

#### Глава 3.2.4

### НОЗЕМАТОЗ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ

---

#### РЕЗЮМЕ

*До настоящего времени описано два вида микроспоридий медоносных пчел: Nosema apis (Zander) и N. ceranae (Fries). Nosema apis – это паразит европейской медоносной пчелы (Apis mellifera), а Nosema ceranae – азиатской медоносной пчелы (Apis cerana) и европейской медоносной пчелы. Nosema ceranae недавно был обнаружен в нескольких географически разделенных популяциях европейской медоносной пчелы в Европе, Южной и Северной Америке и Азии. Патологические последствия N. ceranae у Apis mellifera недостаточно изучены. Оба типа в основном очень похожи, но N. ceranae, вероятно, более чувствителен к низким температурам и может воспроизводиться даже при высоких температурах. Nosema apis и N. ceranae проникают в эпителиальные клетки желудка взрослой медоносной пчелы. Заражение происходит при попадании спор во время кормления или грумминга. Болезнь распространена по всему миру, но лечение пчел может помочь предотвратить распространение инфекции в неинфицированные колонии пчел.*

*Уровень Nosema обычно повышается, когда пчелы находятся в ограниченном пространстве, например, осенью и зимой в холодном климате. Болезнь передается среди пчел при поедании контаминированного сотового материала и воды и через взаимное кормление; запасы меда и раздавленные инфицированные пчелы могут также играть роль в передаче болезни. Споры выбрасываются с фекалиями. Относительная важность фекалий, меда и трупов пчел в качестве резервуаров инфекционных спор до конца непонятна. Споры N. apis инактивируются уксусной кислотой или путем нагревания до 60 °C в течение 15 минут. Для большего эффекта такие обработки, инактивирующие споры на поверхности улья и сот, можно сочетать с добавлением антибиотика фузагиллина в корм пчелам для подавления инфекции у живых пчел. Многие страны запрещают использование обработки медоносных пчел антибиотиками.*

**Идентификация возбудителя:** *В некоторых острых случаях коричневые фекальные отметины можно увидеть на сотах и на передней части улья, а вблизи улья – больных или мертвых пчел. Однако в большинстве колоний не наблюдаются очевидных признаков инфекции, даже если болезнь распространена на уровне, вызывающем значительные потери при производстве меда и эффективности опыления. Зимой может наблюдаться повышение смертности пчел. У пораженных пчел желудок, который обычно коричневого цвета, может стать белым и очень хрупким. При микроскопическом исследовании (увеличение в 400 раз) гомогенатов содержимого брюшка пораженных пчел выявляют овальные споры Nosema spp., размером примерно 5-7 × 3-4 мкм с темными краями (Nosema ceranae немного меньше по размеру, но посредством световой микроскопии сложно провести видовую идентификацию, особенно в случае смешанных инфекций). Внутренне содержимое можно различить после окрашивания красителем Гимза. Споры Nosema spp. имеют характерный внешний вид: толстые неокрашенные стенки и окрашенное синим не имеющее ярко выраженных особенностей внутреннее пространство. Ядра внутри спор не видны. Окрашивание может помочь отличить Nosema spp. от других микробов, обнаруживаемых в пчелах.*

*Внешний вид спор Nosema spp. можно спутать с клетками дрожжей, спорами грибов, толстыми и известковыми тельцами или цистами Malpignamoeba mellificae. Последние*

похожи по размеру на споры *Nosema* spp. – 6-7 мкм в диаметре, но имеют совершенно круглую, а не овальную форму.

Положительную идентификацию можно провести только путем обнаружения типичных спор в желудках или фекалиях. Инфекции в очень легкой форме может быть трудно подтвердить. Степень инфекции определяется посредством подсчетом спор на решетке микроскопа и расчета среднего количества спор на площадь с последующей оценкой количества спор на одну пчелу. Идентификацию вида сложно провести при помощи световой микроскопии; для данной цели предпочтительна полимеразная цепная реакция.

**Серологические тесты:** Не существует применимых серологических тестов.

**Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам:** Не существует подобных биологических препаратов.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Микроспоридии *Nosema apis* (Zander, 1909) и *N. Ceranae* (Fries *et al.*, 1996) – паразиты, обитающие исключительно в эпителиальных клетках желудка взрослых пчел, и оба паразита распространены по всему миру (Klee *et al.*, 2007). На основании молекулярных данных микроспоридии сейчас включены в кластер Fungi (Adl *et al.*, 2005); таким образом, таксономически микроспоридии являются высоко-специфическими паразитирующими грибами. Заражение происходит путем проникновения спор с кормом (Bailey, 1981; Webster, 1993), при взаимном кормлении (Webster, 1993) или возможно через груминг волосков на теле (Bulla, 1997; Fries, 1993; Webster, 1993).

Оба паразита сначала поражают эпителиальные клетки в задней части желудка. Они обеспечивают полное развитие инфекции по всему эпителию в течение 2 недель. Болезнь передается между пчелами через употребление в пищу контаминированного материала сот и воды, а также при взаимном кормлении; запасы меда и погибшие инфицированные пчелы могут также играть свою роль при передаче болезни. Механизм инфицирования микроспоридийными паразитами основан на механическом потреблении полярного филамента, выступающего из прорастающей споры. При физическом усилии филамент проникает через клеточную мембрану хозяина в клетку хозяина (вентрикулярные эпителиальные клетки в случае *N. apis* и *N. ceranae*). Через филамент инфекционная спороплазма поступает в цитоплазму клетки хозяина, где начинается репликация и позже образование спор (Larsson, 1986). Аутоинфекция может возникать одновременно с новой инфекцией. Через три дня после заражения зрелые споры *N. apis* начинают развиваться в больших количествах, примерно через день то же происходит со спорами *N. ceranae* (Forsgren & Fries, 2010). У обоих паразитов скорость размножения зависит от температуры. Уровень *Nosema* spp. обычно повышается, когда пчелы длительное время находятся в ограниченном пространстве, что повышает риск дефекации в улье. Весной уровень инфекции может быстро повышаться, т.к. пчелы чистят соты для увеличивающегося откладывания яиц маткой (Bailey, 1955), и большее количество пчел попадают под влияние температур улья, при которых репликация паразита, по крайней мере *N. apis*, оптимальна (Lotmar, 1943). По сравнению с *N. apis* *Nosema ceranae* может расти лучше при немного более высоких температурах (Fenoу *et al.*, 2009).

Любая естественная защита колонии пчел против тяжелой инфекции паразитами зависит от размера колонии, а также от преобладающих погодных условий в начале осени предыдущего года (Stechе, 1985). Если эти условия были некомфортными, общая ожидаемая продолжительность жизни колонии снижается. Это может привести к преждевременной смерти пчел зимой или ранней осенью. В типичном случае истощения колонии вследствие заражения *Nosema* матка будет окружена только несколькими пчелами, беспорядочно ухаживающими за уже запечатанным расплодом.

В каплях фекалий споры могут сохранять свою жизнеспособность более 1 года (Bailey, 1962). Споры также могут оставаться активными до 4 месяцев после погружения в мед (White, 1919) и до 4,5 лет после попадания в трупы инфицированных пчел (Stecher, 1985). Споры могут потерять жизнеспособность через 3 дня после погружения в мед при температуре улья (Morgenthaler, 1939). Фекальная контаминация воска, особенно в сотах, используемых для выращивания потомства, или других внутренних поверхностей улья, обеспечивает достаточное количество среды для успешной передачи *N. apis* следующему поколению пчел и, вероятно, является первичным источником инфекции (Bailey, 1955). В случае *N. ceranae* выживаемость спор в различных ситуациях еще предстоит изучить, но, судя по всему, они противостоят дессикации и нагреванию лучше, чем споры *N. apis* (Fenoy *et al.*, 2009), поскольку они более чувствительны к минусовым температурам (Forsgren & Fries, 2010). Относительная важность фекалий, меда и трупов пчел в качестве резервуаров инфекционных спор пока полностью непонятна, но, по-видимому, температура может оказывать выраженный эффект на скорость, с которой споры теряют свою жизнеспособность, независимо от их среды (Morgenthaler, 1939).

Споры *N. apis* можно убить нагреванием оборудования или инструментов для улья до температуры минимум 60°C в течение 15 минут. Соты можно стерилизовать нагреванием до 49°C в течение 24 часов (Cantwell & Shimanuki, 1970). Данный способ нельзя использовать для *N. ceranae*, которые могут выживать при температурах до 60°C (Fenoy *et al.*, 2009). Газы из раствора 60% уксусной кислоты способны инактивировать споры *N. apis* в течение нескольких часов в зависимости от концентрации; более высокие концентрации даже более эффективны и убивают споры в течение нескольких минут (Bailey, 1957). Отсутствуют аналогичные данные для *N. ceranae*. Такие процедуры подпадают под юрисдикцию государственных органов контроля, и протоколы таких процедур в разных странах могут отличаться. Дезинфекцию можно провести, например, поместив раствор уксусной кислоты в чашки или на губки, которые могут впитывать жидкость. После дезинфекции после вспышки все соты нужно хорошо проветрить в течение минимум 14 дней перед использованием. Подавления инфекции *Nosema* также можно достичь с помощью скармливания колонии антибиотика фузагиллина в сахарном сиропе (Cantwell & Shimanuki, 1970). Использование антибиотиков для медоносных пчел запрещено во многих странах и в ЕС.

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

### 1. Идентификация возбудителя

При острой форме инфекции, особенно ранней весной, на сотах и на передней части улья можно заметить коричневые фекальные пятна (Bailey, 1967). Отсутствие сезонной превалентности и симптомов, таких как отложения фекалий регистрировались в случае *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008). У входа в улей можно увидеть больных и мертвых пчел, хотя в таком случае следует исключить другие причины, например отравление пестицидами и болезни взрослых медоносных пчел (такие как акарапидоз). Для обнаружения этих инфекционных болезней требуется микроскопическое обследование. Зимой в колониях, инфицированных *N. apis*, может наблюдаться высокая смертность пчел до полного вымирания. Большинство колоний, инфицированных *N. apis*, будут выглядеть нормально без явных признаков болезни, даже тогда, когда уровень заболеваемости будет достаточно высоким, чтобы привести к значительному снижению производства меда и эффективности опыления (Anderson & Giaccon, 1992; Fries *et al.*, 1996). Правильную диагностику болезни можно провести только путем микроскопического исследования брюшка и желудка взрослой пчелы, посредством молекулярных методов (полимеразная цепная реакция [ПЦР]) или посредством трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Для постановки диагноза инфекции *Nosema* spp. посредством микроскопии заднюю пару сегментов брюшка удаляют с помощью пинцета, чтобы обнажить желудок, вместе с мальпигиевыми сосудами, тонкой кишкой и прямой кишкой. Обычно желудок

бывает коричневого цвета, но после заражения *Nosema* spp, он становится белым и хрупким. Однако такой вид возможен и при других расстройствах кишечника, например, при поедании неперевариваемых запасов пищи, например, сиропа, содержащего активно растущие дрожжи. Для надежной поставки диагноза нужно изучить несколько пчел. Например, изучение общего образца из 60 пчел позволит выявить уровень инфицирования 5% с 95% вероятностью.

### 1.1. Микроскопия

Следует различать между инфекцией *Nosema* spp. и инфекцией, вызванной *Malpighamoeba mellificaе* (Webster, 1993). Достаточно часто при заражении *Nosema apis* наблюдаются признаки дизентерии. В случае инфекции *M. mellificaе* может присутствовать диарея, часто сернисто-желтого цвета с характерным запахом. Характеристики цист *M. mellificaе* описаны ниже. Могут происходить вторичные смешанные инфекции (Morgenthaler, 1939). Простой, неколичественный метод выявления инфекции *Nosema* spp. выглядит следующим образом: пчел для анализа нужно собрать у входа в улей, чтобы исключить попадания в выборку молодых пчел, вероятность заражения которых мала. Необходимо собрать минимум 60 пчел, чтобы обнаружить 5% больных пчел с 95% доверительным интервалом (Fries, 1993). До отправки в лабораторию пчел следует зафиксировать в 4% формалине, 70% этиловом спирте или заморозить в обычном морозильнике для предотвращения разложения и для улучшения их получения и организации тестов в лаборатории. Брюшки пчел отделяют и измельчают в 5 мл воды, затем добавляют воды до получения общего объема 1 мл на каждую пчелу в образце. Каплю суспензии помещают на предметное стекло под покровное стекло и изучают под микроскопом при 400-кратном увеличении с использованием светлопольной или фазово-контрастной оптики.

Споры будут примерно 5-7 мкм длиной и 3-4 мкм шириной (*Nosema ceranae* немного меньше, чем *Nosema apis*). Споры имеют овальную форму с темными краями. Их содержимое, состоящее из ядра, спороплазмы и полярной трубки, увидеть невозможно. Обычно в применении красителей нужды нет. Споры *Nosema* spp. следует дифференцировать от клеток дрожжей, спор грибов, жира и известковых включений и от цист *M. mellificaе*, которые имеют сферическую форму и примерно 6-7 мкм в диаметре.

При высушивании на воздухе зафиксированные в этаноле мазки инфицированных тканей окрашивают красителем Гимза (10% в 0,02 М фосфатном буфере) в течение 45 минут. Споры *Nosema* spp. будут иметь характерный вид с толстыми не окрашенными стенками и нечетким синим внутренним строением без видимых ядер. Клетки насекомых, споры грибов и другие простейшие, окрашенные таким образом, будут иметь более тонкие стенки, синюю/лиловую цитоплазму и пурпурного цвета ядро.

Чтобы точно и надежно определить средний уровень инфекции, можно использовать гемоцитометр (Cantwell, 1970) или можно исследовать каждую пчелу отдельно для получения пропорции инфицированных пчел. Можно использовать стандартную процедуру, пример которой представлен ниже:

Берут выборку взрослых рабочих медоносных пчел у входа в улей или с периферийных рамок, если погодные условия не позволяют пчелам вылететь. Брюшки 60 пчел размачивают в 5 мл воды с использованием ступки и пестика и добавляют 50 мл воды до получения общего объема по 1 мл на пчелу (5 мл добавляют позднее). Когда кусочки тканей становятся достаточно тонкими, суспензию фильтруют через 2 слоя муслина (тонкая ненатянутая ткань) в воронке, вставленной в градуированную центрифужную пробирку. После того как раствор станет однородным, отбирают образец для заполнения калиброванного объема под покровным стеклом счётной камеры (камера для подсчета кровяных телец). Через несколько минут споры осядут на дно камеры. Споры *Nosema* spp. прозрачные, но с очень четким темным краем, 5-7 мкм в длину и 3-4 мкм в ширину. Их лучше всего видно при увеличении в 400 раз с

использованием светлопольной или фазово-контрастной оптики. Подсчитывают количество спор в каждом квадрате. Если спора лежит на краю квадрата, подсчитывают только те споры, которые захватывают левый и верхний края квадрата, а не правый и нижний. Размер этих камер может варьироваться в зависимости от производителя, но, в основном, они состоят из двух отдельных камер, каждая определенного объема (0,1 мм<sup>3</sup>), содержащая четкую измерительную решетку площадью 1 мм<sup>2</sup>. Вся решетка состоит из больших квадратов 3 × 3, разделенных тройными линиями. Каждый большой квадрат дополнительно поделен на 16 меньших квадратов, разделенных двойными линиями, всего 144 квадрата. Споры считают в меньших квадратах площадью 1/25 мм<sup>2</sup>. Когда подсчет завершен, количество спор на пчелу в образце можно рассчитать по формуле:

$$Z = \alpha / \beta \times \delta \times 250\,000$$

Где

Z = количество спор на пчелу

$\alpha$  = общее количество определенных спор

$\beta$  = количество рассчитанных квадратов

$\delta$  = фактор разведения

Число 250 000 используется вследствие того, что объем каждого рассчитанного квадрата 1/250 000 мл, а в уравнении использовано среднее количество спор на рассчитанном квадрате. Если спор не видно, результат можно считать как «не обнаружено», но это не значит, что пчелы не заражены. Регуляторные органы должны принять решение относительно уровня инфекции, полезного для их целей.

Лабораторный метод одновременного обнаружения спор *Nosema* spp. и цист *M. mellificaе* состоит в отдельном изучении колоний с использованием 60 пчел на одну колонию. Суспензию брюшек мертвых пчел готовят путем измельчения с 5-10 мл воды; объем воды зависит от количества и состояния пчел. Суспензию нужно фильтровать для удаления дебриса, который может помешать исследованию, сначала через фильтр с размером пор 100 мкм, а затем через фильтр с размером пор 40 мкм. Части мальпигиевых сосудов пропускают через 100 мкм фильтр, но собирают на 40 мкм фильтре. Их помещают на предметное стекло или камеру для подсчета бактерий и рассматривают при 400-кратном увеличении. Только несколько сосудов заполнены цистами после заражения *M. mellificaе*. В таком случае не будет видна нормальная структура мальпигиевых сосудов. Положительным результатом может считаться только обнаружение цист внутри мальпигиевых сосудов, поскольку цисты *M. mellificaе* часто путают со спорами грибов и клетками дрожжей.

## 1.2. Культивирование

показано, что несколько линий клеток чешуекрылых восприимчивы к заражению как к *N.apis*, так и к *N.ceranae*. Восприимчивость не так давно продемонстрирована в отношении следующих линий клеток (Gisder *et al.*, 2010): MB-L2 (*Mamestra brassicae*), Sf-158 и Sf-21 (*Spodoptera frugiperda*), SPC-BM-36 (*Bombyx mori*), IPL-LD-65Y (*Lymantria dispar* и ВТI-Tn-5B1-4 (*Trichoplusia ni*). Все эти линии клеток можно получить в национальных банках культур клеток вместе с протоколами для поддержания и пассирования линий клеток. Однако имеющиеся в наличии протоколы пока еще не обеспечивают постоянного размножения *Nosema* spp. в культуре клеток. Таким образом, для получения суспензии спор пока невозможно избежать инфицирования пчел.

## 1.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Разработаны различные методы для дифференциации *N. apis* от *N. ceranae*. Ниже описывается мультиплексная ПЦР, с помощью которой можно одновременно точно выявить оба типа патогенов наряду с *Nosema bombi*.

### 1.3.1. Подготовка образца для ПЦР

Максимум 30 пчел помещают в фильтровальный пакет для измельчения. Добавляют 0,5 мл ддН<sub>2</sub>O (без ДНКазы/ РНКазы) на пчелу и гомогенизируют смесь в гомогенизаторе. Перед гомогенизацией возможна мгновенная заморозка в азоте для механической разбивки открытых клеток. Если отсутствует возможность использовать автоматику при получении гомогенного гомогената для разрушения тканей (замороженных тканей, если применялась мгновенная заморозка) пчел можно использовать пестик. 100 мкл жидкого гомогената переносят в микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 16 100 g в течение 3 минут для преципитации микроспоридий и другого клеточного материала. Супернатант сливают. Осадок замораживают посредством жидкого азота и измельчают пестиком до пульверизации (чтобы сломать открытые стенки споры *Nosema*), повторяют 2-3 раза, чтобы ДНК *Nosema* проникла в раствор. Экстрагирование ДНК можно легко выполнить с помощью стандартных процедур или коммерческих наборов. Финальный этап элюирования проводят в 100 мкл буфера АЕ.

### 1.3.2. Мультиплексная ПЦР

Для амплификации в мультиплексной ПЦР частичных фрагментов гена 16S rRNA (=SSU rRNAK) можно использовать следующие комбинации праймеров. Праймеры можно выбрать на основании анализа всех имеющихся данных секвенирования базы данных GenBank гена 16S rRNA *N.apis*, *N.bombi* и *N.ceranae*.

Mnceranae-F     прямой праймер: 5'-CGT-TAA-AGT-GTA-GAT-AAG-ATG-TT-3'

Mnapis-F        прямой праймер: 5'-GCA-TGT-CTT-TGA-CGT-ACT-ATG-3'

Mnbombi-F      прямой праймер: 5'-TTT-ATT-TTA-TGT-RYA-CMG-CAG-3'

Muniv-R         обратный праймер: 5'-GAC-TTA-GTA-GCC-GTC-TCT-C-3'

Следует помнить, что праймер Mnbombi-F содержит изменчивые сайты, чтобы учесть разнообразие последовательностей, наблюдаемое у данного вида.

#### **Размер продукта ПЦР:**

*N.ceranae*:     143 п.о.

*N.bombi*:      171 п.о.

*N.apis*:        224 п.о.

#### **Условия проведения ПЦР:**

1 мкл ДНК (са. 1 нг)

0,5 U ДНК-полимеразы Taq

2× реакционного буфера Taq (3 mM MgCl<sub>2</sub>)

0,3 mM каждого дНТФ (смесь дНТФ)

0,4 мкМ Mnceranae-F

0,4 мкМ Mnapis-F

0,5 мкМ Mnbombi-F

0,5 мкМ Muniv-R

В общем объеме 10 мкл

Амплификацию проводят в термоциклере при следующих условиях: первый этап денатурации 95°C в течение 2 минут, 35 циклов при 95°C в течение 30 секунд, при 55°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 60 секунд; заключительный этап удлинения при температуре 72°C в течение 5 минут. Визуализацию продуктов амплификации проводят при использовании стандартных процедур.

## 2. Серологические тесты

Серологических тестов не существует

## С. ТРЕБОВАНИЯ ДЛЯ ВАКЦИН И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ БИОПРЕПАРАТОВ

Биологических препаратов нет.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ADL S.M., SIMPSON A.G.B., LANE C.E., LUKEŠ J., BASS D., BOWSER S.S., BROWN M.W., BURKI F., DUNTHORN M., HAMPL V., HEISS A., HOPPENRATH M., LARA M., LE GALL L., LYNN D.H., MCMANUS H., MITCHELL E.A.D., MOZLEY-STANRIDGE S.E., PARFREY L.W., PAWLOWSKI J., RUECKERT S., SHADWICK L., SCHOCH C.L., SMIRNOV A. & SPIEGEL F.W. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 52 (5), 399–451.
- ANDERSON D.L. & GIACON H. (1992). Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *J. Econ. Entomol.*, 85, 47–51.
- BAILEY, L. (1955). The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee. *Ann. Appl. Biol.* 43, 379–389.
- BAILEY L. (1957). Comb fumigation for *Nosema* disease. *Am. Bee J.*, 97, 24–26.
- BAILEY L. (1962). Bee diseases. In: Report of the Rothamsted Experimental Station for 1961, Harpenden, UK, 160–161
- BAILEY L. (1967). *Nosema apis* and dysentery of the honey bee. *J. Apic. Res.*, 6, 121–125.
- BAILEY L. (1981). *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London, UK.
- BULLA (1977). In: *Comparative Pathobiology*. Vol. 1: Biology of Microsporidia (1976); Vol. 2: Systematics of the Microsporidia, Lee A. & Cheng T.C., eds. Plenum Press, New York, USA, and London, UK.
- CANTWELL G.E. (1970). Standard methods for counting *nosema* spores. *Am. Bee J.*, 110, 222–223.
- CANTWELL G.E. & SHIMANUKI H. (1970). The use of heat to control *Nosema* and increase production for the commercial beekeeper. *Am. Bee J.*, 110, 263.
- FENOY S., RUEDA C., HIGES M., MARTÍN-HERNÁNDEZ R. & DEL AGUILA C. (2009). High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (21), 6886–6889. Epub 2009 Sep 4.
- FORSGREN E. & FRIES I. (2010) Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.*, 170, 212–217.
- FRIES I. (1993) *Nosema apis* - a parasite in the honey bee colony. *Bee World*, 74, 5–19.
- FRIES I., CHAUZAT M.-P., CHEN Y.-P., DOUBLET V., GENERSCH E., GISDER S., HIGES M., MCMAHON D.P., MARTÍN-
- HERNÁNDEZ R., NATSOPOULOU M., PAXTON R.J., TANNER G., WEBSTER T.C. & WILLIAMS G.R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. In: *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*, Dietemann V., Ellis J.D. & Neumann P., eds. *J. Apic. Res.*, 52 (1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>
- FRIES I., FENG F., DA SILVA A., SLEMENDA S.B. & PIENIAZEK N.J. (1996). *Nosema ceranae* n.sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular

characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.*, 32, 356–365.

GISDER S., MÖCKEL N., LINDE A. & GENERSCH E. (2010). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environment. Microbiol.* 13, 404–413.

HIGES M., MARTÍN-HERNANDEZ R., BOTIAS C., BAILON E.G., GONZALES-PORTO A., BARRIOS L., DEL NOZAL M.J.,

PALENCIA P.G. & MEANA, A. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environment. Microbiol.*, 10, 2659–2669.

KLEE J., BESANA A.M., GENERSCH E., GISDER S., NANETTI A., TAM D.Q., CHINH T.X., PUERTA F., RUZ J.M., KRYGER P.,

MESSAGE D., HATJINA F., KORPELA S., FRIES I., PAXTON R.J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.*, 96, 1–10.

LARSSON R. (1986). Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. *Progr. Protistol.*, 1, 325–390.

LOTMAR R. (1943). Über den Einfluss der Temperatur auf den Parasiten *Nosema apis*. *Beih. Schweiz. Bienenztg.*, 1, 261–284.

MARTIN-HERNANDEZ R., MEANA A., PRIETO L., SALVADOR A.M., GARRIDO-BAILON E. & HIGES M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 6331–6338.

MORGENTHALER D. (1939). Die ansteckende Frühjahrsschwindsucht (*Nosema*-Amoeben-Infektion) der Bienen. Erweiterter Sonderdruck aus der Schweizerischen Bienenzeitung Heft 2, 3 und 4.

STECHE W. (1985). Revision of ZANDER & BOTTCHE. Nosematose. In: *Krankheiten der Biene, Handbuch der Bienenkunde*.

WEBSTER T.C. (1993). *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.*, 133, 869–870.

WHITE G.F. (1919). *Nosema Disease*. United States Department of Agriculture Bull., No. 780, 54 pp.

ZANDER E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münch. Bienenztg.* 31, 196–204.

\* \*

\*

**Примечание:** Существуют Референтные лаборатории по болезням пчел (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным*, самый последний список см. на веб-сайте МЭБ: [www.oie.int](http://www.oie.int)).

Для получения дополнительной информации о тестах и реактивах для диагностики болезней пчел просьба связаться со Справочными лабораториями МЭБ