотерицин В в конечной концентрации 16,8 мкг/мл культурной среды должны использоваться во избежание грибковой контаминации в изолирующих планшетах. Инкубировать планшеты при 37+1°С в течение 2 – 4 дней.

Что касается мазков, приготовленных из мертвых личинок, добавить 1 – 2 капли стерильной воды и смешать на слайде. Использовать проволочную петлю для приготовления нового мазка в целях окрашивания по Граму и микроскопического исследования на наличие спор. Вторая петля восстановленного материала используется для культивирования на подходящем агаре.

Пробы меда для исследования на споры подогреть до 45 – 50 °С и встряхнуть для распределения спор, которые могут там присутствовать. Затем каждую пробу меда следует разбавить (1/1) в 0,01 М ФБР рН 7,2 или 0,9 % NaCl, перенести в центрифужную пробирку и подвергнуть центрифугированию при 6000 g в течение 40 минут. Надосадочную жидкость удалить, оставив приблизительно 3 мл на пробирку, а затем смешивать вортексом в течение одной минуты с целью ресуспендирования пеллеты, и обработать, как это описано для остатков личинок. Пробы сновы смешивают вортексом в течение 2 минут, а 100 – 200 мкл смеси осадка с жидкостью перелить в подходящую культурную среду с добавлением антибиотиков и инкубировать при 37°С в течение 7 – 8 дней (de Graaf *et al.*, 2013).

Непосредственный посев разведенного меда на планшет (Ritter & Kiefer, 1995) широко применяется на практике, но его чувствительность хуже, чем у метода центрифугирования, так как только часть от общего объема будет нанесена на планшет. Независимо от того, какой метод будет выбран, если мед подвергается количественному анализу и установлены пороговые значения, следует строго придерживаться методологии, которая применялась для установления этих величин.

Водный фильтрат пыльцы можно приготовить посредством тщательной дисперсии 1 г пыльцы в конечном объеме, равном 10 мл, стерильной дистиллированной воды или 0,01 натриевый ФБР рН 7,2 и фильтрации через ватманскую бумагу № 1. (Gochnauer & Corner, 1987).

Если взрослые пчелы были отравлены в спирте, его следует удалить и заменить стерильной водой или физиологическим раствором до измельчения.

Hornitzky & Karlovskis (1989) разработали методику культивирования, которая обеспечивает быстрый способ выявления спор *P. larvae* у взрослых пчел, которые могут служить источником инфекции американским гнильцом пчел для молодых личинок. В кратком описании, каждую пробу из 30 пчел-кормилец гомогенизировать в 20 мл стерильного ФБР в течение 30 секунд. Гомогенат профильтровать через ватманскую бумагу № 1, центрифугировать, а пеллету ресуспендировать в ФБР. Пробы подвергнуть тепловому шоку (см. обработка проб из суспензий спор) и высеять на подходящую культурную среду, обогащенную налидиксовой кислотой и пипемидовой кислотой с целью торможения распространения *P. alvei* и других бактерий, которые могут обширно расти на планшетах.

Дебрис и пчелиный воск (1,5 г) следует растворить в органическом растворителе (10 мл): толуоле (Titera & Naklova, 2003), хлороформе (Kostecki, 1969) или этиловом эфире (Ritter, 2003). Жидкую часть (2 мл) затем растворить в физиологическом растворе (6 мл). После тщательного встряхивания, можно сразу же выделить эту суспензию (без теплового шока) (Titera & Naklova, 2003). В другом протоколе пчелиный воск сначала разводят в воде (воск/вода 1/10) и нагревают до 90 °С в течение 6 минут. После охлаждения добавляют органический растворитель (органический растворитель/вода 1/9) и смесь тщательно встряхивают. Через 2 минуты простоя образуется осадок водного раствора, содержащий споры *P. larvae* (Ritter, 2003).

ii) Культивирование методом Твин 80 (Bzdil, 2007)

Один грамм дебриса или 1 г воска поместить в тест-пробирку с непроницаемой крышкой. Более крупные частицы воска следует порезать стерильными инструментами на очень маленькие кусочки (в идеале до 3 мм в размере). Нет

необходимости в дальнейшем разрезании кусочков воска, содержащихся в дебрисе, так как обычно они очень малы. Чем меньше частички, тем легче и быстрее проходит процесс гомогенизации. Сухой материал, приготовленный таким способом, следует тщательно перемешать и разбавить 8,5 мл стерильной дистиллированной воды. Получившуюся суспензию затем обогащают 0,5 мл Твин 80. Приблизительно за 30 минут до выкапывания необходимый объем Твин 80 следует удалить из первоначального контейнера, поместить в другой стерильный контейнер с непроницаемой крышкой и поместить на горячую водяную баню ($70\pm 2^\circ\text{C}$) для сокращения вязкости Твин 80с целью облегчения выкапывания. Суспензию дебриса, воды и Твин 80 тщательно встряхивают, а тест-пробирку помещают на горячую водяную баню ($70\pm 2^\circ\text{C}$) на 30 минут. Если воск растворяется медленно или присутствуют частицы воска размером, превышающие 5 мм, тест-пробирку можно оставить на водяной бане на период до часа. При подогреве запечатанной пробирки на водяной бане следует тщательно встряхивать в продольном направлении как минимум три раза (предпочтительно несколькими 5 -30-секундными циклами с 5-10 минутным перерывом). Тщательная гомогенизация приводит к получению гомогенного серовато-коричневого кашицеобразного материала, который может затвердевать по мере охлаждения. После этого пробирки вынимают из воды и дают остыть до комнатной температуры, к тому времени должно пройти 2 – 4 часа, пока достаточное количество жидкости не сепарируется на дне пробирок. Затем 2 – 5 мл этой жидкости изымают с помощью одноразовой пипеткой с резиновой грушей и смешивают с таким же объемом дистиллированной воды в другой стерильной запечатываемой пробирке. И снова получившуюся смесь следует тщательно встряхивать в продольном направлении в течение минимум 5 раз и поместить на водяную баню ($90\pm 2^\circ\text{C}$). Через 10 минут пробирки убирают с бани, дают остыть до комнатной температуры и снова встряхивают. Затем материал инокулируют в 0,2 мл дозах на 3-5 планшетах MYPGP с налидиксовой кислотой и, как минимум, на один планшет с кровавым агаром, служащим в качестве контроля. До культивирования планшеты следует высушить в термостате при $37\pm 1^\circ\text{C}$. Время высушивания выбирается на основе влажности поверхности культурной среды (приблизительно 30 минут). Чашки Петри должны быть четко маркированы в отношении проб. Жидкость распределяют по планшетам с помощью изогнутой пластиковой/стеклянной палочки или наконечника пипетки. Жидкости дают высохнуть, а планшеты переворачивают вверх дном и инкубируют при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 – 8 дней.

1.3.2. Исходные растворы

i) Исходный раствор налидиксовой кислоты (Hornitzky & Clark, 1991)

Подготовить посредством растворения 0,1 г в 2 мл 0,1 N NaOH и разбавления до 100 мл 0,01 M фосфатного буфера (pH 7,2), (исходная концентрация 1000 мкг/мл). Стерилизовать фильтрованием. Конечная концентрация: 10 мкг/мл для проб личинок и 20 мкг/мл для проб меда.

ii) Исходная пипемидиновая кислота (Alippi, 1995)

Подготовить посредством растворения 0,2 г в 2 мл 0,1 N NaOH и разбавления до 100 мл 0,01 M фосфатного буфера (pH 7,2), (исходная концентрация 2000 мкг/мл). Стерилизовать фильтрованием. Конечная концентрация: 10 мкг/мл для проб меда.

После автоклавирования и охлаждения до 50 °С, добавить антибиотики в среду в конечной требуемой концентрации и перелить в стерильные чашки петри (20 мл на чашку) (De Graaf *et al.*, 2013)

1.3.3. Культурная среда

Было описано несколько сред для культивирования *P. larvae*, но лучшие результаты были получены при использовании PLA (агар *Paenibacillus larvae*) (Schuch *et al.*, 2001), агара MYPGP (Dingmann & Stahly, 1983), ВНТ агара (среда с сердечно-мозговой вытяжкой обогащенная тиамином) (Gochnauer, 1973) и CSA (агар на основе крови овцы колумбийской породы) (Hornitzky & Karlovskis, 1989). Формулы сред следующие:

i) PLA (агар *Paenibacillus larvae*)

Эта способствующая выделению среда объединяет три разных среды, чтобы получить основу, к которой добавляют антибиотики и яичный желток (Schuch *et al.*, 2001). Равное количество (100 мл) стерильной, жидкой агарной основы *Bacillus cereus* (Oxoid CM617), триптиказо-соевого агара (Merck 5458) и обогащенного питательного агара (SNA) объединяют и смешивают. SNA составляют из (на литр): 23 г питательного агара, 6 г экстракта дрожжей, 3 г мясного экстракта, 10 г NaCl, 2 г Na₂HPO₄; конечный pH равен 7,4 ± 0,2. Все твердые среды стерилизуют при 121 °С в течение 15 минут. После того, как три жидкие среды объединены, 3 мл исходного раствора налидиксовой кислоты, 3 мл исходного раствора пипемидовой кислоты и 30 мл 50% суспензии яичного желтка (Gordon *et al.*, 1973) добавляют для образования PLA среды (конечная концентрация 9 мкг/мл пипемидиновой кислоты и 18 мкг/мл налидиксовой кислоты). PLA среду выливают (20 мл) в стерильные чашки Петри, а планшеты высушивают перед использованием (45 – 50 °С в течение 15 минут).

ii) MYPGP агар (Сокращение означает его составляющие: бульон Мюллера-Хинтона, экстракт дрожжей, фосфат калия, глюкозу и пируват)

MYPGP агар состоит из (на литр): 10 г бульона Мюллера-Хинтона (Oxoid CM0405), 15 г экстракта дрожжей, 3 г K₂PO₄, 2 г глюкозы, 1 г Na-пирувата и 20 г агара (Dingmann & Stahly, 1983). Добавление налидиксовой кислоты и пипемидовой кислоты осуществляется, как описано выше.

iii) J-агар

J-агар состоит из (на литр): 5 г триптона, 15 г экстракта дрожжей, 3 г K₂ PO₄, 2 г глюкозы, 20 г агара (pH 7,3–7,5) (Gordon *et al.*, 1973). Добавление налидиксовой кислоты и пипемидиновой кислоты проводится, как указано выше.

iv) CSA (на основе крови овцы колумбийской породы)

CSA состоит из (на литр): 39 г агаровой основы из крови овцы колумбийской породы (pH 7,3). После автоклавирования и охлаждения до 50°С, добавить 5% стерильной дефибринированной крови (Hornitzky & Karlovskis, 1989). Добавление налидиксовой кислоты и пипемидовой кислоты осуществляется, как описано выше. Культивирование на скошенных агарах CSA индуцирует споруляцию и позволяет производить микроскопическое выявление жгутиков пучков.

v) ВНІТ агар (среда с сердечно-мозговой вытяжкой, обогащенная тиамином)

Агар ВНІТ составит (на литр): 47 г агара на основе сердечно-мозговой вытяжки (доведенный до рН 6,6 с помощью HCl). После автоклавирования и охлаждения до 50°C добавляют стерильный раствор тиамин гидрохлорида для получения финальной концентрации в объеме 1 мг на литр (Gochnauer, 1973).

Агар МΥΡGР обычно используется для культивирования *P. larvae* для диагностики американского гнильца пчел, и обеспечивает самый высокий процент выделения спор, в то время как агары J-агар, ВНІ и CSA доказали свою меньшую эффективность в этом отношении. Среда PLA также демонстрирует более хорошую эффективность культивирования и ингибирует большинство микроорганизмов, обычно присутствующих в улье или продуктах пчеловодства (Schuch *et al.*, 2001).

Если культивирование *P. larvae* тормозится возникновением грибов, в этом случае помогает добавление 16,8 мкг/мл среды с амфотерицином В.

Следует использовать стерильный ватный тампон для переноса части пробы на поверхность твердой среды. Для количественного анализа рекомендуется нанести фиксированный объем суспензии на твердый агар стерильным скребком или пипеткой, но не ватными тампонами.

Инокулированные планшеты лучше всего инкубировать при 37 + 1 °C в течение 2 – 4 дней в воздушной среде с содержанием 5 – 10% CO₂, хотя аэробная инкубация также подходит. Пробы меда следует инкубировать дольше, в течение минимум 6 дней и до 15 дней, и проверять на подозрительные колонии на 3 и 6 день.

1.3.4. Идентификация

i) Морфология колоний

Пробы от клинических больных личинок через 2 – 4 дня будут продуцировать конфлюентный рост на планшетах, что в итоге приводит к этапу субкультивирования для выделения отдельных колоний.

На PLA колонии *P. larvae* небольшие, светло-зеленого до желтого цвета (того же цвета, что и среда), с немного мутной и шероховатой поверхностью; центр колонии иногда выпуклый.

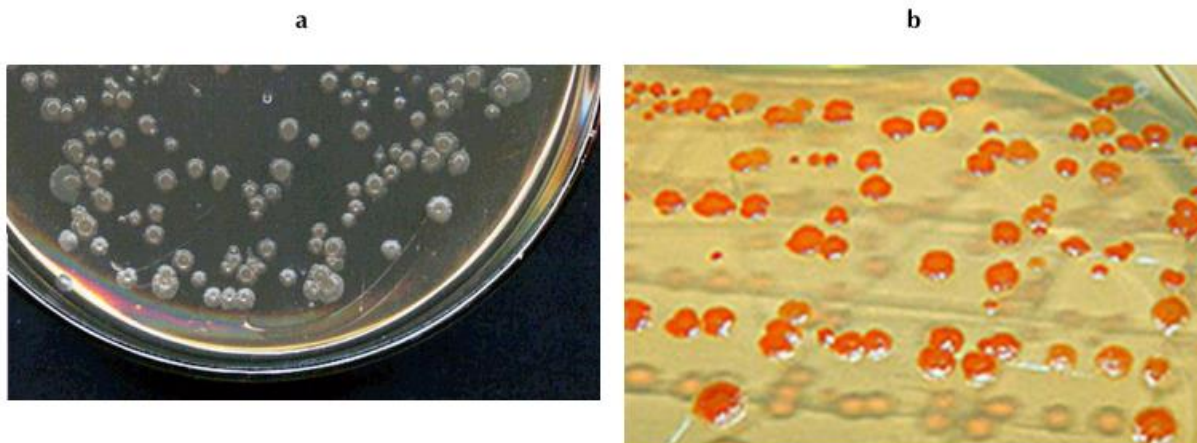


Рис. 3: Внешний вид колоний *P. larvae*, культивированных на планшетах с агаром МYPGP (а) Эталонный штамм ATCC 9545^T (ERIC I) и (б) Штамм PL SAG m290 (ERIC II). Фотографии: А.М. Alippi

На агаре МYPGP и J-агаре колонии небольшие, правильной формы, в основном с шероховатой поверхностью, плоские или выпуклые и имеют беловато – бежевый цвет (Рисунок 3а).

На CSA агаре колонии небольшие, правильной формы, шероховатые, маслянистые, сероватого цвета, немного прозрачные и слегка блестящие (Рисунок 4а).

Колонии *Raenibacillus larvae* с пигментацией от оранжевого до красного цвета были уже описаны, т.е. генотипы ERIC II и III, которые продуцируют колонии от оранжевого до красного цвета на агарах МYPGP, J-агаре и CSA (Таблица 2) (Рисунки 3b and 4b) (Genersch *et al.*, 2005; 2006; Neuendorf *et al.*, 2004). По словам Genersch *et al.* (2005; 2006) только генотипы ERIC II и III пигментированы, но были сообщения и о пигментированных, и о непигментированных штаммах ERIC IV (Dingman, 2015). Важно отметить, что пигментированные фенотипы могут быть потеряны при последовательном субкультивировании.

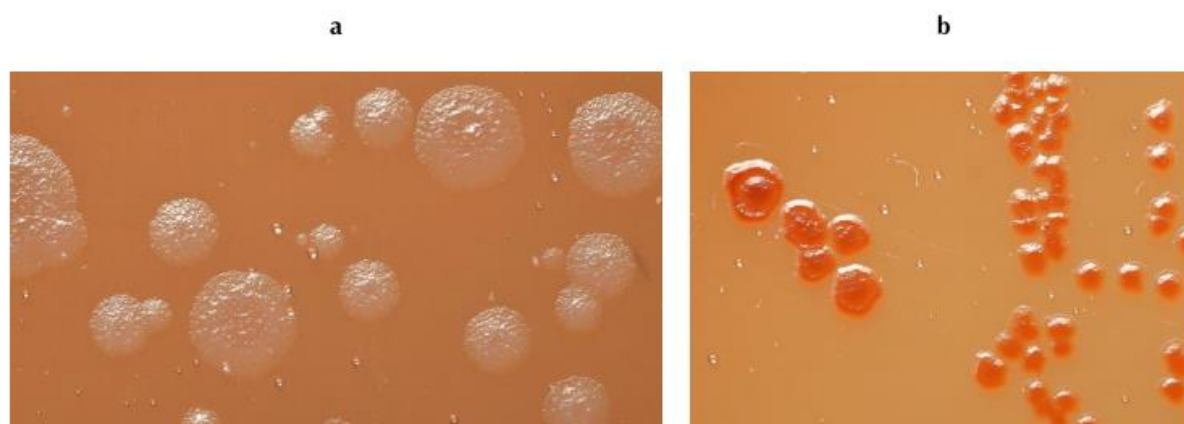


Рис.4: Характерная морфология колоний *P. larvae*, культивированных на планшетах с агаром на основе крови колумбийской овцы (а) Эталонный штамм ATCC 9545^T (ERIC I) и (б) Штамм PL SAG m290 (ERIC II). Фотографии: А.М. Alippi

Рекомендуется исследовать эталонные штаммы *P. larvae* параллельно, например LMG 9820 (другие обозначения: ATCC 9545, DSM 7030, NRRL B-2605, LMG 15969) для непигментированного варианта и DSM 16115 или DSM 16116 для пигментированного генотипа (Для получения полного списка эталонных штаммов *P. larvae* см. Graaf *et al.*, 2013).

Морфология колоний не является доказательной, но может служить основой для отбора бактериальных колоний для дальнейшей идентификации.

ii) Полимеразная цепная реакция

ПЦР можно использовать для идентификации бактериальных колоний (=суспензия клеток/спор) после этапа культивирования. ДНК можно экстрагировать следующим образом: одну колонию суспендируют в 50 мкл дистиллированной воды и нагревают до 95°C в течение 15 минут. После центрифугирования при 5000 г на 5 минут, 1– 5 мкл супернатанта используется как матричная ДНК в 50 мкл смеси для ПЦР (Dobbelaere *et al.*, 2001b). Коммерческие тест-системы для экстрагирования ДНК также можно использовать, выполняя инструкции производителя для грамположительных бактерий. См. Раздел 1.4.2. ниже в отношении ПЦР метода.

Таблица 2. Фенотипические характеристики *Paenibacillus larvae*, генотипы ERIC. Все генотипы имеют эллипсоидные споры и являются патогенными для медоносных пчел (данные, основанные на данных и являются патогенными для медоносных пчел (данные, основанные на данных Genersch *et al.*, 2005).

Характеристика	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
Пигментированные колонии	-	+	+	Различные
Поверхность спор (по SEM)	Гладкие	Извилистые	С гребнями	С гребнями
Рост в питательном бульоне	-	+	+	+
Ферментация манита	-	+	+	+
Ферментация салицина	+	-	-	-
Щелочная фосфатаза	+	-	+	+
Кислотная фосфатаза	+	-	+	+
Каталаза	-	-	Слабый, замедленный	Слабый, замедленный
			+	+

iii) Масс-спектрометрия

С помощью зубочистки бактериальную колонию мазками выкладывают в две лунки планшета и дают высохнуть при комнатной температуре, затем добавляют 1 мкл матрицы (α -циано-4- гидроксикоричная кислота) в каждый мазок до помещения планшета в прибор. Затем проводят измерение MALDI-TOF MS. Прибор выявляет специфичные масс спектры бактериальных рибосомных пептидов. После сравнения выявленных спектров с базой данных известных спектров, идентифицируют бактериальный штамм (Schäfer *et al.*, 2014).

iv) Биохимические исследования

Paenibacillus larvae также можно выявить с помощью их биохимического профиля. Бактерии являются каталазонегативными или продуцирующими слабую положительную реакцию замедленного типа, они имеют типичный профиль окисления

углеводов, с кислотой, продуцируемой из глюкозы и трегалозы, а не из арабинозы и ксилозы, и они также могут гидролизовать казеин или молоко. Некоторые штаммы *P. larvae* варьируют в рамках своих генотипов, напр. в отношении ферментации манита и салицина (Таблица 2).

а) Каталазный тест

Каплю 3% перекиси водорода помещают на активно растущую культуру на твердой среде. Большинство аэробных бактерий разрушают перекись на воду и кислород, продуцируя пену, но *P. larvae* являются каталазонегативными или продуцирующими слабую положительную реакцию замедленного типа в этой реакции, в зависимости от генотипа (Таблица 2) (Haynes, 1972). Организмы могут потерять свою каталазную активность с возрастом, что может привести к ложноотрицательному результату. При использовании агара из крови овцы колумбийской породы для культивирования, тест невозможно провести на твердой среде, так как присутствие крови овцы будет являться причиной ложноположительной реакции. В этом случае колонии следует перенести на чистое предметное стекло микроскопа для выполнения этого теста. Здесь оценка теста проходит, как описано выше невооруженным глазом.

б) Продуцирование кислоты из углеводов (Gordon *et al.*, 1973)

Бактерии выращивают в J-бульоне (на литр: 15 г экстракта дрожжей, 5 г триптона и 3 г K_2HPO_4), в котором 0,5% опытного субстрата, отдельно стерилизованного в водном растворе, заменяют глюкозой. Используемые углеводы: L (+)- арабиноза, D (+)- глюкоза, D (+)- ксилоза и D(+)- трегалоза. Культуры тестируют на 14 день, асептически переместив один мл или менее на планшет с крупными лунками, смешивая пробу с каплей 0,04% спиртового раствора бромкрезолового пурпурного и наблюдая за цветом индикатора. *Paenibacillus larvae* аэробно продуцируют кислоту из глюкозы и трегалозы. Из арабинозы и ксилозы кислота не продуцируется (Alipri, 1992), и получают различные результаты при использовании манита и салицина в соответствии с исследуемым изолятом (Genersch *et al.*, 2005; 2006) (Таблица 2).

Можно также использовать коммерческие наборы для биохимической характеристики *P. larvae* (Carpana *et al.*, 1995; Dobbelaere *et al.*, 2001a; Neuendorf *et al.*, 2004).

с) Гидролиз казеина (Schuch *et al.*, 2001)

Гидролиз казеина исследуют с помощью молочного агара с тиамином (на литр: 20 г агара, 10 г экстракта дрожжей; стерилизованного при 121 °C в течение 15 минут). Добавить в каждые 70 мл охлажденной среды 30 мл обезжиренного молока, прошедшего высокотемпературную обработку и 1,5 мл 0,1% раствора тиамин, стерилизованного посредством фильтрации. Планшеты засевают штрихом и исследуют через 5 дней инкубации при 36 ± 1 °C. *Paenibacillus larvae* гидролизуют казеин, поэтому следует наблюдать за зонами просветления вокруг бактериальных колоний.

v) Методы, основанные на определении антител

Различные методы, основанные на определении антител, были разработаны для диагностики американского гнильца. Большинство из них основываются на поликлональной сыворотке кроликов, разработанной против культур *P. larvae*. Они могут использоваться для идентификации бактериальных колоний, являющихся результатом этапа культивирования или для непосредственного исследования подозрительных остатков личинок.

В реакции иммунодиффузии антитела взаимодействуют с бактериальным антигеном во время процесса двойной диффузии, оставляя линии преципитации (Peng & Peng, 1979). В методе флуоресцирующих антител эти антитела конъюгируются с люминесцентной краской. Получающееся в результате флуоресцентное антитело вступает в реакцию с бактериальным мазком на предметном стекле. Любую излишнюю сыворотку следует смыть, а мазок исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии. Штаммы *Paenibacillus larvae* можно распознать как ярко флуоресцирующие бактерии на темном фоне (Otte, 1973). Существует твердофазный иммуоферментный анализ с использованием моноклональных антител, специфичных к *P. larvae* (Olsen *et al.*, 1990). В продажу был выпущен прибор с латеральным потоком для экспресс-подтверждения американского гнильца.

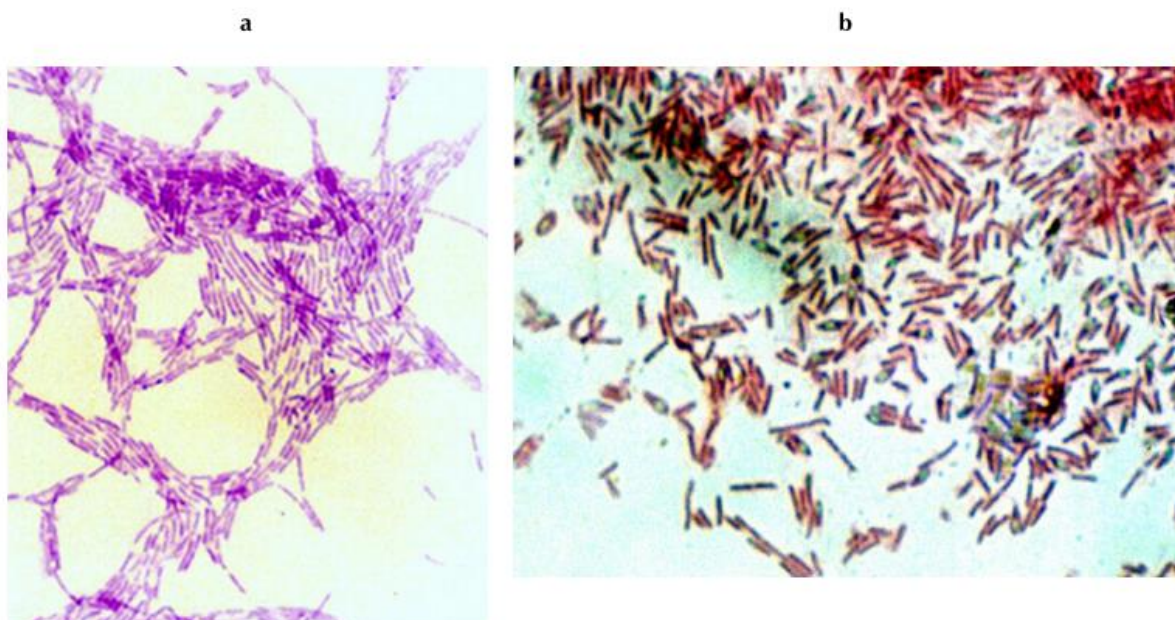


Рис.5. Микроскопическое исследование *Paenibacillus larvae*, организма, вызывающего американский гнилец пчел: а) окрашивание по Граму обнаруживает грамположительные палочки, возникающие разрозненно и цепочками (увеличение: $\times 1000$); б) Окрашивание спор по Scaeffler & Fulton обнаруживает, что спорангии (окрашенные красным) набухают под действием спор (окрашены зеленым), расположенных центрально и терминально (увеличение: $\times 1000$). Фотографии: А.М. Alippi

vi) Микроскопия

Обычно используются два микроскопических метода. Окраску по методу Грама часто осуществляют на мазках бактерий из выделенных бактериальных колоний. *Paenibacillus larvae* является грамположительной бактерией (Рисунок 5). Окраска карбол-фуксином осуществляется на мазках личинок и может подтверждать клинический американский гнилец, основываясь на морфологии спор. К тому же для

демонстрации формы и расположения спор и любого набухания спорангия, рекомендуется метод Schaeffer & Fulton для окрашивания спор. Эти методы изложены ниже:

- a) Окраска бактерий по Граму
 - i) Покрыть целиком предметное стекло с термически фиксированным мазком кристаллическим фиолетовым. Дать кристаллическому фиолетовому отстояться в течение около 60 секунд.
 - ii) Промывать предметное стекло водой в течение 5 секунд. Мазок должен приобрести сине-фиолетовый цвет при изучении невооруженным взглядом.
 - iii) Покрыть предметное стекло йодистым раствором. Дать отстояться в течение около минуты.
 - iv) Споласкивать предметное стекло водой в течение 5 секунд и немедленно приступить в следующем этапе. По истечении этого времени образец все еще должен иметь сине-фиолетовый цвет.

Примечание: Следующий этап охватывает добавление обесцвечивающего вещества, этанола. Этот этап является несколько субъективным, так как использование слишком большого количества обесцвечивающего вещества может привести к ложному Грам (-) результату. Подобным образом неиспользование достаточного количества обесцвечивающего вещества может дать ложный Грам (+) результат.

- v) Чтобы не ошибиться следует добавлять этанол каплями до тех пор, пока сине-фиолетовый цвет не исчезнет.
- vi) Как и в предыдущие этапы сполоснуть водой в течение 5 секунд.
- vii) Конечный этап включает нанесение контрастного красителя, сафранина. Покрыть предметное стекло целиком краской и дать отстояться в течение минуты, чтобы бактерии впитали сафранин.
- viii) Снова сполоснуть водой в течение 5 секунд, чтобы удалить излишки краски. Осторожно промокнуть предметное стекло фильтровальной бумагой и дать высохнуть на воздухе перед исследованием под микроскопом.

Подготовка красителей по Граму

i) Кристаллический фиолетовый по Граму

Растворить 2 г кристаллического фиолетового в 20 мл 95% этанола. Для использования смешать 20 мл исходного раствора с 80 мл 1% оксалата аммония в дистиллированной воде. Смешать оба вещества и профильтровать перед использованием. Оба раствора стабильны и могут храниться месяцами.

ii) Йод по Граму

Растворить 1,0 г йода (I₂) и 2,0 г йодида калия (KI) в 300 мл дистиллированной воды.

iii) Сафранин по Граму

Растворить 0,25 г сафранина О в 100 мл 95% этилового спирта. Для использования 10 мл этого раствора должны быть разведены 90 мл дистиллированной воды.

b) Окраска карбол-фуксином мазков личинок (Hornitzky & Wilson, 1989)

Фиксировать мазки термически. Покрывать предметное стекло карбол-фуксином по Цилю-Нильсену на 30 секунд. Смыть краску и дать высохнуть на воздухе либо промокнуть абсорбирующим материалом. Исследовать под микроскопом споры *P. larvae*, которые имеют размер 1,3 x 0,6 мкм, форму эллипсоида и толстые края. Примечание: Если инфекция появилась в личинках менее 10 дней тому назад, будут присутствовать длинные вегетативные палочки с коалесцентными жгутиками. Эти жгутиковые пучки характерны для патогена.

Приготовление карбол-фуксина по Цилю-Нильсену

i) Раствор А

Растворить 3 г основного фуксина в 10 мл 95% этилового спирта.

ii) Раствор В

Растворить 5 г фенола в 95 мл дистиллированной воды.

iii) Первичный краситель

Смешать раствор А и В и развести 1/10 для использования.

с) Метод Schaeffer & Fulton для окрашивания эндоспор (Schaeffer & Fulton, 1933)

Подготовить мазок организма и высушить его на воздухе, затем термически фиксировать посредством трехкратного проведения через пламя горелки Бунзена. Покрывать предметные стекла 5% водным раствором малахитового зеленого и нагревать до образования пара 3 – 4 раза в течение минуты, а затем дать остыть. Смыть краситель в течение 30 секунд и покрыть 0,5 % сафранином в дистиллированной воде на 30 секунд.

Слегка смыть краситель, промокнуть и исследовать под микроскопом. Споры должны быть окрашены зеленым, а вегетативные клетки красным. Споры *P. larvae* имеют эллипсоидную форму, расположенные центрально и терминально, спорангий набухший и толстыми краями, в размере 0,6 × 1,3 мкм.

Приготовление красителей для метода Schaeffer & Fulton

i) Малахитовый зеленый

Растворить 5 г хлорида малахитового зеленого в 100 мл дистиллированной воды. Этот раствор очень стабилен.

ii) Краситель спор – сафранин

Растворить 0,5 г сафранина О хлорида в 100 мл дистиллированной воды. Этот раствор очень стабилен.

d) Негативное окрашивание нигрозином

Взять каплю жидкой фазы скошенного агара CSA, смешать его на предметном стекле с 5% раствором нигрозина, высушить на воздухе, затем фиксировать термически пропустив через пламя горелки Бунзена.

1.4. Полимеразная цепная реакция

1.4.1. Пробы для ПЦР

Суспензии ячеек/клеток и суспензии, содержащие только споры, должны быть разграничены, так как последняя требует более сложного этапа экстрагирования.

Для экспресс подтверждения клинического американского гнильца пчел пробы следует готовить следующим образом: остатки двух заболевших личинок медоносных пчел (= суспензия ячеек/спор) суспендировать в 1 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно смешать. 100 мкл этой суспензии разбавить в 900 мкл дистиллированной воды. Это разведение перемешать на вортексе, а 100 мкл этого разведения использовать для экстрагирования ДНК посредством нагревания и центрифугирования (см. выше) (Dobbelaere *et al.*, 2001b).

Все водные растворы, являющиеся результатом отбора проб от меда, взрослых пчел, остатков жизнедеятельности, пчелиного воска, пыльцы и маточного молочка следует считать суспензией спор. Здесь экстрагирование ДНК требует другого подхода. Фактически суспензии спор центрифугируют при 6000 *g* и 4 °C в течение 30 минут. Затем гранулу подвергают обработке микроволнами в течение 5 минут при максимальной мощности для разрушения покрытия спор, а высвобожденную ДНК суспендируют в 30 мкл 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, содержащую 1 ммоль ЭДТА (Piccini *et al.*, 2002).

Если споры необходимо выделить из меда ДНК серийно разводят стерильной дистиллированной водой для исключения торможения ПЦР, вызываемого медом (Piccini *et al.*, 2002). Был описан также другой метод экстрагирования ДНК, основанный на обработке лизоцимом и протеинкиназой К (Bakonyi *et al.*, 2003).

Хорошие результаты также можно получить посредством инкубации гранулированной суспензии спор в MYPGP бульоне при 37 °C в течение 2 – 24 часов. Затем суспензию центрифугируют при 14 500 *g* в течение 5 минут, моют стерильной дистиллированной водой и ресуспендируют в 200 мкл стерильной дистиллированной воды. Это короткий этап инкубации заставляет споры созреть, делая их чувствительными к синтезу ДНК посредством термообработки (см. выше) (Lauro *et al.*, 2003).

Положительные и отрицательные контроли должны быть исследованы параллельно экспериментальным образцам.

1.4.2. Метод полимеразной цепной реакции

Несколько ПЦР протоколов были описаны для идентификации *P. larvae* (пересмотрено de Graaf *et al.*, 2006 и De Graaf *et al.*, 2013), но только два из них, основанные на гене 16S рРНК, доказали свою робастность, и описаны следующим образом:

Примечание: при использовании коммерческих ПЦР смесей, требуемые ингредиенты могут быть заранее включены. Проверить и следовать инструкциям производителя.

ПЦР (изменено Dobbelaere et al., 2001) ставят на 50 мкл смесях, содержащих:

- i) 5 мкл матричной ДНК (см. пробоподготовку);
- ii) 50 пкмоль прямого (AFB-F) и обратного праймеров (AFB-R);
- iii) 10 нмоль каждого из дезоксинуклеозидтрифосфата;
- iv) 2 ммоль $MgCl_2$;
- v) 1 – 2, 5 Е *Taq* полимеразы в соответствующем ПЦР буфере содержащем 2 ммоль $MgCl_2$.

Возможно снижение объема ПЦР смесей до 25 мкл.

Использовать следующие ПЦР условия: этап при 95 °С (1 – 15 минут), 30 циклов при 93 °С (1 минута), 55 °С (30 секунд) и 72 °С (1 минута) и конечный цикл при 72 °С (5 минут).

ПЦР с использованием праймеров PL1 и PL2 primers (Govan et al., 1999) ставят на 50 мкл смесях, содержащих:

- i) 5 мкл матричной ДНК (см. пробоподготовку);
- ii) 2 ммоль $MgCl_2$;
- iii) 50 пкмоль прямого (PL1) и обратного праймеров (PL2);
- iv) 25 мМ концентрацию каждого из дезоксинуклеозидтрифосфата;
- v) 1 Е *Taq* полимеразы на мл.

Возможно снижение объема ПЦР смесей до 25 мкл.

Использовать следующие ПЦР условия: этап при 95 °С (1 минута), 30 циклов при 93 °С (1 минута), 55 °С (30 секунд) и 72 °С (1 минута) и конечный цикл при 72 °С (5 минут). Молекулярные массы ПЦР продуктов определяются электрофорезом в 0,8 % агарозном геле и окрашиванием подходящим ДНК красителем.

Публикация	Название	Последовательность	Размер ПЦР продукта	Уровень специфичности
(Dobbelaere et al., 2001b)	AFB-F AFB-R	5'-СТТ-GTG-TТТ-СТТ-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3' 5'-ТСТ-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3'	1106 п.о.	Вид
(Govan et al., 1999)	PL1 PL 2	5'-AAG-TCG-AGC-GGA-CCТ-TGT-GTT-TC-3' 5-'ТСТ-ATC-TCA-AAA-CCG-GTC-AGA-GG-3'	973 п.о.	Вид

2. Серологические исследования

Серологические тестирования не проводятся.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Вакцин не существует

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ALIPPI A.M. (1992). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American foulbrood of honeybees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, 24, 67–72. ALIPPI A.M. (1995). Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologia SEM*, 11, 343–350.

BAKONYI T., DERAKHSHIFAR I, GRABENSTEINER E. & NOWOTNY N. (2003). Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (3), 1504–1510.

BRØDSGAARD C.J., HANSEN H. & RITTER W. (2000). Progress of *Paenibacillus larvae* larvae infection in individually inoculated honey bee larvae reared single in vitro, in micro colonies, or in full-size colonies. *J. Apicult. Res.*, 39 (1–2), 19–27.

BZDIL J. (2007): Detection of *Paenibacillus larvae* spores in the debris and wax of honey bee by the Tween 80 method. *Acta Vet. Brno*, 76, 643–648.

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.

DE GRAAF D.C., ALIPPI A.M., ANTÚNEZ K., ARONSTEIN K.A., BUDGE G., DE KOKER D., DE SMET L., DINGMAN D.W., EVANS J.D., FOSTER L.J., FÜNFHAUS A., GARCIA-GONZALEZ E., GREGORC A., HUMAN H., MURRAY K.D., NGUYEN B.K., POPPINGA L., SPIVAK M., VAN ENGELSDORP D., WILKINS S. & GENERSCH E. (2013). Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *J. Apicult. Res.*, 52 (1),

DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.11. DE GRAAF D.C., ALIPPI A.M., BROWN M., EVANS J.D., FELDLAUFER M., GREGORC A., HORNITZKY M., PERNAL S.F., SCHUCH D.M.T., TITĚRA D., TOMKIES V. & RITTER W. (2006). Under the microscope. Diagnosis of American foulbrood disease in honeybees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 583– 590.

DINGMANN D.W. (2015). Comparative analysis of *Paenibacillus larvae* genotypes isolated in Connecticut. *Arch. Microbiol.*, DOI 10.1007/s00203-015-1113-4.

DINGMANN D.W. & STAHLY D.P. (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(4), 860–869.

DJUKIC M., BRZUSZKIEWICZ E., FÜNFHAUS A, VOSS J., GOLLNOW K., POPPINGA L., LIESEGANG H., GARCIA-GONZALEZ E., GENERSCH E. & ROLF D. (2014). How to kill

the honey bee larva: Genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus* larvae. *PLoS One*, 9 (3): e90914. Doi: 10.1371/journal.pone.0090914.

DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & JACOBS F.J. (2001a). Comparison of two commercial kits for the biochemical characterization of *Paenibacillus* larvae larvae in the diagnosis of AFB. *J. Apic. Res.*, 40, 37–40.

DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & JACOBS F.J. (2001b). Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus* larvae subsp. larvae) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 32, 363–370.

FORSGREN E., STEVANOVIC J. & FRIES I. (2008). Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus* larvae genotypes. *Vet. Microbiol.*, 129, 342–349. GENERSCH E. (2010) American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus* larvae. *J. Invert. Pathol.*, 103 (Suppl. 1), 10–19.

GENERSCH E., ASHIRALIEVA A. & FRIES I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, (11), 7551–7555.

GENERSCH E., FORSGREN E., PENTIKÄINEN J., ASHIRALIEVA A., RAUCH S., KILWINSKI J. & FRIES I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus* larvae subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus* larvae subsp. larvae as *Paenibacillus* larvae without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 501–511.

GOCHNAUER T.A. (1973). Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus* larvae in aerated broth culture. *J. Invertebr. Pathol.*, 22, 251–257.

GOCHNAUER T.A. & CORNER J. (1987). Detection and identification of *Bacillus* larvae in a commercial pollen sample. *J. Apic. Res.*, 13, 264–267.

GORDON R.E., HAYNES W.C. & PANG C.H.N. (1973). The genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook N° 427*, USDA, Washington D.C.

GOVAN V.A., ALLSOPP M.H. & DAVIDSON S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus* larvae. *Appl. Environm. Microbiol.*, 65, 2243–2245.

HANSEN H. & BRØDSGAARD C.J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, 80 (1), 5–23.

HASEMAN L. (1961). How long can spores of American Foulbrood live? *Amer. Bee J.*, 101, 298–299. HAYNES W.C. (1972). The catalase test. An aid in the identification of *Bacillus* larvae. *Am. Bee J.*, 112, 130–131.

HEYNDRICKX M., VANDEMEULEBROECKE K., HOSTE B., JANSSEN P., KERSTERS K., DE VOS P., LOGAN N.A., ALI N. & BERKELEY R.C. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) larvae (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. larvae and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 270–279.

HORNITZKY M.A.Z. & CLARK S. (1991). Culture of *Bacillus* larvae from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *J. Apicult. Res.*, 30 (1), 13–16.

- HORNITZKY M.A.Z. & KARLOVSKIS S. (1989). A culture technique for the detection of *Bacillus* larvae in honeybees. *J. Apicult. Res.* 28, 118–120.
- HORNITZKY M.A.Z. & WILSON S.C. (1989). A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees. *J. Apicult. Res.*, 28, 191–195.
- KOSTECKI R. (1969). Studies on improvement of control of American foulbrood of the honey bee (in Polish). *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 13, 97–135.
- LAURO F.M., FAVARETTO M., COVOLO L., RASSU M. & BERTOLONI G. (2003). Rapid detection of *Paenibacillus* larvae from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int. J. Food Microbiol.*, 81, 195–201.
- LINDSTRÖM A. & FRIES I. (2005). Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus* larvae subsp. larvae) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Apicult. Res.*, 44 (2), 82–86.
- MORRISSEY B.J., HELGASON T., POPPINGA L., FÜNFHAUS A., GENERSCH E. & BUDGE G.E. (2015). Biogeography of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood using a new multilocus sequence typing scheme. *Environ. Microbiol.*, 17, 1414–1424.
- NEUENDORF S., HEDTKE K., TANGEN G. & GENERSCH E. (2004) Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology SGM*, 150, 2381–2390.
- OLSEN P.E., GRANT G.A., NELSON D.L. & RICE W.A. (1990). Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus* larvae in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Microbiol.*, 36, 732–735.
- OTTE E. (1973). Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. *Apidologie*, 4 (4), 331–339.
- PENG Y.S. & PENG K.Y. (1979). A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*), *J. Invertebr. Pathol.*, 33, 284–289.
- PICCINI C., D’ALESSANDRO B., ANTUNEZ K. & ZUNINO P. (2002). Detection of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 761–765.
- RAUCH S., ASHIRALIEVA A., HEDTKE K. & GENERSCH E. (2009). Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus* larvae, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees. *Appl. Environm. Microbiol.*, 75, 3344–3347.
- RIEG S., BAUER T.M., PEYERL-HOFFMANN G., HELD J., RITTER W., WAGNER D., KERN W.V. & SERR A. (2010). *Paenibacillus* larvae bacteremia in injection drug users. *Emerg. Infect. Dis.* 16 (3), 487–489.
- RITTER W. (2003). Early detection of American foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta*, 38, 125–130.

RITTER W. & KIEFER M.B. (1995). A method for diagnosing *Bacillus* larvae in honey samples. *Animal Res. Dev.*, 42, 7–13.

RUDENKO E.V. (1987). Manuscript. Dissertation for Doctorate of Veterinary Science American foulbrood of honey bees and its vaccine prophylaxis (in Russia), Minsk, Belarus.

SCHÄFER M.O., GENERSCH E., FÜNFHAUS A., POPPINGA L., FORMELLA N., BETTIN B. & KARGER A. (2014). Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus* larvae, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Vet. Microbiol.*, 170, 291–297.

SCHAEFFER A.B. & FULTON M. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77, 194, New York.

SCHUCH D.M.T., MADDEN R.H. & SATTLER A. (2001). An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae spores in honey. *J. Apicult. Res.*, 40 (2), 59–64.

TITERA D & HAKLOVA M. (2003). Detection method of *Paenibacillus* larvae larvae from beehive winter debris. *Apiacta*, 38, 131–133.

VON DER OHE W. & DUSTMANN J.H. (1997). Efficient prophylactic measures against American foulbrood by bacteriological analysis of honey for spore contamination. *Am. Bee J.*, 137 (8), 603–606.

WOODROW A.W. (1941). Susceptibility of honey bee larvae to American foulbrood. *Gleanings Bee Cult.*, 69, 148– 151. *

* *

NB: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по болезням пчел (См. Таблицу Части 4 этого *Руководства по наземным животным* или сайт МЭБ чтобы получить самый актуальный список: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>
<http://www.oie.int/>).

Пожалуйста, свяжитесь со Справочными Лабораториями МЭБ для получения дополнительной информации по диагностическим тестам и реагентам для болезней пчел.