

ГЛАВА 3.2.5.

ЗАРАЖЕНИЕ МАЛЫМ УЛЬЕВЫМ ЖУКОМ

AETHINA TUMIDA

РЕЗЮМЕ

Малый ульевого жука, впервые описанный энтомологом Британского музея естественной истории Andrew Murray в 1867 г. и отнесенный к семейству жуков-блестянок (Coleoptera: Nitidulidae), является паразитом и сапрофитом в колониях медоносных пчел. Взрослые особи и личинки малого ульевого жука пожирают расплод медоносных пчел, мед и пыльцу, вызывая тем самым гибель расплода, ферментацию меда и разрушение сот.

Жуки могут стимулировать процессы разрушения структуры всего гнезда и вынудить взрослых особей покинуть его. Размеры ущерба, вызванного жуком, в большей степени среди всех прочих факторов, зависят от климатических условий. Малый ульевого жука является более актуальной проблемой в регионах с теплым климатом и высокой влажностью, чем в регионах с преобладанием низких температур и пониженной влажностью. Малый ульевого жука может быть серьезной проблемой на предприятиях по производству меда, где хранящиеся соты, мед и восковые крышечки являются потенциальным кормом для жука и местом для его размножения. Для развития жука от стадии яйца до взрослой особи необходимо 3-12 недель в зависимости от влажности, температуры и доступа к кормам. Взрослые летающие особи активно заражают колонии медоносных пчел, разной численности и разных размеров.

Идентификация возбудителя: *Распознать заражение малым ульевым жуком можно либо косвенно, оценив ущерб, нанесенный жуком всей колонии, либо напрямую, обнаружив яйца, личинки и взрослых особей. Диагностировать поражение на ранней стадии можно, открыв колонию и обнаружив взрослых жуков под крышкой на нижней стенке или прячущихся в сотах (особенно по краям). Для точной диагностики в лаборатории необходимо морфологическое обследование под стереомикроскопом. В качестве подтверждающего тестирования можно воспользоваться полимеразной цепной реакцией в реальном времени.*

Серологические тесты: *Серологические тесты не применяются.*

Требования к вакцинам: *Вакцин нет.*

А. ВВЕДЕНИЕ

Малый ульевого жука (далее «жук»), *Aethina tumida*, отряда жесткокрылых (Coleoptera), семейства блестянок (Nitidulidae) (описанный впервые в 1867, Murray) родом из стран Африки, расположенных к югу от Сахары (Herburn and Radloff, 1998), но за последние десятилетия его удалось обнаружить в различных уголках мира. Впервые *Aethina tumida* был обнаружен в США в 1996 г. С тех пор жук распространился в Канаде и в ряде стран Южной и Центральной Америки. *Aethina tumida* обнаруживали в Египте, Австралии и на

Филиппинах. Недавно были отмечены случаи в южных частях Италии (МЭБ WANIS, внесение данных в базу 06\10\2016).

1. Жизненный цикл

Взрослые особи малого ульевого жука спариваются в колонии, и самка откладывает несколько яиц (типичные кладки) в небольших щелях или внутри запечатанных ячеек расплода (Cutbertson et al., 2013; Ellis 2005; Lundie, 1940). В некоторых ситуациях в пределах одной колонии может появиться более 1 тысячи взрослых жуков (Elzen et al., 1999). Взрослые особи могут выживать до 6 месяцев, а самки за весь свой жизненный цикл могут отложить около 1000 яиц (Lundie, 1940), хотя в своих исследованиях Hood назвал верхний предел на уровне 2000 яиц. Активное появление яиц связано с относительной влажностью, при влажности менее 50% яиц появляется меньше. На 1-6 день из яиц появляются личинки (в основном в течение 3 дней), которые пожирают пыльцу, мед и расплод пчел (Lundie, 1940, Svhmilke, 1974). Взрослые жуки могут кормиться через рабочих пчел посредством трофоллаксиса, особенно пока их удерживают в охраняемой пчелами «тюрьме» (Ellis, 2005). Личинки развиваются около 8-29 дней в зависимости от доступности корма и температурных условий (By Guzman and Frake, 2007; Ellis et al., 2002b; Lundie, 1940; Schmolke, 1974). Затем личинки достигают стадии миграции и покидают колонию для дальнейшего окукливания в почве, окружающей колонию (Lundie, 1940). Окукливание длится 2-12 недель в зависимости от температуры и влажности почвы (Ellis et al., 2004). Появляющиеся взрослые особи покидают почву и улетают на поиски новых колоний-хозяев, завершая тем самым жизненный цикл. В условиях лаборатории малый улевой жук выживает и размножается на созревших и гнилых фруктах (Buchholz, 2008).

2. Воздействие вредителя

Малый улевой жук редко представляет серьезные сложности в странах Африки, расположенных к югу от Сахары. Остается не совсем понятным очевидная разница между воздействием жука на колонии в исходных для него условиях обитания и новых условиях (Ellis and Herburn, 2006). Возможно, причины в качественно ином поведении подвидов медоносных пчел Африки и Европы, в различных методиках пчеловодства, разных климатических условиях и/или, среди прочих вероятных гипотез, удаленность естественных врагов (Hood 2004, Neumann and Elzen, 2004).

Хотя ущерб для колоний от взрослых жуков относительно небольшой, взрослые особи могут вынудить колонии покинуть улей (т.е. взрослые пчелы полностью покидают гнездо, Ellis et al, 2003). Если это не предотвратить, то практика кормления личинок жука приведет к ферментации хранящегося меда, обернется серьезными повреждениями сот и приведёт к полному разрушению структуры гнезда (Lundie, 1940). На предприятиях, занимающихся экстракцией меда, заражение этим паразитом может привести к серьезным экономическим потерям. Условия внешней среды, которые обычно требуются для процедуры экстракции меда, такие как высокая температура и влажность, являются оптимальными для развития жука.

В остатках органических веществ или под вставками улья вредитель может размножаться латентно, неинтенсивно, при этом никаких признаков ущерба для колонии видно не будет (Spiewok and Neumann, 2008).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ

Таблица 1. Методы диагностики заражения *Aethina tumida* и их цели

Метод	Цель					
	Свобода популяции от паразита	Свобода отдельной особи или пчелиного гнезда от паразита до передвижения	Вклад в стратегии искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекации - надзор	Иммунный статус отдельных особей или популяция после вакцинации
Идентификация возбудителя						
Морфология	+++	+++	+++	+++ (взрослые) + (личинки)	+++	n/a
ПЦР в реальном времени	++	++	+++	++	+	n/a

+++ = рекомендуемый метод, валидированный для указанной 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; n/a = цель не применяется.

ПЦР =полимеразная цепная реакция;

1. Обнаружение в полевых условиях

1.1. Взрослые жуки

Первым признаком инфекации малым ульевым жуком является появление взрослых жуков (Рисунок 8). Взрослые особи достигают около 5 мм в длину и 3 мм в ширину, самки значительно длиннее самцов (Ellis et al., 2001). Цвет взрослых особей варьируется от тёмно-коричневого до черного (сразу после вылупления чуть светлее). Во время обследования взрослые жуки избегают солнечного света, можно увидеть, как они в попытке спрятаться, разбегаются в укрытие по углам или убегают за соты. Взрослых особей можно часто спутать с другими видами блестянок, которые в том числе связаны с колониями (см. Раздел 2.2.3. ниже для подробной информации; также Neumann and Ritter, 2004 and Ellis et al, 2008).

1.2. Яйца, личинки и куколки жука

Рис. 1. Яйца малого ульевого жука. Фотография Josephine Ratikan, Университет Флориды



Яйца малого ульевого жука белые (Рис.1), приблизительно 1,4 x 0,26 мм (длина x ширина); приблизительно 2\3 от размера яйца медоносной пчелы, их откладывают группами в трещинах, на нижней стенке улья, на сотах или под крышками запечатанных ячеек расплода. Личинки (Рисунок 2) беловатого оттенка, до 1 см в длину (стадия миграции), имеют три пары лапок и наросты в верхней части. Норки личинок можно обнаружить в восковых сотах (Lundie, 1940) или в остатках органических веществ (Speiwok and Neumann, 2006). Заражение личинками обычно сопровождается гнилостным запахом, связанным с гибелью расплода медоносных пчел и\или ферментацией хранящегося меда. Личинки на стадии миграции часто оставляют маслянистые пятна (слизь) внутри и снаружи колонии (Рисунок 3). Оказавшись на земле, личинки выкапывают в почве небольшие камеры для окукливания (Рисунок 4), глубиной 1-20 см (Pettis and Shimanuki, 2000), перерождаются в куколок (Рисунок 5, цвет которых может варьироваться от темнокоричневого до беловатого, в зависимости от возраста, приблизительные размеры 5 мм в длину и 3 мм в ширину). Затем куколки превращаются во взрослых жуков. Большинство личинок прокладывают ходы в почве, на расстоянии <180 см от колонии (Pettis and Shimanuki, 2000).

Рис. 2. Вид сверху (слева) и вид снизу (справа) личинок малого ульевого жука. Фотография Josephine Ratikan, Университет Флориды

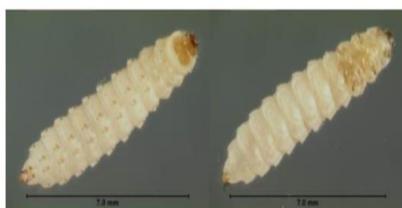


Рис.3. Разрушение сот, связанное с питанием и ползанием личинок малого ульевого жука. Обратите внимание на «слизь» на рамке (т.е. восковые соты выглядят влажными и блестящими). Это связано с ферментацией меда, который разносится по сотам в результате переползаний личинок. Личинок жука можно заметить в ячейках в центре сот, где изначально находился расплод. Фотография взята в Университете Джорджии.



Рис. 4. Личинки малого ульевого жука, проложившие ходы в почве и высокбленные пустоты для дальнейшего окукливания. Фотография взята в Университете Джорджии.



Рис.5. Куколки малого ульевого жука (вид снизу). Фотография Lyle Buss, Университет Флориды.



Сложно обнаружить яйца жука в колонии, особенно при незначительной инфестации. Однако можно заглянуть в трещины\расщелины вокруг гнезда или в запечатанные восковыми крышками ячейки расплода, при поражении на них отмечают небольшие отверстия, свидетельствующие о том, что самки жуков пробили крышки и отложили яйца внутри ячейки.

Вокруг колонии можно заметить, как куколки малого ульевого жука пробрасывают почву в поисках камер для окукливания, или самих куколок.

1.3. Визуальная инспекция колоний

При мониторинге колоний медоносных пчел на наличие малого ульевого жука обследование улья позволяет обнаружить инфестацию на ранней стадии. Взрослых жуков можно обнаружить прячущимися внутри ячеек сот и в остатках органических веществ на дне колонии. Подробные инструкции для обследования колоний составлены и скорректированы Ellis et al., (2002a) и Ellis and Delaplane (2006). Данный метод можно использовать для поиска взрослых жуков и личинок, если имеет место умеренная или обильная инфестация личинками.

Рис.6. Инспектирование колоний на наличие взрослых особей малого ульевого жука. Инспектор справа вытряхнул пчёл на фанеру. Обе поверхности рамочных сот ударяют о дерево, чтобы выбить жуков из ячеек. Инспектор слева осматривает взрослых пчел и использует ротовый аспиратор для сбора жуков. Фотография Keith Delaplane, Университет Джорджии.



Примечания:

- i) Если требуются конкретные числовые данные, то процедуру лучше всего осуществлять двоим: один работает с колонией, второй собирает жуков. Если же единственной задачей является выявление жуков, то нужен только один человек.
- ii) Некоторые жуки неизбежно улетают или прячутся во время процедуры. Предположительно количество ускользнувших жуков невелико (<5%).
- iii) Данная процедура наилучшим образом подходит для количественного подсчёта взрослых жуков. Однако она позволяет, в том числе, обнаружить и личинки.
 - a) Поместить лист непрозрачного пластика (приблизительно 2x2 м, предпочтительно белого или светлого цвета) или фанеры перед колонией, которую вы ходите проверить на наличие жуков.
 - b) Слегка окурить колонию дымом.
 - c) Снять крышку колонии и ударить крышкой по фанере. Это необходимо, чтобы вытряхнуть всех взрослых жуков, цепляющихся за крышку.
 - d) Второй инспектор (сборщик жуков) должен тщательно перебрать пчел (можно рукой или небольшой палочкой) и собрать всех взрослых жуков с помощью аспиратора. Всех пчел на фанере следует проверить, поскольку группы пчел могут легко скрыть жуков (Рисунок 6).
 - e) Переместить внешнюю рамку в положение верхней надставки (т.е. в верхнюю ячейку с пчелами) и стряхнуть пчел из рамки на фанеру.
 - f) Сборщик жуков должен повторить этап d.
 - g) Когда пчел вытряхнут из рамки, рамку следует перевернуть другой стороной и снова ударить по фанере, чтобы вытряхнуть жуков из сот. Этот этап следует повторить 2-3 раза для обеих сторон рамки.
 - h) Сборщик жуков должен повторить этап d.
 - i) Инспектор, работающий с колонией, должен повторить этап vii для всех рамок в верхней надставке и ударить пустую надставку о фанеру. Этот этап следует повторить для всех надставок, всех рамок и нижней стенки колонии.

1.4. Обследование колоний с использованием вставок и ловушек

Возможно применение менее трудоемкого варианта диагностики с использованием вставок в ульях. В таких вставках должны быть проделаны отверстия, позволяющие жукам спрятаться в углублениях, но не допускающие попадания пчел. Эти вставки можно расположить у нижней стенки колонии. Для обнаружения жуков поместить кусок гофрированного картона или схожего материала (размер 15 см x 15 см), одна поверхность снята, чтобы открыть волнистые полосы, на нижней стенке улья гофрированной стороной вниз. Накрыть деревянной пластиной, соответствующей по размеру рамкам у нижней стенки. Оставить вставки в колонии на ≤ 3 дня, снять и проверить на наличие взрослых особей и личинок. Есть вариант использования похожей пластмассовой вставки для выявления взрослых жуков в масштабах пасеки. Данный подход помогает прогнозировать уровни инфекации взрослыми жуками (Schaefer et al, 2008). Для уничтожения взрослых особей в этих вставках можно воспользоваться различными инсектицидами.

Рис.7. Пластиковая вставка для выявления взрослых особей малого ульевого жука. В пластиковой вставке имеются небольшие отверстия (слева), в которых прячутся взрослые жуки, после того, как эти вставки помещают на нижнюю стенку (на дно) колонии, через вход в колонию (справа). Вставку необходимо использовать вместе с обычной твердой нижней стенкой (дно), а не защищенной. Фотографии James Ellis (слева) и Stephanie Kimball (справа), Университет Флориды.



Также можно воспользоваться имеющимися в продаже ловушками для малого ульевого жука, которые вставляются в колонии в соответствии с инструкциями производителя. Специальных рекомендаций по ловушкам здесь не дается, поскольку существует множество вариантов ловушек со схожей эффективностью. Большинство ловушек для малого ульевого жука размещают на дне колонии, в пределах рамки колонии или между верхней частью (верхняя балка) двух рамок в колонии. Обычно в ловушки добавляют яблочный уксус в качестве приманки для взрослых особей малого ульевого жука. Дополнительно в качестве поражающего вещества добавляют минеральное или растительное масло. Взрослые жуки переползают в ловушку, тем самым облегчая их выявление. Ловушки можно использовать в колониях для регулярного мониторинга на наличие взрослых особей.

2. Лабораторная идентификация

Быстрая и надежная диагностика является чрезвычайно важной для реализации санитарных мер и недопущения распространения вредителя на незараженных территориях.

Полевые пробы, вызывающие подозрение, следует отправлять в государственные лаборатории для подтверждения идентификации *Aethina tumida*. Морфологическая идентификация - быстрый и недорогой способ, не требующий сложного оборудования. Подтверждающее тестирование можно провести молекулярными методами (в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР)), и оно особенно полезно для выявления личинок или при повреждении образцов.

2.1. Особые меры предосторожности при работе с пробами

Пробы, которые подлежат идентификации, собирают либо в самих ульях медоносных пчел, либо возле ульев (например, в колониях, с оборудования для пчеловодства или из клеточек для пчелиной матки).

Пробы, вызывающие подозрение, следует перед отправкой в лабораторию первоначально обработать в 70% растворе спирта с целью умерщвления паразитов. Не следует применять денатурированный спирт, когда используют молекулярные методы, поскольку это может подавить ПЦР. В качестве альтернативы образцы можно подержать при температуре -20°C в течение ночи для уничтожения вредителей.

В момент прибытия в лабораторию упаковку следует снять в специальных условиях биозащиты. Если обнаружено, что вредители в образцах живы по прибытии в лабораторию, то до того, как начать работать с присланным материалом его следует поместить на час в температуру -80°C. Такая обработка обездвиживает вредителей, которых далее можно хранить в 70% растворе спирта.

2.2. Морфологическая идентификация взрослых особей и личинок

Цель данного метода тестирования – идентификация *Aethina tumida* путем обследования внешнего вида взрослых особей и/или личинок в лаборатории. Процедура включает визуальный осмотр образцов с отметкой морфологических характеристик, отличающих *Aethina tumida* от других видов блестянок и личинок восковой моли, часто обнаруживаемых в колониях медоносных пчел, клеточках пчелиной матки или на оборудовании для пчеловодства.

2.2.1. Оборудование и реагенты

Для морфологической идентификации *Aethina tumida* необходимы классические энтомологические материалы, включая стереомикроскоп (или увеличитель), энтомологические щипчики, чашки для выпаривания (стеклянные, пластиковые или фарфоровые) или чашки Петри, пробирки с крышками для хранения образцов вредителей, 70% раствор спирта (не денатурированный).

2.2.2. Процедура тестирования

Общее наблюдение за образцами осуществляется при помещении их в чашку и проверке на однородность (с помощью увеличителя или стереомикроскопа). Если все наблюдаемые паразиты одного типа, то пробы можно перерабатывать дальше. Если они отличаются неоднородностью (т.е. присутствует несколько видов), то следует взять пробы каждого обнаруженного вида для дальнейшей идентификации. Если возможно, отобрать неповрежденные пробы для дальнейшего анализа с помощью энтомологических щипцов.

Необходимо провести микроскопическое обследование при различных увеличениях, чтобы визуально обнаружить критически важные критерии идентификации (см. Раздел 2.2.3 ниже). После обследования жуков хранят в 70% растворе спирта.

2.2.3. Руководства для идентификации *Aethina tumida*

Необходимо провести отличия между *Aethina tumida* и другими видами жуков-блестянок, которые не являются вредителями и могут быть обнаружены в ульях медоносных пчел. Например: *Cychramus luteus*, обнаружен в Европе, питается в основном пыльцой (Neumann & Ritter, 2004), *Carpophilus lugubris*, обнаружен в ульях Италии (Marini et al., 2013), и *Glischrochilus fasciatus*, *Lobiopa insularis*, *Carpophilus dimidiatus* and *Epuraea corticina* обнаружены в ульях США (Ellis et al., 2008).

Личинок *Aethina tumida* можно спутать с меньшими по размеру личинками малой восковой моли *Achroia grisella* или с личинками большой восковой моли *Galleria mellonella*. Этих чешуекрылых обычно обнаруживают в колониях и на оборудовании для пчеловодства.

2.2.3.1. Взрослые особи

Идентификация взрослых особей *Aethina tumida* основывается на следующих морфологических критериях (Рисунок 8 и 9).

1. Тельце разделено на три части: головка, грудной отдел и брюшко.
2. Три пары лапок
3. Надкрылья = твердые передние крылья
4. Размеры: длина - 5-7 мм, ширина 3-4,5 мм (приблизительно)
5. Цвет: красновато-коричневый при вылуплении, от темно-коричневого до черного у взрослых особей. Светлая полоска вокруг грудного отдела и брюшка (необязательно). Примечание: Цвет может меняться в зависимости от условий внешней среды и сохранности проб.
6. Булавовидные усики с компактными сегментами
7. Острые заднебоковые края пронотума
8. Надкрылья полностью не покрывают брюшко. Брюшко частично закрыто надкрыльями: видимая верхушка (задний кончик брюшка)

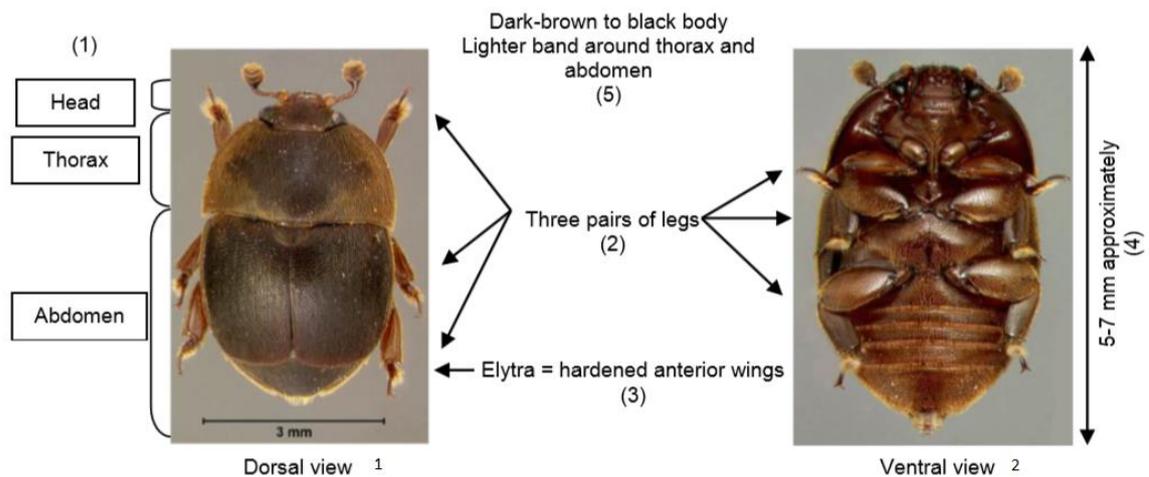


Рис.8. Малый ульевой жук *Aethina tumida*.

Фотографии Lyle Buss (слева) и Josephine Ratikan (справа),

Университет Флориды.

1. Вид сверху
2. Вид снизу

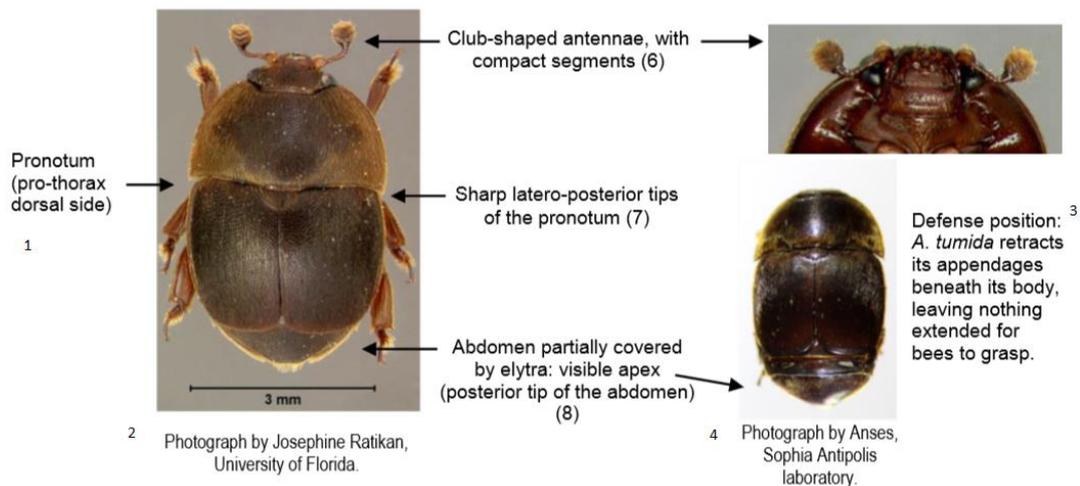


Рис.9. Малый ульевой жук *Aethina tumida* Murray

1. Пронотум (вид сверху на первый грудной сегмент)
2. Фотография Josephine Ratikan, Университет Флориды
3. Оборонительная позиция: *Aethina tumida* втягивает выступающие части под тельце, чтобы пчела не могла его ухватить.
4. Фотография Anses, Лаборатория в София Антиполис

Для дифференциальной диагностики ниже приведено описание *Cychnamus luteus* с описанием типичных характеристик (Рисунок 10; Neumann and Ritter, 2004):

Надкрылья полностью покрывают выступы брюшка;

Булавовидные усики расставлены шире и имеют более разделенные сегменты;

Заднебоковые края пронотума неострые;

Цвет тельца – светло-коричневый.

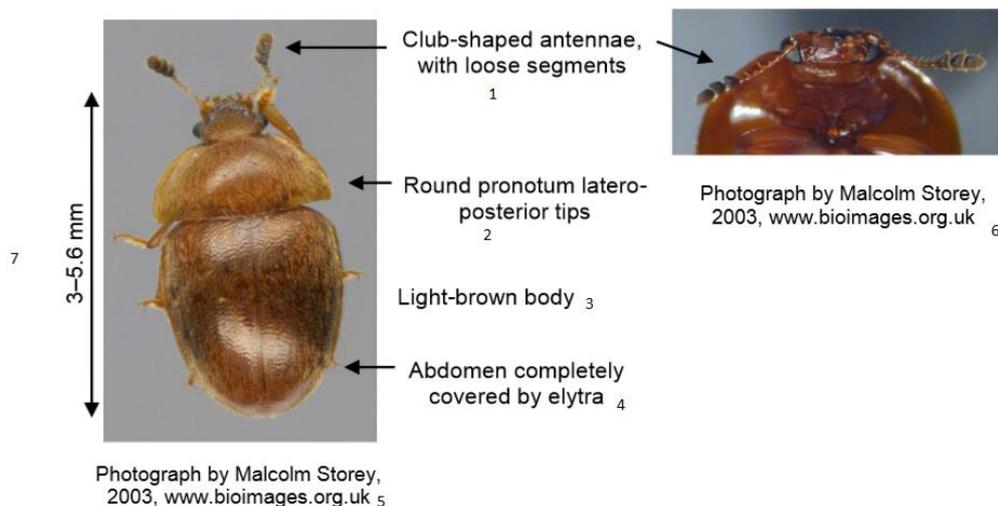


Рис.10. *Cychramus luteus* (Neumann and Ritter, 2004)

1. Булавовидные усики с разделенными сегментами
2. Закруглённые заднебоковые края пронотума
3. Светло-коричневое тельце
4. Брюшко полностью закрыто надкрыльями
5. Фотография Malcolm Storey, 2003, www.biomages.org.uk
6. Фотография Malcolm Storey, 2003, www.biomages.org.uk
7. Размер 3-5.6 мм

У *Caprophilus lugubris* следующие характеристики: (Рисунок 11, Marini et al., 2013)

Тельце коричневого цвета; на надкрылье есть участки оранжевого цвета. Лапки и усики оранжевые (сегменты на усиках темно-оранжевые);

Длина тельца 3,3-4,5 мм,

Однако что касается *Aethina tumida*:

Надкрылья не покрывают все брюшко;

Булавовидные усики с компактными сегментами;

Заднебоковые края пронотума заостренные

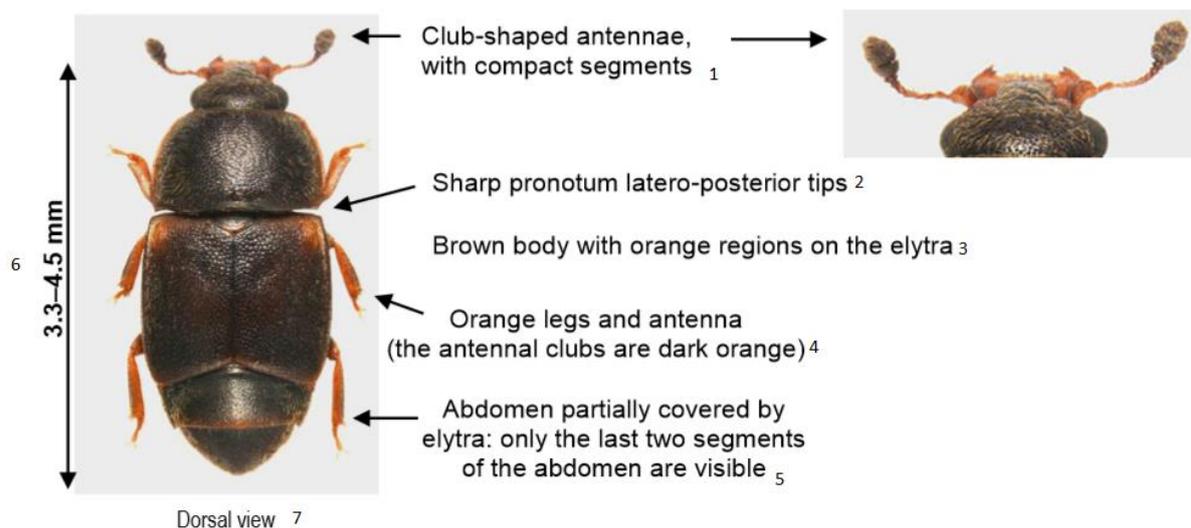


Рис.11 *Capropphilus lugubris* (Marini et al., 2013)

1. Булавовидные усики с компактными сегментами;
2. Заостренные заднебоковые края пронотума
3. Коричневое тельце с оранжевыми участками на надкрыльях
4. Оранжевые лапки и усики (булавы усиков тёмно-оранжевого цвета)
5. Брюшко частично покрыто надкрыльем: видны только два последних сегмента брюшка
6. 3,3-4,5 мм
7. Вид сверху. Источник Marini et al, 2013

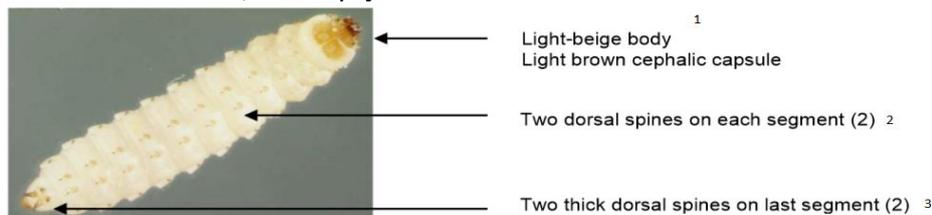
2.2.3.2. Стадия личинки

Личинки *Aethina tumida* светло-бежевого цвета. Головная капсула личинки (голова личинки) коричневого цвета. Цвет может меняться в зависимости от условий внешней среды и сохранности образцов. Длина созревшей личинки составляет около 1 мм (максимум 1,2 мм), в зависимости от поступления питательных веществ. Ширина около 1,6 мм.

Идентификацию личинок проводят на основе следующих морфологических критериев: (см. Рисунок 12).

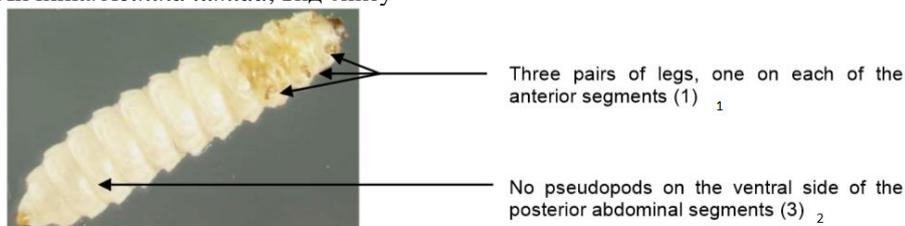
- i) Три пары лапок, одна на каждом из передних (торакальных) сегментов
- ii) Два дорсальных зубца на каждом сегменте (эти зубцы толще на последнем сегменте)
- iii) Нет ложноножек (псевдоподий) на нижней стороне задних брюшных сегментов

Личинка *Aethina tumida*, вид сверху



1. Светло-бежевое тельце
Светло-коричневая головная капсула
2. Два дорсальных зубца на каждом сегменте (2)
3. Два толстых дорсальных зубца на последнем сегменте (2)

Личинка *Aethina tumida*, вид снизу



1. Три пары лапок, одна на каждом из передних сегментов (1)
2. Нет ложноножек (псевдоподий) на нижней стороне задних брюшных сегментов (3)

Рис. 12 Личинка *Aethina tumida*, фотография Josephine Ratikan, Университет Флориды.

Чтобы отличить личинки *Aethina tumida* от личинок *Lepidoptera* (малой восковой моли, *A. grisella* и от личинок большой восковой моли *G. mellonella*), которые также часто обнаруживаются в ульях:

У личинок *Lepidoptera* есть псевдоподии на нижней части брюшных сегментов.

Есть два пустых сегмента между последним сегментом с лапками и первым сегментом с псевдоподиями (Рисунок 13).

Lepidoptera личинки могут плести шелковистую паутину, коконы и у них темные экскременты (такую паутину и экскременты можно увидеть в контейнерах с пробами, присланными в лабораторию).

2.2.4. Интерпретация результатов

2.2.4.1. Взрослые особи

i) Если все критерии с 1 по 8 подтверждают наличие *Aethina tumida*, то результат считается положительным. Идентификация *Aethina tumida* подтверждена. Рекомендуется подтверждающее тестирование в ПЦР.

ii) Если отсутствуют какие-либо основные морфологические характеристики *Aethina tumida* (т.е. хотя бы один из пунктов 1-8), то результат считается «отрицательным». Идентификация *Aethina tumida* не подтверждается.

iii) Если невозможно определить точные морфологические критерии (например, подтвержденные пробы), то результат считается

«неокончательным». Для подтверждения требуется молекулярная идентификация.

Личинка *Aethina tumida*

1. Два дорсальных зубца на каждом сегменте (2)
2. Нет ложноножек (3)
3. 3 пары лапок

Личинка восковой моли

1. Нет дорсальных зубцов
2. Псевдоподии (ложноножки)
3. 2 пустых сегмента
4. 3 пары лапок

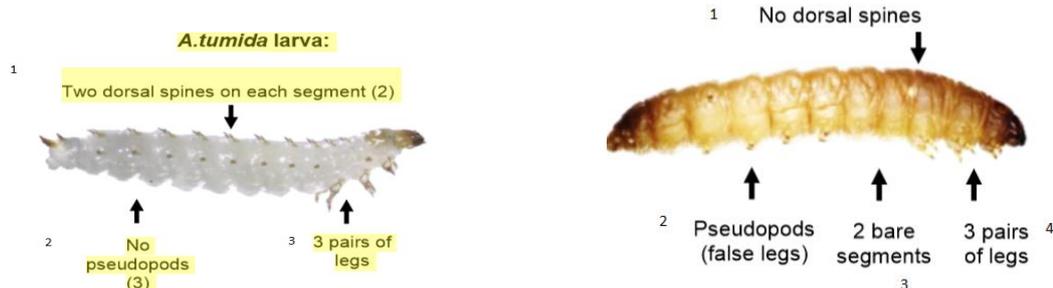


Рис. 13. Дифференциация личинок *Aethina tumida* от личинок восковой моли. Фотография Nicolas Cougoule, ANSES, лаборатория София-Антиполис.

2.2.4.2. Личинка

- i) Если подтверждено наличие всех критериев (1-3), то результат звучит «есть подозрение на *Aethina tumida*». Необходимо ПЦР тестирование для окончательного подтверждения и уверенности в диагнозе.
- ii) Если хотя бы один из трех критериев не подтверждён, то результат считают «отрицательным». Подозрение на *Aethina tumida* не подтверждается.
- iii) Если невозможно определить точные морфологические критерии (например, поврежденная проба), то результат считают «неокончательным». Для подтверждения требуется молекулярная идентификация.

2.3. Молекулярная идентификация

Морфологическая идентификация малого ульевого жука все чаще подтверждается молекулярными методами с использованием ПЦР в реальном времени, особенно для проверки личинок, где морфологические признаки выражены менее ярко. Описанный ниже метод ПЦР в реальном времени был разработан Ward et al (2007) и основан на амплификации частичной последовательности митохондриального гена *Aethina tumida*, кодирующего цитохромную оксидазу I (COI). Праймеры SHB207F и SHB315R могут амплифицировать фрагмент из 109 пар оснований, специфичных для *Aethina tumida*. Фрагмент визуализируется в реальном времени из-за 5'-маркированного зонда. Учитывая два гаплотипа, идентифицированные в ходе биоинформационного анализа, проведенного Ward et al. (2007), SHB207F праймер включает вырожденное основание в позиции 228 (A/G) (Генбанк № AF227645).

Метод был валидирован по Главе 1.1.6. *Принципы и методы валидации диагностических исследований для инфекционных болезней.*

2.3.1. Пробоподготовка, оборудование и реагенты

Обычно в качестве проб выступают взрослые особи или личинки, сохраненные в растворе денатурированного спирта, концентрацией > 90%, или сохраненные в сухом виде. Пробы, хранящиеся в растворе спирта, следует трижды промыть в большом объеме фосфатного буфера (например, в 50 мл пробирке). Затем образец переносят в 1,5 мл микропробирку, где его измельчают вручную с использованием одноразового пестика. Объем зависит от размера пробы (например, один взрослый жук в 1 мл; одна личинка в 200 мкл). Пробы можно хранить при ≤ -16 °С.

Для проведения данного теста необходима система выявления на основе ПЦР в реальном времени и специальное программное обеспечение для анализа данных. В наличии имеется несколько запатентованных систем для проведения ПЦР в реальном времени. Описанный ниже метод предполагает использование одной из таких систем, но точные параметры метода должны быть валидированы в соответствии с системой, используемой в конкретной лаборатории. В связи с высокой чувствительностью метода необходимо принять надлежащие меры по недопущению контаминации ДНК. Все используемые в тестировании материалы и методы должны соответствовать стандартам, изложенным в Главе 3.2 *Биотехнологии в диагностике инфекционных болезней*, включая меры по недопущению контаминации ДНК в образцах.

2.3.2. Подготовка реагентов

Реакционная смесь для проведения ПЦР в реальном времени обычно представляет собой готовый к использованию 2-кратный концентрат. Необходимо следовать инструкциям производителя при использовании и хранении смеси. Рабочие исходные растворы для праймеров и зонд готовят в TE буфере, свободном от нуклеаз, в концентрации 100 мкМ и 60 мкМ соответственно. Исходные растворы хранят при -20°C, а зонд следует защитить от воздействия света. Можно подготовить аликвоты разового применения для снижения количества циклов замораживания и оттаивания и увеличения срока годности праймеров и зонда.

2.3.3. Процедура ПЦР в реальном времени

Название праймера\зонда	Последовательность
SHB207F	5'- TCT AAA TAC TAC TTT CTT CGA CCC ATC (A/G) -3'
SHB315R	5'- TCC TGG TAG AAT TAA AAT ATA AAC TTC TGG - 3'
SHB245T зонд	5'- (6-Fam) ATC CAA TCC TAT ACC AAC ACT TAT TTT GAT TCT TCG GAC (Tamra)-3'

В каждый ПЦР тест необходимо включить отрицательные контроли экстракции и контроли реагентов. Чтобы свести к минимуму риск контаминации с помощью положительного контроля, необходимо использовать разведение с итоговым показателем St около 30. В качестве подходящего контроля выступают раздробленные жуки *Aethina tumida*, разведенные до 10 раз больше, чем предел обнаружения метода (LD метода). Альтернативный вариант предусматривает добавление плазмиды, содержащего целевую последовательность и разведённого до 10 раз больше, чем предел обнаружения ПЦР (LD ПЦР). В качестве отрицательного контроля экстракции рекомендуется использовать буфер для раздробления проб. Настоятельно рекомендуется внутренний положительный контроль (IPC) для проверки отсутствия ингибиторов ПЦР в анализируемом экстракте.

Необходимо определить подходящие условия для термоциклера ПЦР и валидировать используемое оборудование и реагенты в конкретной лаборатории.

Реакционные смеси ПЦР добавляют в чистом помещении (в нем не должны работать с патогенами или продуктами амплификации), например:

	Итоговая концентрация	Объем на одну пробирку (мкл)
H ₂ O, свободная от нуклеаз	\	4,1
Реакционная смесь для ПЦР в реальном времени (2x)	1x	12,5
SHB207F (100 мкМ)	320 нМ	0,4
SHB315R (100 мкМ)	320 нМ	0,4
245 зонд (50 мкМ)	100 нМ	0,05
10× IPC смесь	1x	2,5
50× IPC ДНК	0,1x	0,05
Общий объем смеси		20

Добавить 5 мкл ДНК-матрицы (известного образца или плазмиды ДНК) или положительного или отрицательного контроля в реакционную смесь до окончательного объема 25 мкл. ДНК пробы готовят и добавляют в смесь ПЦР в отдельном помещении.

Программа термоциклера зависит от используемого оборудования и реакционной смеси ПЦР в реальном времени, например:

Этап	Цикл	Температура (°C)	
Активация полимеразы	1	95	3:00
ПЦР	40	95	0:10
		60	0:30

2.3.4. Интерпретация результатов

Пороговое значение для анализа амплификационных кривых (определяется фоновым шумом, ассоциированным с системой выявления) обычно устанавливают в соответствии с инструкциями производителя для применяемого программного обеспечения. Интерпретацию можно провести на подтверждённых отрицательных

пробах (например, на личинках большой восковой моли *Galleria melonella* или взрослых жуках рода *Meligethes*).

Результаты идентификации *Aethina tumida* с помощью ПЦР в реальном времени считают истинными только, если экстракты положительных контролей и ПЦР контролей положительны ($Ct \leq 35$), а экстракты отрицательных контролей и ПЦР контролей отрицательны ($Ct = n/a$).

Положительный результат записывается для каждой пробы с показателем $Ct < 35$. Отрицательные результаты для любой пробы с показателем > 35 или пробы, не представляющей показатель Ct . Пробы, дающие отрицательные результаты, должны быть проверены на отсутствие ингибиторов ПЦР в анализируемом экстракте на основании результат ИРС. Ингибиторы ПЦР могут стать причиной ложноотрицательных результатов. Ингибирование можно преодолеть с помощью разведения пробы, например, до концентрации 1/10.

3. Серологические тесты

Серологические тесты не подходят или не имеют отношения к исследованиям, связанным со случаями инфекации колоний медоносных пчел.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Вакцин нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AFNOR NF U 47-600-2 (2015). Methods of analysis in animal health – PCR, Part 2: Requirements and recommendations for the development and validation of veterinary PCR. Available online at: www.afnor.fr.

BOECKING O. & WAGNER T. (2005). Der Kleine Beutenkäfer *Aethina tumida*, wichtige morphologische Bestimmungsmerkmale und Lebenszyklus. LAVES, Institut für Bienenkunde, Celle, Germany. Available online at: http://www.laves.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=20139&article_id=73963&psmand=23&cp=3_17111#list_17111

BUCHHOLZ S., SCHÄFER M.O. SPIEWOK S., PETTIS J.S., DUNCAN M., RITTER W., SPOONER-HART R. & NEUMANN P. (2008). Alternative food sources of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *J. Apic. Res.*, 47, 202–209.

CUTHBERTSON A.G.S., WAKEFIELD M.E., POWELL M.E., MARRIS G., ANDERSON H., BUDGE G.E., MATHERS J.J., BLACKBURN L.F. & BROWN M.A. (2013). The small hive beetle *Aethina tumida*: A review of its biology and control measures. *Curr. Zool.*, 59, 644–653.

DE GUZMAN L.I. & FRAKE A.M. (2007). Temperature affects *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) Development. *J. Apic. Res.*, 46, 88–93.

ELLIS J.D. (2005). Reviewing the confinement of small hive beetles (*Aethina tumida*) by western honey bees (*Apis mellifera*). *Bee World*, 86, 56–62.

ELLIS J.D. & DELAPLANE K.S. (2006). The effects of habitat type, ApilifeVAR™, and screened bottom boards on small hive beetle (*Aethina tumida*) entry into honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Am. Bee J.*, 146, 537–539.

ELLIS J.D., DELAPLANE K.S., CLINE A. & MCHUGH J.V. (2008). The association of multiple sap beetle species (Coleoptera: Nitidulidae) with western honey bee (*Apis mellifera*) colonies in North America. *J. Apic. Res. Bee World*, 47 (3), 188–189.

ELLIS J.D., DELAPLANE K.S., HEPBURN H.R. & ELZEN P.J. (2002a). Controlling small hive beetles (*Aethina tumida* Murray) in honey bee (*Apis mellifera*) colonies using a modified hive entrance. *Am. Bee J.*, 142, 288–290.

ELLIS J.D., DELAPLANE K.S. & HOOD W.M. (2001). Small hive beetle (*Aethina tumida*) weight, gross biometry, and sex proportion at three locations in the southeastern United States. *Am. Bee J.*, 142, 520–522.

ELLIS J.D. & HEPBURN H.R. (2006). An ecological digest of the small hive beetle (*Aethina tumida*), a symbiont in honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 53, 8–19.

Ellis J.D., Hepburn H.R., Delaplane K., Neumann P. & Elzen P.J. (2003). The effects of adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), on nests and flight activity of Cape and European honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 34, 399–408.

- ELLIS J.D., HEPBURN H.R., LUCKMANN B. & ELZEN P.J. (2004). The effects of soil type, moisture, and density on pupation success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Environ. Entomol.*, 33, 794–798.
- ELLIS J.D., NEUMANN P., HEPBURN H.R. & ELZEN P.J. (2002b). Longevity and reproductive success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) fed different natural diets. *J. Econ. Entomol.*, 95, 902–907.
- ELZEN P.J., BAXTER J.R., WESTERVELT D., RANDALL C., DELAPLANE K.S., CUTTS L. & WILSON W.T. (1999). Field control and biology studies of a new pest species, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera, Nitidulidae) attacking European honey bees in the Western hemisphere. *Apidologie*, 30, 361–366.
- HEPBURN H.R. & RADLOFF S.E. (1998). *Honeybees of Africa*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- HOOD M.W. (2004). The small hive beetle, *Aethina tumida*: a review. *Bee World*, 85, 51–59.
- LUNDIE A.E. (1940). The small hive beetle *Aethina tumida*, Science Bulletin 220, Dep. Agr. Forestry, Government Printer, Pretoria, South Africa.
- MARINI F., MUTINELLI F., MONTARSI F., CLINE A., GATTI E. & AUDISIO P. (2013). First report in Italy of the dusky sap beetle, *Carpophilus lugubris*, a new potential pest for Europe. *J. Pest Sci.*, 86, 157–160.
- MURRAY A. (1867). List of Coleoptera received from Old Calabar. *Ann. Magazine Nat. Hist.*, London, 19, 167–179.
- NEUMANN P. & ELZEN P.J. (2004). The biology of the small hive beetle (*Aethina tumida*, Coleoptera: Nitidulidae): Gaps in our knowledge of an invasive species. *Apidologie*, 35, 229–247.
- NEUMANN P. & RITTER W. (2004). A scientific note on the association of *Cychramus luteus* (Coleoptera: Nitidulidae) with honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*, 35, 665–666.
- PETTIS J. & SHIMANUKI H. (2000). Observations on the small hive beetle, *Aethina tumida*, Murray, in the United States. *Am. Bee J.*, 140, 152–155.
- SCHAEFER M., PETTIS J.S., RITTER W & NEUMANN P. (2008). A simple method for quantitative diagnosis of small hive beetles, *Aethina tumida*, in the field. *Apidologie*, 39, 564–565.
- SCHMOLKE M.D. (1974). A study of *Aethina tumida*: the small hive beetle, Project Report, University of Rhodesia, Zimbabwe, pp. 178.
- SPIEWOK S. & NEUMANN P. (2006). Cryptic low-level reproduction of small hive beetles in honeybee colonies. *J. Apic. Res.*, 45, 47–48.

WARD L., BROWN M., NEUMANN P., WILKINS S., PETTIS J. & BOONHAM N. (2007). A DNA method for screening hive debris for the presence of small hive beetle (*Aethina tumida*). *Apidologie*, 38, 272–280.

An FAO publication, Honey bee diseases and pests: a practical guide, W. Ritter & P. Akrotanakul (eds). Agricultural and Food Engineering Technical Report No. 4. FAO, Rome, Italy, 42 pp. ISSN 1814-1137 TC/D/A0849/E, is available free of charge at: <http://www.fao.org/3/a-a0849e.pdf>

* * *

NB: Есть референтные лаборатории МЭБ по болезням пчел.

(см. Таблицу в части 4 данного Руководства или обратитесь на сайт МЭБ для получения самой последней версии списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> <http://www.oie.int>). Вы можете связаться с референтными лабораториями МЭБ для получения дальнейшей информации по диагностическим тестам и реагентам для диагностики болезней пчел.

NB: Впервые принято в 2008. Самые последние поправки внесены в 2017.