

## ГЛАВА 3.2.3.

# ЕВРОПЕЙСКИЙ ГНИЛЕЦ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ (ЗАРАЖЕНИЕ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ *MELISSOCOCCUS PLUTONIUS*)

### РЕЗЮМЕ

**Описание заболевания:** Возбудителем европейского гнильца медоносных пчел является бактерия *Melissococcus plutonius*. Идентификация ее присутствия при помощи наблюдения за признаками болезни в поле не является достоверным методом. Наиболее частым и очевидным признаком данного заболевания является смерть личинок незадолго до запечатывания ячеек, но это может происходить и по другим причинам, а не только в результате европейского гнильца. Большинство зараженных семей демонстрируют мало видимых признаков, которые зачастую сами собой быстро спонтанно ослабевают до конца каждого активного сезона. Инфекция остается энзоотической внутри отдельных семей в связи с механической контаминацией медовых сот устойчивым микроорганизмом. Таким образом, можно ожидать рецидивов болезни в последующие годы. Болезнь широко распространена во всем мире и представляет собой усиливающуюся проблему в некоторых районах.

**Идентификация агента:** Исследование при помощи микроскопа с большим увеличением подходящих препаратов из остатков личинок на наличие многочисленных кокков ланцетовидной формы является достаточным для большинства практических целей, особенно когда данное исследование проводится квалифицированным персоналом.

Традиционно диагностика европейского гнильца пчел проводится путем выделения и идентификации возбудителя заболевания. Его можно достаточно легко отличить от других бактерий, ассоциированных с пчелами, ввиду того, что он очень требовательный к питательным средам при культивировании.

Выделенную бактерию можно идентифицировать и дифференцировать посредством простой реакции агглютинации в пробирке. Также пригодной является одноступенчатая традиционная полимеразная цепная реакция и полугнездная полимеразная цепная реакция. Также была разработана ПЦР в реальном времени. Данные методы позволяют проводить прямой анализ личинок, взрослых пчел и продуктов из меда.

**Серологические тесты:** Тесты для выявления антител у пчел отсутствуют.

**Требования к вакцинам:** Вакцины отсутствуют.

### А. ВВЕДЕНИЕ

Личинки пчел обычно умирают от европейского гнильца за 1-2 дня до запечатывания ячеек, или иногда вскоре после этого, и всегда до окукливания. Болезнь вызывается *Melissococcus plutonius* и она возникает в основном в период когда семьи быстро растут. Перед смертью большинство больных личинок изменяют свое естественное положение в виде колечка на дне ячейки. Пчелы-кормилицы быстро выявляют и удаляют многие личинки, оставляя пустые ячейки, произвольно расположенные среди остального

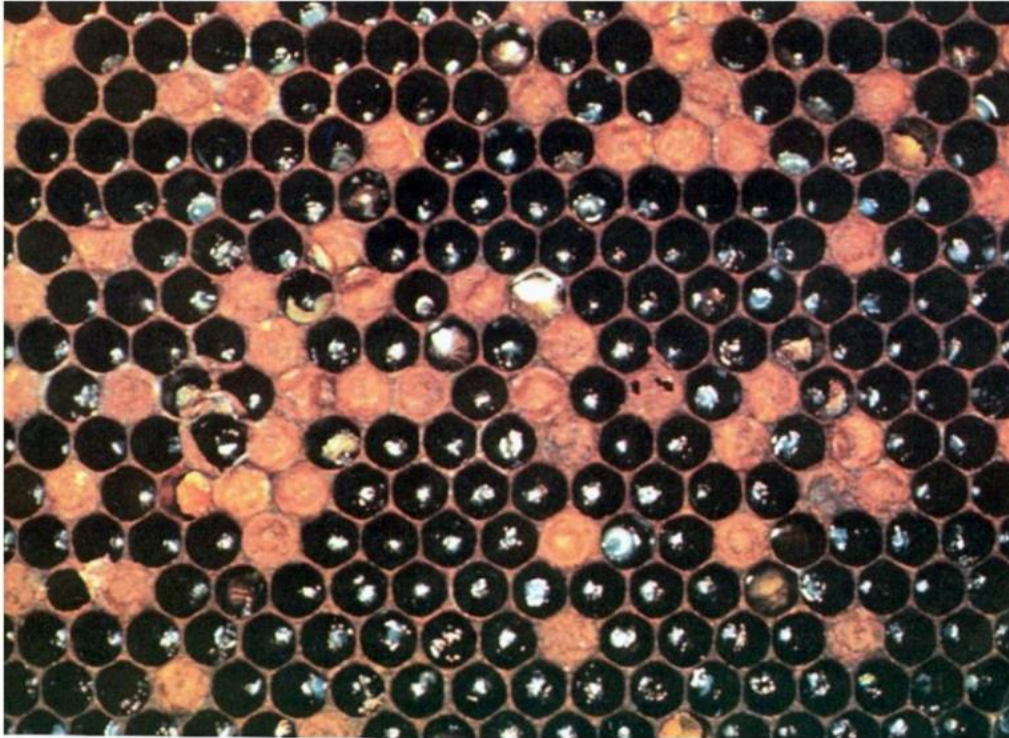
расплода. Некоторые зараженные личинки выживают, успешно образуют куколку и выходят из куколок как взрослые пчелы. Такие выжившие личинки способны к дефекации и их зараженные испражнения способствуют дальнейшему распространению болезни (Bailey, 1960).

Зараженные личинки, которых не обнаружили взрослые пчелы, и которые погибли, сначала становятся дряблыми и приобретают светло-желтый оттенок, затем становятся все более коричневыми, и в то же время они растворяются в полужидкую массу. Затем они высыхают и образуют темно-коричневые гнильцовые корочки, которые легко можно удалить из ячеек. Сильно пораженный расплод может иметь сильный затхлый или кислый запах, иногда кислотный, как уксус, но часто запах отсутствует.

Признаки болезни обычно спонтанно исчезают в зараженных семьях к концу активного сезона, но, как правило, возвращаются в последующие годы (Bailey & Ball, 1991; Forsgren et al., 2013). Географически, заболевание может иметь разную степень тяжести, от относительно легкой в одних районах, до крайне тяжелой в других (Forsgren et al., 2013).

## **1. Эпизоотология и клинические признаки**

К общим признакам заболевания, наблюдаемым в семье, относится неравномерное запечатывание ячеек, ячейки с крышечками и без крышечек, неравномерно распределенные в рамке с расплодом (Рисунок 1). Европейский гнилец обычно поражает молодых личинок, которые погибают в положении в виде колечка до запечатывания. Молодые пораженные личинки оседают на дно ячейки, они практически прозрачные, с видимой трахеей. Цвет личинок меняется от перламутрово-белого до желтого, и затем коричневого (Рисунок 2). Личинки погибают в возрасте 4-5 дней, редко в запечатанных ячейках. Зараженные личинки принимают неестественное положение в ячейках, сворачиваются вдоль стенок. В итоге личинки превращаются в сухую тягучую гнильцовую корочку, которую легко можно удалить из ячеек. Сильно пораженный расплод может иметь сильный затхлый или кислый запах, иногда кислотный, как уксус, но часто запах отсутствует, в зависимости от наличия сапрофитов. При поздней инфекации *Varroa*, до гибели семьи, расплод может выглядеть аналогичным образом, и это является важным для дифференциальной диагностики.



*Рис. 1. Клинические проявления европейского гнильца: неравномерное запечатывание расплода. Фото А.М. Аліппі.*



*Рис. 2. Зараженные личинки становятся дряблыми, их цвет меняется от желтого до коричневого, и в итоге они превращаются в темные гнильцовые корочки. Фото А.М. Аліппі.*

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

*Таблица 1. Тесты, доступные для диагностики европейского гнильца и их цели*

Метод	Цель					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельных ульев от инфекции перед перемещением	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Распространение инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
<b>Идентификация агента<sup>1</sup></b>						
<b>Выделение бактерии</b>	+++	+++	++	+++	+++	Не применимо
<b>Выявление антигена</b>	++	++	++	++	++	Не применимо
<b>Микроскопия</b>	++	++	++	+++	+++	Не применимо
<b>ПЦР</b>	+++	+++	+++	+++	+++	Не применимо
<b>ПЦР в реальном времени</b>	+++	+++	+++	+++	+++	Не применимо

+++ = рекомендуемый метод, валидированный для данной цели; ++ = подходящий метод, но может потребоваться дополнительная валидация;

+= может применяться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы строго ограничивают его применение;

-- не подходит для этой цели. ПЦР = полимеразная цепная реакция

### 1. Идентификация агента

Диагностика европейского гнильца основана на идентификации возбудителя заболевания и наличии клинических признаков. В данной главе представлен первоначальный обзор клинических признаков заболевания, далее описаны методы идентификации, которые требуют этапа предварительного культивирования или которые можно проводить непосредственно на отобранных образцах. Используемые методы включают микробиологическую характеристику, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), методы, основанные на антителах и микроскопические исследования. Химик-лаборант должен знать о разнице в чувствительности представленных методов, и должен выбрать наиболее подходящий метод для конкретной ситуации.

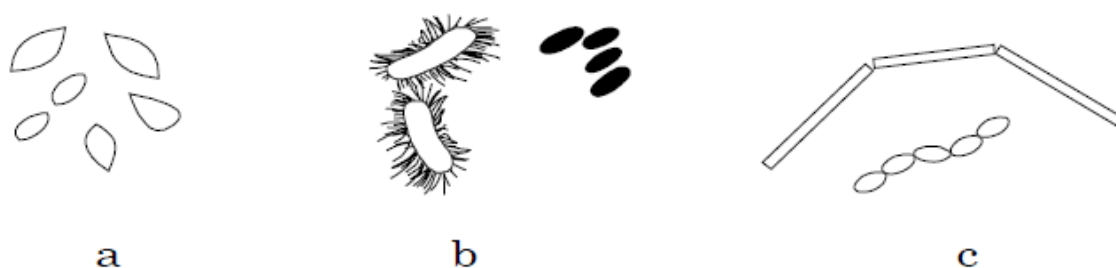
#### 1.1. Микроскопия

Лучше всего для диагностики подходят недавно погибшие личинки. До наступления разложения заболевшие личинки можно нанести в виде мазка на предметное стекло

<sup>1</sup> Рекомендуется комбинация методов идентификации агентов в отношении одного и того же клинического образца.

микроскопа или их можно разделить, отщипнув оболочку у центра тела двумя парами пинцетов, и затем разъединив их. Содержимое средней кишки остается на предметном стекле, все еще внутри студенистой прозрачной перитрофической мембраны. Она частично или почти полностью заполнена бактериями, которые легко разглядеть как матовые мелово-белые комочки. Содержимое средней кишки здоровых личинок, которые не так легко разделять, имеет золотисто-коричневый оттенок. У практически здоровых личинок может содержаться смесь бактерий и пыльцы. Средняя кишка здоровых личинок, в которой содержится много светлой пыльцы, может напоминать кишечник, заполненный бактериями.

Для бактериологического исследования петлю для посева, содержащую разведенную водную суспензию содержимого средней кишки, переносят на чистое предметное стекло микроскопа и смешивают с петлей для посева, содержащей 5% водный нигрозин. Ее наносят на поверхность в 1 или 2 см<sup>2</sup>, осторожно сушат над пламенем и исследуют непосредственно при помощи микроскопа с большим увеличением. Присутствие многочисленных кокков ланцетовидной формы, размером приблизительно 0,5 × 1,0 мкм, отдельно или в группах, и расположенных конец-в-конец в парах или коротких цепочках, почти достоверно свидетельствует о европейском гнильце. Также обычно присутствуют тонкие палочковидные бактерии с четырехгранными концами (Рисунок 3). Сходные препараты, приготовленные из водных суспензий целых погибших или разлагающихся личинок, вероятнее всего будут представлять собой беспорядочную массу бактерий, в которой будет трудно различить *M. plutonius*.

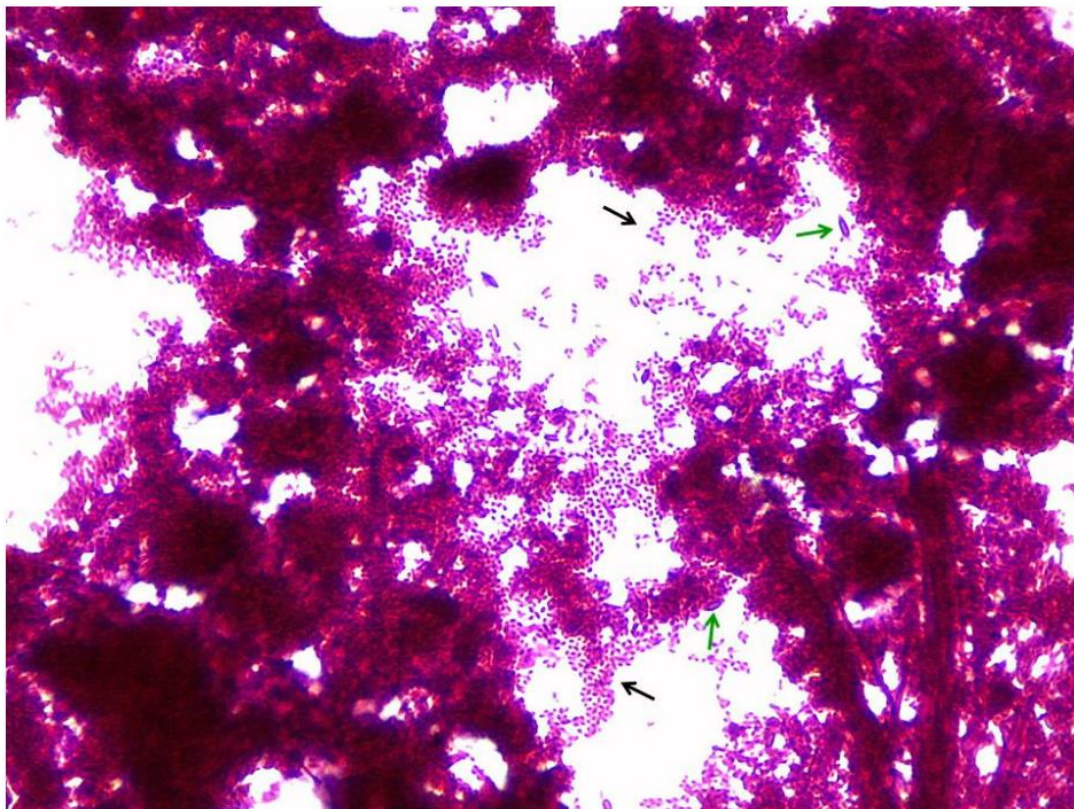


**Рис. 3.** Бактерии, ассоциированные с европейским гнильцом.

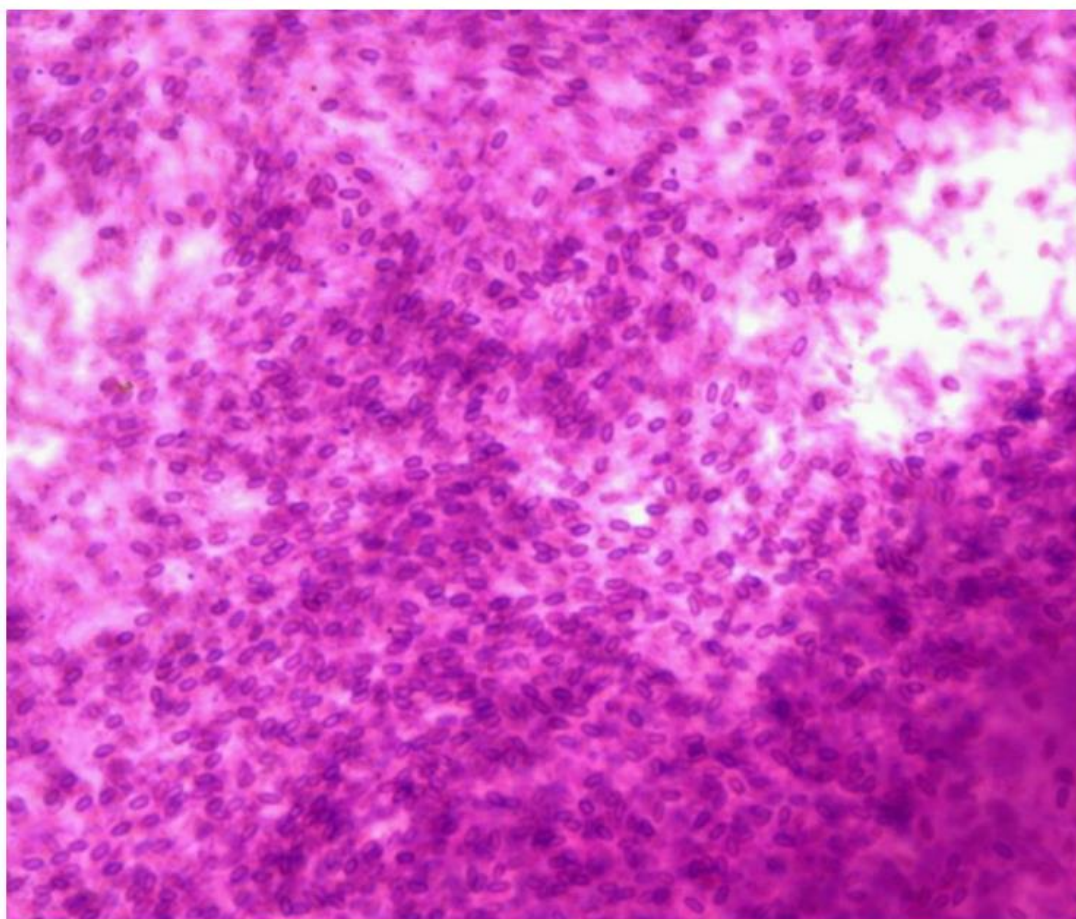
- (a) *Melissococcus plutonius*: возбудитель европейского гнильца бывает одиночным, либо представляет собой цепочки различной длины или скопления. Морфологически напоминает *Enterococcus faecalis*, общий вторичный возбудитель.
- (b) *Paenibacillus alvei*: вегетативные палочки размером 2,0-7,0 × 0,8-1,2 мкм с жгутиками; образует споры спорами, находящимися рядом. Как палочки, так и споры крупнее, чем у *Paenibacillus larvae* (см. американский гнилец пчел).
- (c) *Achromobacter eurydice*: тонкая палочка с четырехгранными концами *in vivo*, но может образовывать цепочки кокков *in vitro* в некоторых средах.

Кроме того, заболевшие личинки можно нанести в виде мазка на предметное стекло микроскопа и представить в лабораторию (Hornitzky & Wilson, 1989). Мазки фиксируют на предметном стекле нагреванием над пламенем горелки два или три раза и заливают 0,2% карбол-фуксином на 30 секунд. Смывают краситель и сушат или осторожно промокают фильтровальной бумагой до микроскопического анализа при × 1000 (Forsgren et al., 2013; Hornitzky & Wilson, 1989). Организмы признают *M. plutonius* если это кокки ланцетовидной формы, размером приблизительно 0,5 × 1,0 мкм, впитывают краситель равномерно и не обнаруживаются неокрашенных участков организма (Рисунок 4).

Считается, что споры продуцируются вторичным возбудителем *Paenibacillus alvei* если их размер составляет приблизительно  $0,8 \times 2,0$  мкм, и 0,2% карбол-фуксин окрашивает только споровые стенки (Hornitzky & Wilson, 1989) (Рисунок 5). Правильный отбор образцов расплода играет важную роль, так как даже в одной и той же рамке с расплодом *M. plutonius* обнаруживают главным образом у личинок, имеющих видимые признаки заболевания (Forsgren et al., 2013).



**Рис. 4.** Мазок, приготовленный из заболевшего расплода, окрашенного карбол-фуксином. Черные стрелки указывают на массу коккоидных/ланцетовидных организмов *Melissococcus plutonius*. Зеленые стрелки указывают на наличие спор вторичного возбудителя *Paenibacillus alvei*. Фото А.М. Alipri.



*Рис. 5. Споры Paenibacillus alvei в мазке, приготовленном из заболевшего расплода, окрашенного карбол-фуксином. Фото А.М. Alipri.*

## **1.2. Методы культивирования**

*Melissococcus plutonius* (типовой штамм NCIMB 702443) является преобладающей бактерией на ранней стадии заражения (Bailey & Collins, 1982a, 1982b). *Melissococcus plutonius* можно культивировать на среде (выраженная в г/литр или мл/литр), состоящей из: дрожжевого экстракта или определенных пептонов, 10; цистеина или цистина, 0,2-2,0; глюкозы или фруктозы, 10; растворимого крахмала, 10; 1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 при pH 6,6; и агара, 2 (Bailey & Collins, 1982a). Для выделения и культивирования *M. plutonius* также можно использовать агар M110 (Forsgren et al., 2013). Среду как правило автоклавируют партиями по 100 мл в бутылках с завинчивающейся крышкой при 116°C в течение 20 минут и разливают в чашки Петри непосредственно перед использованием. По выбору: Для предотвращения роста вторичных бактерий можно добавить стерилизованную посредством фильтрации налидиксовую кислоту (растворенную в 0,1 М NaOH) к конечной концентрации 3 мкг на мл после автоклавирования (Forsgren et al., 2013). На данные чашки делают посев штрихом с использованием разведенной водной суспензии заболевших личинок, или желательно, средней кишки заболевших личинок. Последние можно приготовить заранее и дать им высохнуть на предметном стекле, которое потом можно хранить до 18 месяцев при 4°C или -20°C. Все культурные среды должны подвергаться контролю качества и должны поддерживать рост *M. plutonius* из небольшого количества посевного материала. Справочный штамм также следует культивировать параллельно с подозрительными образцами для того чтобы удостовериться, что тесты работают правильно.

Приготовление и хранение высушенных мазков также уничтожает большинство вторичных организмов через несколько недель, не влияя на устойчивость *M. plutonius*. Данный организм наиболее эффективно выделяется при помощи введения десятичных разведений водной суспензии в агар, который поддерживали в расплавленном состоянии при 45°C, и который затем разливали в чашки. Чашки следует инкубировать в анаэробных условиях, например в анаэроостатах Файлдса и Макинтоша в среде, состоящей приблизительно из 5-10% двуокиси углерода (CO<sub>2</sub>) при 35°C. Небольшие белые матовые колонии *M. plutonius* обычно появляются в течение 4 дней. Эта бактерия в некоторой степени плеоморфна *in vitro*, и часто имеет палочковидную форму. Конечный показатель рН среды может достигать 5,5. Наименее прихотливые штаммы отбираются *in vitro*. Упрощенные или модифицированные формы среды затем поддерживают размножение, особенно серологически различимой группы *M. plutonius* из Бразилии (Allen & Ball, 1993), которая размножается в среде определенного химического состава (Bailey, 1984). CO<sub>2</sub> остается необходимым. Зараженная скошенная плотная питательная среда должна быть загерметизирована когда замечен рост бактерий, и затем ее можно хранить при 4°C до 6 месяцев. Также культуры можно суспендировать в среде, состоящей из 10% сахарозы, 5% дрожжевого экстракта и 0,1 М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 6,6, и затем лиофилизировать.

Некоторые другие бактерии часто ассоциируют или путают с *M. plutonius*. *Achromobacter eurydice* заселяет пищеварительную трубку взрослых пчел и встречается обычно в кишечнике здоровых личинок в небольших количествах. Она более многочисленная в личинках, зараженных *M. plutonius*. Заболеваемость *A. eurydice* у здоровых пчел очень низкая зимой и ранней весной, но она повышается летом. Она образует тонкие палочки с четырехгранными концами, которые могут расти отдельно или в цепочках. При выращивании в некоторых средах она иногда напоминает стрептококки, и ее путали с *M. plutonius*. Однако ее культуральные характеристики очень напоминают характеристики *Corynebacterium pyogenes* (Jones, 1975), и она плохо размножается в форме тонких палочек, в условиях, необходимых для культивирования *M. plutonius*.

*Enterococcus faecalis* очень напоминает *M. plutonius* морфологически и его часто с ним путали, хотя они имеют культуральные и серологические различия. В отличие от *M. plutonius*, он не остается жизнеспособным в течение длительного времени при высушивании, или сохраняется как механическое загрязнение в семьях пчел. Возможно, он заносится в улей взрослыми пчелами-сборщицами, и вызывает кислый запах, который иногда бывает при европейском гнильце.

*Enterococcus faecalis* хорошо растет *in vitro* в условиях, подходящих для *M. plutonius*, но его можно легко отличить по его способности расти в аэробных условиях. Он образует небольшие прозрачные колонии в течение 24 часов и является факультативным анаэробом. Он размножается в большинстве обыкновенных сред с наличием или отсутствием углеводов или CO<sub>2</sub>. Конечное значение рН в присутствии глюкозы составляет 4,0. *Enterococcus faecalis* редко превышает количество *M. plutonius* в личинках пчел, и его обычно можно разбавить. Если его не разбавить он производит достаточное количество кислоты для предотвращения размножения *M. plutonius in vitro*.

*Enterococcus faecalis* не размножается в личинках пчел при отсутствии *M. plutonius*, поэтому его наличие в больших количествах может служить возможным признаком европейского гнильца.

*Paenibacillus alvei* обычно встречается чаще, чем *E. faecalis* в семьях пчел, зараженных европейским гнильцом, но не всегда обязательно ассоциируется с данной болезнью, и поэтому не может выступать в качестве надежного признака болезни; фактически *P. alvei*



обнаруживали в колониях, зараженных американским гнильцом пчел, в качестве смешанных популяций бактериальных спор в остатках личинок. В семьях пчел *P. alvei* размножается только в разлагающихся остатках личинок и затем его споры часто преобладают над всеми другими бактериями, даже до их явного исключения. *Paenibacillus alvei* образует очень устойчивые споры и становится устойчивым в семьях пчел вместе с энзоотичным европейским гнильцом. Он является причиной характерного затхлого запаха. *Paenibacillus alvei* плохо размножается в условиях, необходимых для роста *M. plutonius in vitro*. Он продуцирует рост прозрачных колоний, некоторые из которых подвижны и движутся дугами на поверхности агара. Культуры имеют характерный затхлый запах, вызванный европейским гнильцом, когда присутствует данная бацилла. Споры образуются быстро.

### 1.3. Иммунологические методы

Для идентификации *M. plutonius* антисыворотку против отмытых культур *M. plutonius* можно получить на кроликах посредством либо внутривенных инъекций (Bailey & Gibbs, 1962), либо однократной внутримышечной инъекции 1 мл суспензии антигена, смешанной с одинаковым объемом неполного адьюванта Фрейнда.

Анализы проводят посредством реакции агглютинации в пробирках, содержащих суспензии бактерий в размере 0,25 мг сухой массы/мл. Конечные точки регистрируют после того как пробирки инкубировали в течение 4 часов при 37°C.

Был разработан твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА) для подтверждения наличия *M. plutonius* (Pinnock & Featherstone, 1983).

Недавно был разработан и имеется в продаже прибор для горизонтального проточного анализа для выявления европейского гнильца с использованием моноклональных антител. Он обеспечивает быструю подтверждающую диагностику инфицирования личинок медоносных пчел европейским гнильцом на месте за 10 минут без специального оборудования.

### 1.4. Полимеразная цепная реакция

Традиционную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) можно проводить на бактериальных колониях с подозрением на инфекцию, перенесенных и выращенных в жидкой питательной среде (Govan et al., 1998). Геномная ДНК готовится в соответствии со стандартными методами (Wilson, 1990). Экстракция ДНК с использованием коммерческих наборов согласно инструкциям производителя также является подходящим методом. Отрицательные и положительные контроли всегда должны тестироваться параллельно с тестируемыми образцами.

Осадок ДНК ресуспендируют в 50 мкл 1× ТЕ-буфера (10 mM Трис/HCl, pH 7,5; 1 mM ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота). Приблизительно 1-3 мкг геномной ДНК амплифицируют в 50 мкл реакционной смеси. Реакция ПЦР может быть проведена также с использованием личинок. Каждую личинку инкубируют отдельно в жидкой среде в течение ночи при 30°C в анаэробе, содержащем водород плюс 10% CO<sub>2</sub>. Два миллилитра каждого образца затем центрифугируют при 1000 g в течение 2 минут, и надосадочную жидкость центрифугируют при 10 000 g в течение 5 минут. Полученный осадок ресуспендируют в 100 мкл стерильной H<sub>2</sub>O и нагревают при 95°C в течение 15 минут. Один микролитр амплифицируют в 50 мкл смеси ПЦР. Помимо матричной ДНК данная смесь также содержит 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 пкмоль прямого (EFB-F) и обратного праймера (EFB-R; последовательности праймеров даны ниже) на мкл, 25 mM (каждый)

дезоксинуклеозидтрифосфат и 1 U Taq-полимеразы. Амплификация специфического ДНК-фрагмента происходит в термоциклере при следующих условиях ПЦР: этап при температуре 95°C (1 минута), 30 циклов при 93°C (1 минута), 55°C (30 секунд), и 72°C (1 минута); и заключительный цикл при 72°C (5 минут).

При работе со взрослыми пчелами и/или образцами меда рекомендуется использовать коммерческие наборы для экстракции ДНК (Govan et al., 1998).

Полугнездовая ПЦР была впервые разработана Djordjevic и др. (1998) и впоследствии ее усовершенствовали для чувствительного выявления *M. plutonius* в меде, пыльце, целых личинках и взрослых пчелах (McKee et al., 2003). В данном случае первые 50 мкл реакционной смеси содержат 5-30 нг геномной ДНК, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 100 нг праймеров MP1 и MP2, 5 мкл 10×ПЦР-буфера (100 mM Трис/HCl, pH 8,3; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl) и 1 U Taq-полимеразы. Условия амплификации состоят из начального цикла денатурации при 95°C в течении 2 минут с последующими 40 циклами денатурации (95°C, 30 секунд), ренатурации праймера (61°C, 15 секунд), удлинения праймера (72°C, 1 минута) с последующим дополнительным этапом удлинения длительностью в 5 минут при 72°C. Третий праймер MP3 используется совместно с MP1 для амплификации фрагмента ДНК из 1 мкл первичного ПЦР-продукта, полученного в предыдущей реакции. Условия ПЦР для полугнездовой ПЦР точно такие как описано выше за исключением того, что концентрация MgCl<sub>2</sub> снижена до 1,5 mM и температура ренатурации снижена до 56°C.

Молекулярная масса продуктов ПЦР определяется электрофорезом в 1,0-1,5% агарозном геле и окрашиванием бромидом этидия.

Высокоспецифичная дуплексная ПЦР, которая может выявлять *M. plutonius* непосредственно в заболевшей личинке, была разработана Agai с соавторами (2014). Она может различать штаммы, которые легко растут в культуре, от штаммов, которые требовательны к питательным средам при культивировании.

Методы ПЦР в реальном времени были разработаны и валидированы (Forsgren et al., 2013; Roetschi et al., 2008). Они обладают повышенной чувствительностью и специфичностью.

Ссылка	Название	Последовательность	Размер ПЦР-продукта
Govan et al., 1998	Праймер 1 Праймер 2	5'-GAA-GAG-GAG-TTA-AAA-GGC-GC-3' 5'-TTA-TCT-CTA-AGG-CGT-TCA-AAG-G-3'	831 пар оснований
Djordjevic et al., 1998; McKee et al., 2003	MP1 MP2  MP3	5'-CTT-TGA-ACG-CCT-TAG-AGA-3' 5'-ATC-ATC-TGT-CCC-ACC-TTA-3'  5'-TTA-ACC-TCG-CGG-TCT-TGC-GTC-TCT-C-3'	486 пар оснований 276 пар оснований
Roetschi et al., 2008	MelissoF MelissoR Зонд	5'-CAG-CTA-GTC-GGT-TTG-GTT-CC-3' 5'-TTG-GCT-GTA-GAT-AGA-ATT-GAC-AAT-3' 6'-FAM-CTT-GGT-TGG-TCG-TTG-ACMBGNFQ-3'	79 пар оснований
Budge et al., 2010	EFBFor EFBRev2 Зонд	5'-TGT-TGT-TAG-AGA-AGA-ATA-GGG-GAA-3' 5'-CGT-GGC-TTT-CTG-GTT-AGA-3' 5'-FAM-AGA-GTA-ACT-GTT-TTC-CTC-GTG-ACG-GT-TAMRA-3'	69 пар оснований

## 2. Серологические тесты

Тестов для выявления антител у пчел не имеется.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Вакцин не имеется.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Иллюстрации Karl Weiss, взятые из *Bienen-Pathologie*, 1984. Копия сделана с разрешения автора и Ehrenwirth-Verlag, Мюнхен (Германия).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ALLEN M.F. & BALL B.V. (1993). The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *J. Apic. Res.*, 32, 80–88.

ARAI R., MIYOSHI-AKIYAMA T., OKUMURA K., MORINAGA Y., WU M., SUGIMURA Y., YOSHIYAMA M., OKURA M., KIRIKAE T. & TAKAMATSU D. (2014). Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *J. Vet. Med. Sci.*, 76, 491–498.

BAILEY L. (1960). The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J. Insect Pathol.*, 2, 67–83.

BAILEY L. (1984). A strain of *Melissococcus pluton* cultivable on chemically defined media. *FEMS Microbiol. Lett.*, 25, 139–141.

BAILEY L. & BALL B.V. (1991). *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London, UK, and New York, USA.

BAILEY L. & COLLINS M.D. (1982a). Taxonomic studies on *Streptococcus pluton*. *J. Appl. Bacteriol.*, 53, 209–213.

BAILEY L. & COLLINS M.D. (1982b). Reclassification of *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; Comb. nov. *J. Appl. Bacteriol.*, 53, 215–217.

BAILEY L. & GIBBS A.J. (1962). Cultural characters of *Streptococcus pluton* and its differentiation from associated enterococci. *J. Gen. Microbiol.*, 28, 385–391.

BUDGE G.E., BARRETT B., JONES B., PIETRAVALLE S., MARRIS G., CHANTAWANNAKUL P., THWAITES R., HALL J., CUTHBERTSON A.G.S. & BROWN M.A. (2010). The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *J. Invertebr. Pathol.*, 105, 164–170.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.06.004>

DJORDJEVIC S.P., NOONE K., SMITH L. & HORNITZKY M.A.Z. (1998). Development of a semi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *J. Apic. Res.*, 37, 165–174.

FORSGREN E., BUDGE G.E., CHARRIERE J.-D. & HORNITZKY M.A.Z. (2013). Standard methods for European foulbrood research. *J. Apic. Res.*, 52 (1) 1–14. DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.12.

GOVAN V.A., BROZEL V., ALLSOPP M.H. & DAVISON S. (1998). A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1983–1985.

HORNITZKY M.A.Z & WILSON S.C. (1989). A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees. *J. Apic. Res.*, 28, 191–195.

JONES D. (1975). A numerical taxonomic study of Coryneform and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 87, 52–96.

MCKEE B.A., DJORDJEVIC S.P., GOODMAN R.D. & HORNITZKY M.A. (2003). The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie*, 34, 19–27.

PINNOCK D.E. & FEATHERSTONE N.E. (1984). Detection and quantification of *Melissococcus pluton* infection in honeybee colonies by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Apic. Res.*, 23, 168–170.

ROETSCHI A., BERTHOUD H., KUHN R. & IMDORF A. (2008): Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*, 39, 362–371.

WILSON K. (1990). Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G. & Struhl K., eds. Greene Publishing Association and Wiley Interscience, New York, USA, 241–245.

\*

\*\*

**NB:** Не существует Справочных лабораторий МЭБ по болезням пчел (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или обратитесь к веб-сайту МЭБ за самым последним списком: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации о диагностических тестах и реагентах против болезней пчел свяжитесь со Справочными лабораториями МЭБ.