

ИНФЕСТАЦИЯ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ *TROPILAEELAPS* SPP.

РЕЗЮМЕ

Клещи рода *Tropilaelaps* – паразиты расплода медоносных пчел. Питание личинками и куколками пчел вызывает недоразвитость расплода, смерть пчел и последующее сокращение колонии или слет пчел. Развитие занимает около 1 недели, клещи распространяются на пчелах. Существует как минимум четыре вида в роде *Tropilaelaps*. Каждый вид ассоциируется с определенной гигантской медоносной пчелой в Азии. Два вида (*T. clareae* и *T. mercedesae*) поражают популяции медоносных пчел *Apis mellifera*. Другие два вида (*T. koenigerum* и *T. thaii*), судя по всему, являются безвредными для *A. mellifera*.

Идентификация возбудителя: Для идентификации каждого вида имеются молекулярные и морфологические методы. Инфестацию *Tropilaelaps* можно распознать либо визуально на пчелах, либо путем обследования загрязнений в улье.

Решетчатый расплод, наличие мертвых или уродливых неполовозрелых особей, пчел с изуродованными крыльями, которые ползут ко входу в улей и, особенно, наличие быстро бегающих, крупных, красно-коричневых, вытянутых клещей на пчелиных сотах говорит о наличии *T. clareae*. Диагностику на ранней стадии можно провести, открыв расплод и обнаружив там незрелых и взрослых клещей. Улей (колонию) можно обрабатывать различными химическими веществами, которые способствуют отсоединению клещей от сот и пчел.

Липкие дощечки на дне колонии можно использовать для осмотра загрязнений в улье и клещей. Доказательная диагностика в лаборатории основана на морфологическом исследовании под микроскопом. Подтверждающее испытание можно провести с помощью традиционной полимеразной цепной реакции и секвенирования.

Серологические тесты: Серологические тесты не применимы.

Требования к вакцинам: Вакцины отсутствуют.

А. ВВЕДЕНИЕ

Клещи *Tropilaelaps* spp. принадлежат классу Arachnida, подкласс Acari, вид Parasitiformes, подотряд Mesostigmata, семейство Laelapidae. (Smiley, 1991). Не следует путать их с клещами *Varroa destructor*, паразитом, который прочно утвердился в Европе. *Tropilaelaps clareae* установлен в Азии, где является паразитом местных медоносных пчел *Apis dorsata brevilingua*. Также он является паразитом завезенных видов медоносных пчел *A. mellifera* на Филиппинах и местных видов медоносных пчел вида *A. dorsata binghami* на острове Сулавеси в Индонезии. *Tropilaelaps mercedesae*, который изначально ошибочно принимали за *T. clareae*, вместе с *T. koenigerum*, является паразитом местных пчел вида *A. dorsata dorsata* в Азии и Индонезии (за исключением острова Сулавеси). *Tropilaelaps mercedesae* также является паразитом завезенного вида пчел *A. mellifera* в данных и

окружающих регионах и вместе с другим видом *T. thaii* является паразитом вида пчел *A. laboriosa* в гористых местностях Гималаи (Anderson & Morgan, 2007).

1. Жизненный цикл

Колонизирующая самка *Tropilaelaps* (или самки; в одной ячейке их может быть до десяти) откладывает от одного до четырех яиц на куколках незадолго до запечатывания ячеек сот. *Tropilaelaps* предпочитают трутней, которые могут быть поражены на 100% (Burgett *et al.*, 1983). Потомство клещей, которое обычно представляет собой одного самца и нескольких самок, питается расплодом пчел, нанося им, таким образом, серьезный ущерб. Развитие клеща занимает примерно одну неделю. Взрослые особи, включая самку-основательницу, появляются вместе со взрослой пчелой и начинают поиски нового хозяина.

Короткий жизненный цикл, а также краткосрочное пребывание на взрослых особях пчел объясняет тот факт, что численность популяции *T. clareae* растет быстрее, чем популяции клещей *Varroa*. Когда оба вида, *T. clareae* и *Varroa*, заражают одну и ту же колонию первые могут вытеснить клещей *Varroa* (Burgett *et al.*, 1983; Ritter & Schneider-Ritter, 1988). Сообщалось, что присутствие обоих видов клещей в одной и той же ячейке ведет к снижению репродукции обоих видов (Rath *et al.*, 1995).

Срок жизни при форезии (прикреплении к пчелам) является довольно коротким (1-2 дня), поскольку *Tropilaelaps* не в состоянии пронзить наружный покров взрослой пчелы. Знание срока форезии *Tropilaelaps* spp. является важным для понимания их жизненного цикла, а недавние исследования показали, что такой период может составлять от 5 до 10 дней (Wilde, 2000a; 2000b). Матки клеща умирают через 2 дня, если не откладывают яйца (Woyke, 1987).

Инфестация *Tropilaelaps* вызывает гибель большого количества личинок пчел (до 50%), что приводит к решетчатому расплоду, в котором можно наблюдать тела мертвых особей, частично выступающих за пределы ячеек сот. Появляется большое количество пчел с уродствами (деформированными брюшками, короткими крыльями, деформированными ногами или вовсе без них). Некоторые пораженные пчелы ползут ко входу в улей (Atwal & Goyal, 1971). Кроме того на крышечках сот можно наблюдать отверстия, появляющиеся в результате очистки ячеек рабочими пчелами, которые выселяют зараженных пчелиных куколок или молодняк. Некоторые зараженные колонии слетают, перенося клещей в новые места.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы тестирования для диагностики инфеcтации Tropilaelaps spp. и их цель

Метод	Цель					
	Свобода популяц ии от инфекци и	Свобода отдельного животного от инфекци перед его перемещен ием	Вклад в политику по искоренен ию	Подтвержде ние клинически х случаев у животных	Превалентно сть инфекци - надзор	Иммунн ый статус отдельны х животны х или популяци и после вакцинац ии
Идентификация возбудителя						
Морфологи я	+++	+++	+++	+++	+++	н/п
Традицион ная ПЦР	++	++	++	++	+	н/п

Разьяснение: +++ = рекомендуемый метод, валидированный для данной цели; ++ = подходящий метод, но может потребоваться дальнейшая валидация; + = может быть использован в некоторых случаях, однако стоимость, надежность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для данной цели; н/п = не применим.

ПЦР = полимеразная цепная реакция

2. Обнаружение клеща в полевых условиях

Первым признаком инфеcтации видами *Tropilaelaps* часто служит появление крупных, красно-коричневых, вытянутых клещей на сотах или на взрослых пчелах (Рис. 2 и 3).

Длина туловища зависит от вида и отличается у самцов и самок. *T. koenigerum* – самый маленький член рода. Длина его туловища составляет < 0,7 мм для самок и ~ 0,575 для самцов. Самки видов *T. mercedesae*, *T. clareae* и *T. thaii* намного длиннее (~0,95-0,99 мм, ~0,87-0,885 мм и ~0,89 мм, соответственно), в то время как длина туловища самцов *T. mercedesae* и *T. clareae* немного меньше, чем их самок, и составляет 0,907-0,927 мм и 0,852-0,858 мм, соответственно. Самцы *T. thaii* до сих пор не обнаружены (Anderson & Roberts, 2013).

Tropilaelaps можно легко отличить от клеща вида *Varroa*, используя ×10 увеличительное стекло. Туловище клеща вида *Varroa* скорее широкое, чем длинное, и клещ перемещается медленно, в то время как туловище *Tropilaelaps* вытянутое (Рис. 1); клещ вида *Tropilaelaps* двигается быстро.

Клеща вида *Tropilaelaps* также не следует путать с другими эктопаразитами медоносных пчел, такими как вши *Braula*, или другими клещами вида *Laelapidae*, обитающими в мусоре на дне ульев, такими как *Mellitiphis alvearius* (Cook *et al.*, 1983) (Рис. 4), или клещами *Neocypholaelaps apicola* семейства *Ameroseiidae* (Delfinado-Baker & Baker 1983; Kontschán *et al.*, 2015).

Varroa destructor Tropilaelaps spp.

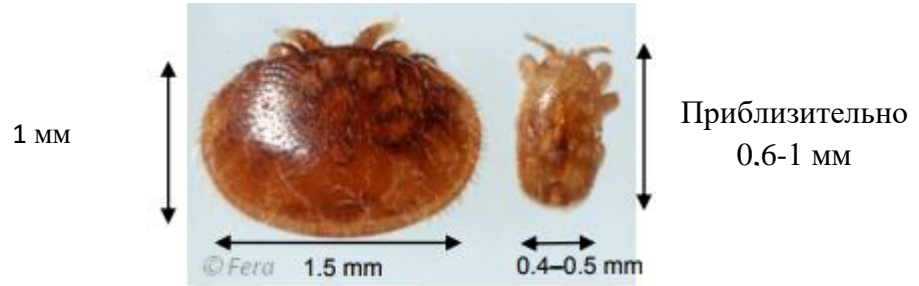


Рис. 1. *Varroa destructor* и *Tropilaelaps* spp. (вид сверху).
Фото предоставлено APHA Bee Unit, Нью Йорк. Королевские авторские права Соединенного Королевства.



Рис. 2. *Tropilaelaps* на личинке *Apis dorsata*. Фото D.



Рис. 3. Приплод *Tropilaelaps* на куколке *Apis mellifera*. Фото W. Ritter

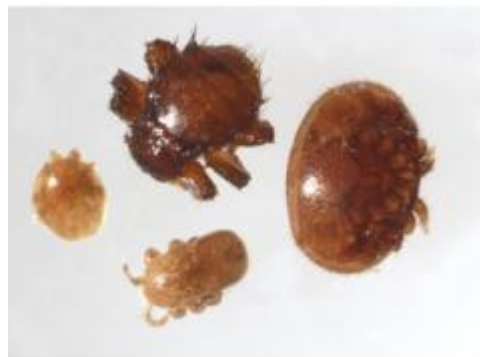


Рис. 4. *Braula coeca* (сверху), *Varroa destructor* (справа), *Tropilaelaps* spp. (внизу в центре), и *Melittiphis alvearius* (слева) (вид сверху)
Фото предоставлено APHA Bee Unit, Нью Йорк. Королевские авторские права Соединенного Королевства.

1.1. Сбор клещей

Методы сбора клещей включают использование эфира или сахарной пудры (Ritter & Schneider-Ritter, 1988). В стеклянную банку с широким горлышком и завинчивающейся крышкой собирают приблизительно 100-200 пчел. Пчел набирают в банку либо путем соскабливания, либо с помощью модифицированного вакуума, засасывая их. Пчел стряхивают на дно банки резким движением; слой пчел на дне должен составлять 1-2 дюйма (2,54-5,08 см). Крышку удаляют и распыляют в течение 2 секунд эфирную вспомогательную жидкость для запуска. В качестве альтернативы можно использовать достаточное количество 70% спирта или мыльной воды, чтобы покрыть всех пчел; добавляют около 25 г (1 унцию) сахарной пудры (или муки). Если используется эфир – необходимо удалить крышку и потрясти или покатавать банку в течение 10 секунд; клещи должны приклеиться к стенкам банки. Если используется спирт или мыльная вода – необходимо потрясти банку и затем отфильтровать пчел с помощью жесткой сетки с мелкими ячейками или сетчатый фильтр; клещи при этом остаются в жидкости. При использовании сахарной или другой пудры на горлышко банки необходимо поместить экран (такой как стальная сетка) и вытряхнуть клещей на белую бумагу для подсчета; данную процедуру необходимо повторять каждые 2 минуты. Для более точного подсчета процедуру заканчивают использованием спирта или мыльной воды для сбора всех клещей.

1.2. Обследование колонии и расплода

При мониторинге колоний медоносных пчел на наличие *Tropilaelaps* (или *Varroa*) в ходе обследования трутневого расплода и расплода рабочих пчел можно обнаружить инфестацию на ранней стадии. Клещей можно наблюдать внутри запечатанного расплода пчел, используя скребок (с вилкообразными зубцами) и приподняв крышечку ячейки с куколкой. Клещей хорошо видно невооруженным глазом. Клещи на ранней стадии развития имеют беловатый окрас и могут быть практически неподвижными, в то время как кормящиеся на теле хозяина, они прикрепляются ротовыми частями и передними конечностями к коже пчелы-хозяина (Ritter & Schneider-Ritter, 1988). Масштаб паразитирования можно оценить, открыв определенное количество ячеек расплода; степень инфестации затем рассчитывают в виде процента запечатанных ячеек, содержащих живых клещей (Burgett & Kitprasert, 1990).

1.3. Обследование на липкой доске

Точную диагностику можно провести, используя липкую доску, покрытую сеткой такой, как экран от мух, которая препятствует удалению пчелами вытесненных клещей. Сетка должна иметь достаточно крупные ячейки, чтобы клещи могли пройти сквозь них. Липкую доску изготавливают из щита, строительного картона или другого белого, твердого картона, на который наносят вазелин или другое липкое вещество (Koeniger *et al.*, 2002; Ostiguy & Sammatro, 2000; Sammatro *et al.*, 2000), либо используют липкие салфетки для полок. Салфетку нарезают таким образом, чтобы она помещалась в поддон улья. Сетку или экран нарезают в соответствии с размером липкой доски. Чтобы предотвратить падение пчел с доски необходимо загнуть внешние края экрана, чтобы они были приподняты по отношению к доске, и зафиксировать скобками или липкой лентой.

Доску оставляют в колонии на срок до 3 дней, при этом собирают и обследуют загрязнения на наличие клещей. Для более быстрой диагностики клещей каждую колонию окуривают путем добавления 25 г (1 унции) табака в дымарь. Пчел окуривают 6-10 раз и закрывают улей на 10-20 минут. Через 10 минут вынимают липкую доску и подсчитывают количество клещей. Иногда для того, чтобы отделить клещей от пчел, и чтобы они осыпались на липкую доску используют акарициды.

2. Лабораторная идентификация клещей

Быстрая и надежная диагностика является крайне важной, так как дает возможность принятия необходимых санитарных мер, направленных на предотвращение распространения клещей на незараженных территориях. В случае подозрения в полевых условиях, образцы с подозрением на *Tropilaelaps* необходимо направить в официальную лабораторию для подтверждения диагноза. В качестве предварительной диагностики проводят морфологическую идентификацию. Данный метод является быстрым, дешевым и не требует специального оборудования. Подтверждающее исследование можно провести с помощью полимеразной цепной реакции для молекулярной идентификации видов *Tropilaelaps*.

2.1. Особые меры предосторожности при отборе образцов

Образцы, подлежащие идентификации, отбирают в ульях или рядом с ними (например, в колониях, с пчеловодческого инвентаря, от партии пчел, с пчеломатки или со шмелей).

Подозрительные образцы необходимо умертвить перед предоставлением в лабораторию, а именно в 70% этиловом спирте. В случае если будут использоваться молекулярные методы не следует использовать денатурированный этиловый спирт, так как он способен ингибировать полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В качестве альтернативы, для того чтобы умертвить образец, можно оставить его на ночь при температуре -20°C.

По прибытии в лабораторию упаковки необходимо открывать в условиях биологической защиты. Если образцы окажутся живыми по прибытии – перед окончательным вскрытием упаковки его оставляют при температуре -80°C приблизительно на час. Данная процедура обездвиживает образец, который в последующем можно хранить в 70% этиловом спирте.

2.2. Морфологическая идентификация *Tropilaelaps* spp.

Метод основан на визуальном осмотре только взрослых самцов клещей, при этом сравниваются морфологические характеристики взрослого самца вида *Tropilaelaps* с морфологическими характеристиками клещей других родов, которых часто обнаруживают в колониях медоносных пчел (в частности, *V. destructor*). Описанный визуальный осмотр является недостаточным для дифференциации четырех видов *Tropilaelaps*, поскольку морфологически они очень схожи друг с другом (Anderson & Morgan, 2007; Tangjingjai *et al.*, 2003).

2.2.1. Оборудование и реагенты

Необходимое классическое энтомологическое оборудование и реагенты:

- Стереомикроскоп

- Составной микроскоп (1000×)
- Электроплитка
- Чашки: стеклянные чашки Петри, керамические чашки, предметное стекло или аналогичное
- Микрохирургические игольчатые зажимы, оснащенные миниатюрными иглами, а также иголками, изготовленными из лески (с расплюснутым концом для получения формы ложки)
- Микропинцет с острыми концами
- Стеклянные предметные стекла (классические и с лункой) и покровные стекла
- Герметично закрытые пузырьки
- Молочная кислота
- Среда для заливки (т.е. жидкость Гойера) и прозрачный лак для ногтей для длительной консервации предметных стекол
- 70% этиловый спирт (не использовать денатурированный этиловый спирт).

2.2.2. Процедура тестирования

Образцы помещают на чашку и с помощью стереомикроскопа проверяют на гомогенность. Если образцы не гомогенны – каждый вид осматривают по отдельности. Образцы для обследования должны быть отобраны от неповрежденных клещей. Образцы отбирают с помощью пинцета с тонкими концами или с помощью игольчатых зажимов и кладут на чашку для дальнейшего исследования.

Под стереомикроскопом клещей проверяют на три критерия предварительной идентификации *Tropilaelaps* spp. (Смотрите Таблицу 2 внизу). Если образец не отвечает ни одному из трех критериев – дальнейшее исследование под микроскопом не проводят.

Для обследования под микроскопом мягкие ткани должны быть очищены, чтобы морфологические характеристики были лучше видны. На предметное стекло помещают несколько капель молочной кислоты (для более крупных образцов используют предметные стекла с лункой). С помощью игольчатого зажима (оснащенного леской) (или с помощью пинцета с очень тонкими концами) отобранный образец помещают на предметное стекло в молочную кислоту. С помощью двух зажимов (оснащенных миниатюрными иглами) образцы размещают таким образом, чтобы получить вид снизу. На предметное стекло помещают покровное стекло, при этом важно не раздавить клеща и избегать появления пузырьков воздуха. Если возможно, необходимо слегка надавить на покровное стекло пинцетом, чтобы расправить ноги клеща, которые обычно согнуты и находятся под туловищем. Предметное стекло помещают на электроплитку при температуре примерно 50°C и ждут, когда подействует молочная кислота (примерно 30 минут). Примечание: нельзя допускать закипания жидкости на предметном стекле, поскольку это может уничтожить образец.

Предметное стекло (а) осматривают под составным микроскопом при 100×, 200× и потом 400× увеличении, чтобы провести полную проверку по различным диагностическим критериям, указанным в Таблице 2. При наличии референтных предметных стекол необходимо провести сравнительный анализ. В зависимости от толщины тела клеща может появиться необходимость в изменении глубины резкости.

Образцы можно хранить при комнатной температуре в герметично закрытых флаконах, наполненных 70% этиловым спиртом. Предметные стекла могут храниться долгое время, если поместить клеща в жидкость Гойера, высушить в течение 2 недель при температуре 50°C и затем “запечатать” покровное стекло прозрачным лаком для ногтей. Для получения более подробной информации о хранении и заключении клещей в среду смотрите Dietemann *et al.* (2013).

2.2.3. Критерии идентификации взрослых особей *Tropilaelaps* spp.

Tropilaelaps spp. видны невооруженным глазом. Их длина составляет примерно 0,6-1 мм, а ширина 0,4-0,5 мм. *Tropilaelaps* меньше чем *V. destructor* (Рис. 1 и 4). Если взрослая особь отвечает всем морфологическим характеристикам (критерии 1-9 в Таблице 2) – результат является “положительным” и идентификация рода *Tropilaelaps* подтверждается. Если отсутствует хотя бы одна основополагающая морфологическая характеристика (критерии 1-9) *Tropilaelaps* spp. – результат считается “отрицательным”, и идентификация рода *Tropilaelaps* не подтверждается. Если наличие или отсутствие всех девяти критериев нельзя установить (например, по причине повреждения образца) – результат считается “неоднозначным”, и для подтверждения используют молекулярные методы.

Таблица 2. Критерии распознавания *Tropilaelaps* spp.

(Anderson & Roberts 2013; Delfinado & Baker 1961; Smiley 1991; Университет Мичигана 2014)

Необходимо провести проверку следующих характеристик:

- a) дыхательное отверстие (стигма) – трахеальные отверстия;
- b) тазик – первый сегмент ноги, который соединяет ногу и туловище;
- c) перитремы представляют собой трубчатую структуру, отходящую от стигмы. Могут участвовать в дыхании.
- d) тритостернум представляет собой щетиноподобный орган чувств, имеющий форму вилочки (Y), расположенный каудально по отношению к гнатосоме (гнатосома – часть тела Asari, которая включает ротовые части и ротовое отверстие);
- e) сетчатый узор, напоминающий разбитую яичную скорлупу или рыбью чешую.

	Стереомикроскоп	Составной микроскоп
1. <i>Tropilaelaps</i> имеет четыре пары ног. Первая пара расположена вертикально, напоминая антенны (Рис. 5). → Класс Arachnida	×	
2. Туловище не сегментировано, представляет одну видимую область по причине слияния просомы (эквивалент головогрудного отдела) и опитосомы (или брюшка) (Рис. 5). → Подкласс Asari	×	

3. Длина туловища больше его ширины (в отличие от <i>V. destructor</i>) (Рис. 1 и 4). Соотношение длины к ширине больше 1,3.	×	
4. Между тазиками III и IV расположена пара латероventральный трахей (Рис. 7). → Отряд паразитоформные		400×
5. Наличие удлинённых перитрем (Рис. 7). Наличие тритостернума (Рис. 7) (необязательный критерий, сложно различимый). → Подотряд Mesostigmata		200×
6. Удлиненная половая бороздка, округлой или острой формы сзади (Рис. 5 и 6). → Laelapidae		100×
7. Удлиненная половая бороздка, как минимум в два раза длиннее, чем анальная (Рис. 5 и 6).		100× или 200×
8. Грудная пластина имеет сетчатый узор (Рис. 7).		400×
9. Описосома покрыта жесткими щетинками, толстыми у основания, на верхней части вентральной поверхности (Рис. 5 и 6).		200×
Примечание: Критерии различия между самцами и самками: Подвижная часть хелицеры самца нитеобразна (спермотодактиль) (Рис. 8). Половая бороздка у самцов короче, чем у самок (Рис. 8) (Anderson и Morgan, 2007).		200×

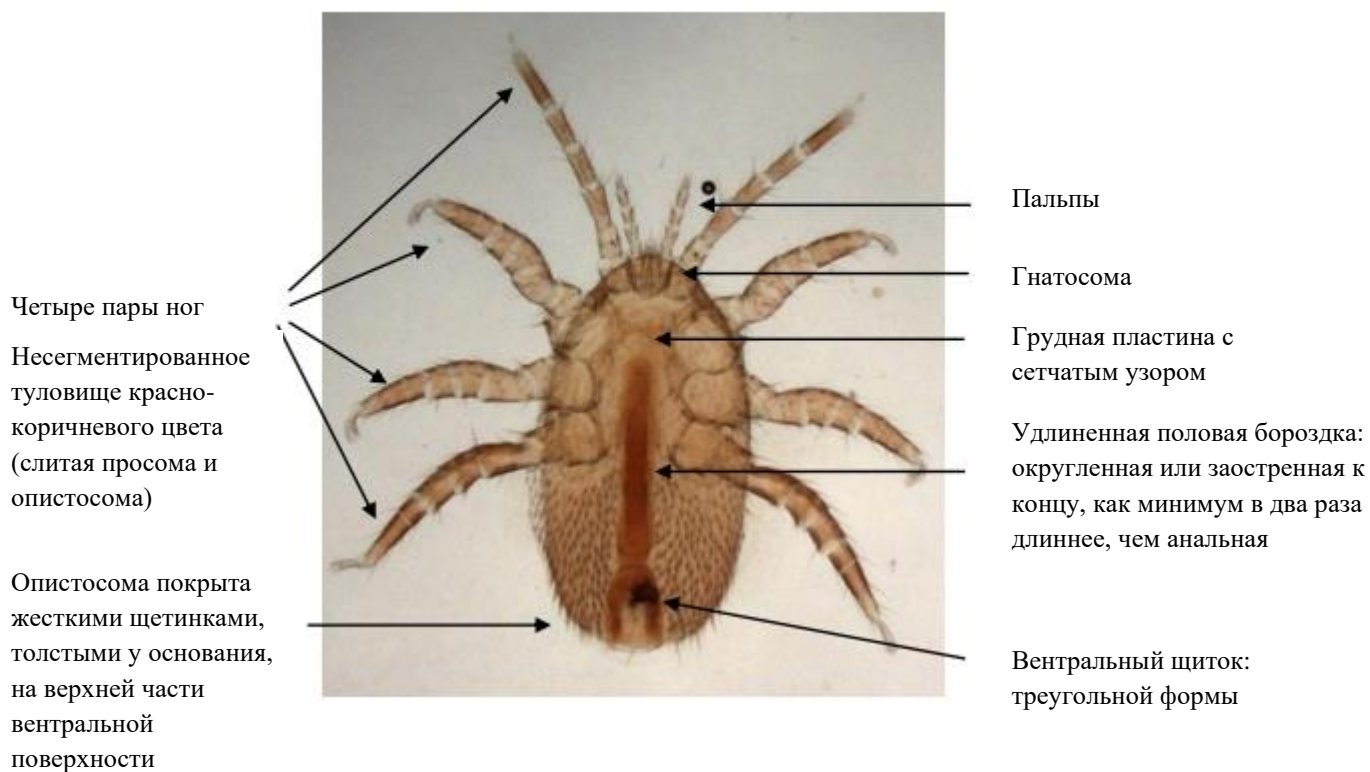
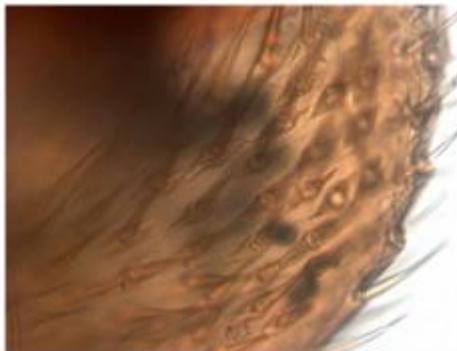


Рис. 5. *Tropilaelaps clarae*, самка (вид снизу)
 Фото S. Franco, Anses, лаборатория София-Антиполис.

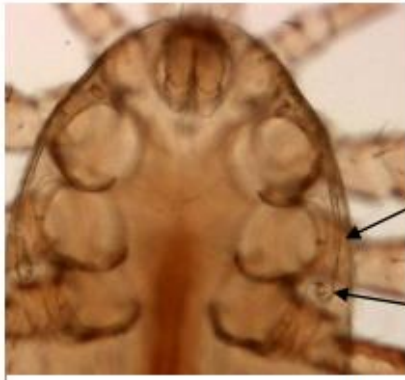


Увеличение 100×



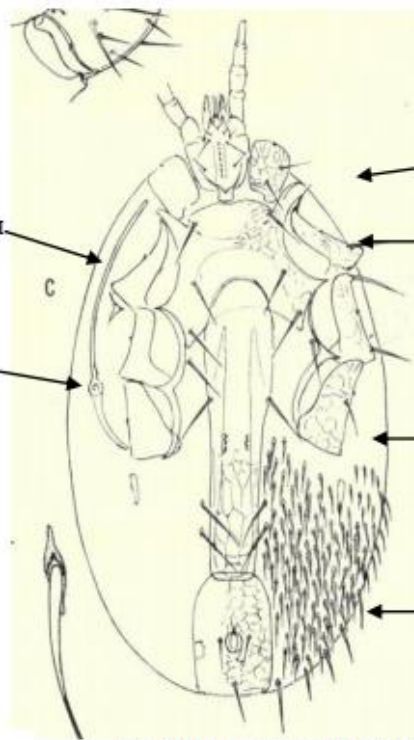
Увеличение 400×

Рис. 6. *Tropilaelaps sp.* (вид снизу). Опистосома, жесткие верхние щетинки, утолщенные книзу
 Фото S. Franco, Anses, лаборатория София-Антиполис.



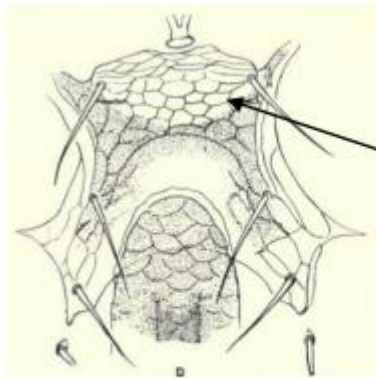
T. clareae - Увеличение 100×

Удлиненная
перитрема
Стигма



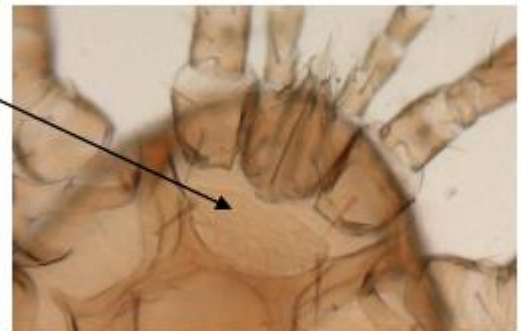
Тритостернум
Грудная пластина
Половая бороздка
Вентральная
пластина

T. clareae, самка (вид снизу)



Грудная
пластина с
чешуйчатым
узором

Грудная пластина и генитальная бороздка (вид снизу)



T. clareae - Увеличение 200×



Гнатосома (вид снизу)

Тритостернум



T. clareae - Увеличение 200×

Рис. 7. *Tropilaelaps clareae*, анатомия

Источник рисунков: Delfinado & Baker, 1961. Фото S. Franco, Anses, лаборатория София-Антиполис.



Рис. 8. *Tropilaelaps clareae*, самец и самка (вид снизу)
 Фото S. Franco, Anses, лаборатория София-Антиполис.

2.3. Молекулярная идентификация

Морфологическая идентификация *Tropilaelaps spp.* затруднительна по причине их схожести с другими клещами, которых можно обнаружить в ульях. Метод ПЦР все чаще используют для подтверждения подозрения на инфеcтацию. Традиционный метод ПЦР, описанный ниже, основан на амплификации частичной последовательности митохондриального гена *Tropilaelaps spp.*, кодирующего цитохромоксидазу I (COI) (Anderson & Morgan, 2007). Праймеры COI-TCF1 и COI-TCR2 амплифицируют участок, состоящий из 580 пар оснований. Размер продуктов ПЦР определяют с помощью электрофореза в агарозном геле в сравнении с маркером длины ДНК (маркер молекулярной массы). Праймеры не являются специфическими для *Tropilaelaps spp.*, поэтому может возникнуть амплификация гена COI от других паразитов. В связи с этим при получении необходимого размера продукта ПЦР необходимо провести секвенирование ДНК.

2.3.1. Подготовка образца, оборудование и реагенты

Образцы для тестирования обычно включают около 10 взрослых особей клещей, хранящихся либо в сухом виде, либо в > 95% не денатурированном этиловом спирте. Если образец хранился в этиловом спирте – перед выделением ДНК их необходимо сначала три раза промыть большим количеством фосфатного буфера (50 мл на пробирку) или просто высушить в течение нескольких минут на санитарно-гигиенической бумаге. Затем клещей перемещают в микропробирки объемом 1,5 мл. Данный этап играет большое значение в предотвращении ингибирования. Клещей измельчают в 200 мкл фосфатного буфера, используя одноразовый шариковый пестик и микропробирку объемом 1,5 мл. Измельченные образцы хранят замороженными при температуре $\leq -16^{\circ}\text{C}$.

Необходимо наличие традиционной ПЦР-системы для обнаружения и анализа. Для выделения ДНК, амплификации в термоциклере с последующим проведением

электрофореза в агарозном геле можно использовать любой подходящий метод и набор. Все оборудование и материалы должны быть валидированы в отдельной лаборатории. Для предотвращения контаминации ДНК необходимо соблюдать обычные меры, а процедуры необходимо проводить в соответствии со стандартами, изложенными в Главе 3.2. *Биотехнология в диагностике инфекционных болезней*. Для всех этапов необходимо использовать положительные и отрицательные контроли.

2.3.2. Процедура проведения ПЦР

Anderson & Morgan (2007) были разработаны следующие праймеры:

Название	Последовательность
COI-TCF1	5'-СТАТССТСААТТАТТГАААТАГГААС-3'
COI-TCR2	5'-ТАГСГГСТГТГАААТАГГСТСГ-3'

Реакционную смесь для ПЦР используют и хранят в соответствии с инструкциями производителя. Рабочие исходные растворы для праймеров готовят с использованием 100 мкл ТЕ буфера, свободного от нуклеаз. Исходные растворы хранят при температуре -20°C.

Реакционные смеси для ПЦР готовят в отдельном помещении лаборатории. Перед распределением по реакционным пробиркам все реагенты, за исключением образцов ДНК, смешивают. При проведении каждой ПЦР необходимо включать соответствующие контроли, включая, как минимум, контроль матрицы (контроль без матрицы, только реагенты), отрицательные контроли (т.е. 1 на 10 исследуемых образцов) и положительные контроли (раствор плазмидной ДНК, включая последовательность, подлежащую амплификации, добавленный к 10-кратному разведению (пределу обнаружения ПЦР)). Амплификацию проводят при общем объеме в 20 мкл.

Смеси реагентов для ПЦР добавляют в чистом помещении (где запрещена работа с патогенами или продуктами амплификации).

	Конечная концентрация	Объем на пробирку (мкл)
H ₂ O, свободная от нуклеаз	/	12,4
ДНК-полимераза Taq (5Е/мкл)	5Е/мкл	0,2
ДНК-полимераза Taq (10×)	1×	2,2
MgCl ₂ (50 ммоль)	3,5 ммоль	1,3
Смесь дНТФ (10 ммоль)	450 мкл	0,9
COI-TCF1 (20 ммоль)	500 нмоль	0,5
COI-TCR2 (20 ммоль)	500 нмоль	0,5
Общий объем смеси		18

К конечному объему смеси реагентов 20 мкл добавляют 2 мкл матрицы ДНК (неизвестный образец или плазмидная ДНК) или отрицательного контроля. Образцы ДНК готовят и добавляют в смесь для ПЦР в отдельном помещении.

Выбор программы термоциклера зависит от типа используемого оборудования, например:

Этап	Цикл	Температура (°C)	Время (мин.)
Первичная денатурация	1	95	5:00
ПЦР	35	94	0:30
		58	0:30
		72	0:45
Конечная элонгация	1	72	7
Хранение		10	∞

Обнаружение продуктов амплификации

- a) Готовят 1,2% агарозный гель в 1 × TAE (Трис-ацетатный-EDTA буфер) для соответствующего количества лунок
- b) 2мкл 6×загрузочного буфера добавляют к 10 мкл продуктам ПЦР
- c) 10 мкл образцов загружают в лунки
- d) Для контроля размера продуктов амплификации рекомендуется использовать лэддер со 100 парами оснований
- e) Проводят анализ
- f) После окрашивания подходящим красителем ДНК анализируют, используя УФ освещение

Интерпретация результатов основана на наличии или отсутствии продуктов амплификации: ожидаемый размер продукта ПЦР составляет 580 пар оснований, включая два праймера. Тем не менее, наличие продукта ПЦР правильного размера не достаточно для того, чтобы идентифицировать клещей рода и вида *Tropilaelaps*. Необходимо проведение секвенирования.

2.3.3. Секвенирование продуктов ПЦР

При обнаружении полосы из 580 пар оснований продукт ПЦР необходимо секвенировать. В данном документе метод не приведен, но его можно найти в другом источнике. Панель последовательностей COI, доступная в Genbank (EF025423 – EF025468), входит в исследование для построения филогенетического древа и для идентификации видов *Tropilaelaps*. Также в исследование входит последовательность COI внешней группы от *Varroa* (EF025469? 253947435).

2.4. Серологические исследования

Серологические исследования не подходят или являются нерелевантными в отношении инфекации колоний пчел.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Вакцины отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ANDERSON D.L. & MORGAN M.J. (2007). Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. *Exp. Appl. Acarol.*, 43, 1–24.
- ANDERSON D.L. & ROBERTS J.M.K. (2013). Standard methods for *Tropilaelaps* mites 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. Apicultural Res.*, 52 (4), <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.21>.
- ATWAL A.S. & GOYAL N.P. (1971). Infestations of honeybee colonies with *Tropilaelaps*, and its control. *J. Apic. Res.*, 10, 137–142.
- BURGETT D.M. & KITPRASERT C. (1990). Evaluation of Apistan™ as a control for *Tropilaelaps clareae* (Acari: Laelapidae), an Asian honey bee brood mite parasite. *Am. Bee J.*, 130, 51–53.
- BURGETT M., AKRATANAKUL P. & MORSE R.A. (1983). *Tropilaelaps clareae*: a parasite of honeybees in south-east Asia. *Bee World*, 64, 25–28.
- COOK V.A. & BOWMAN C.E. (1983). *Mellitiphis alvearius*, a little-known mite of the honeybee colony, found on New Zealand bees imported into England. *Bee World*, 64, 62–64.
- DELFINADO M.D. & BAKER E.W., (1961). *Tropilaelaps*, a new genus of mite from the Philippines (Laelapidae, Acarina). *Fieldiana Zoology*, 44, 53–56.
- DELFINADO-BAKER M. & BAKER E.W. (1982). A new species of *Tropilaelaps* parasitic on honey bees. *Am. Bee J.*, 122, 416–417.
- DELFINADO-BAKER M. & BAKER E., (1983). A new species of *Neocypholaelaps* (Acari : Ameroseiidae) from brood combs of the Indian honey bee. *Apidologie*, 14, 1–7.
- DIETEMANN V., NAZZI F., MARTIN S.J., ANDERSON D.L., LOCKE B., DELAPLANE K.S., WAUQUIEZ Q., TANNAHILL C., FREY E., ZIEGELMANN B., ROSENKRANZ P. & ELLIS J.D. (2013). Standard methods for varroa 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. Apicultural Res.*, 52, <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>.
- GARG R., SHARMA O.P. & DOGRA G.S. (1984). Formic acid: an effective acaricide against *Tropilaelaps clareae* Delfinado & Baker (Laelapidae: Acarina) and its effect on the brood and longevity of honey bees. *Am. Bee J.*, 124, 736–738.
- KOENIGER G., KOENIGER N., ANDERSON D.L., LEKPRAYOON C. & TINGEK S. (2002). Mites from debris and sealed brood cells of *Apis dorsata* colonies in Sabah, (Borneo) Malaysia, including a new haplotype of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 33, 15–24.
- KONTSCHÁN J., TÓBIÁS I., BOZSIK, G. & SZOCS G. (2015). First record of *Neocypholaelaps apicola* from beehives in Hungary (ACARI: Mesostigmata: Ameroseiidae): Re-description and DNA barcoding. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.*, 61, 237–245.

OSTIGUY N. & SAMMATARO D. (2000). A simplified technique for counting Varroa sticky boards. *Apidologie*, 31, 707–716.

RATH W., BOECKING O. & DRESCHER W. (1995). The phenomena of simultaneous infestation of *Apis mellifera* in Asia with the parasitic mites *Varroa jacobsoni* OUD, and *Tropilaelaps clareae* Delfinado and Barker. *Am. Bee J.*, 135, 125–127.

RITTER W. & SCHNEIDER-RITTER U. (1988). Differences in biology and means of controlling *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*, two novel parasitic mites of *Apis mellifera*. In: *Africanized Honey Bees and Bee Mites*, Needham G.R., Page R.E. Jr., Delfinado-Baker M. & Bowman C.E., eds. Ellis Horwood, Chichester, UK, 387–395.

SAMMATARO D., GERSON U. & NEEDHAM G.R. (2000). Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Ann. Rev. Entomol.*, 45, 519–548.

SMILEY R.L. (1991). *Insect and Mite Pests in Food, an Illustrated Key*, Gorham J.R., ed. Food and Drug Administration, United States Department of Agriculture, p. 6.

Tangjingjai W., Verakalasa P., Sittipraneed S., Klinbunga S. & Lekprayoon C. (2003). Genetic differences between *Tropilaelaps clareae* and *Tropilaelaps koenigerum* in Thailand based on ITS and RAPD analyses. *Apidologie*, 34, 513–523.

WILDE J. (2000). How long can *Tropilaelaps clareae* survive on adult honeybee workers? In: *Proceedings of the Euroconference on Molecular Mechanisms of Disease Tolerance in Honeybees (MOMEDITO)*, held in Kralupy near Prague, Czech Republic, 17–19 October 2000. Bee Research Institute, Dol, Czech Republic, 217–221.

WILDE J. (2000). *Varroa destructor* and *Tropilaelaps clareae* in *Apis mellifera* colonies in Nepal. In: *Proceedings of the Euroconference on Molecular Mechanisms of Disease Tolerance in Honeybees (MOMEDITO)*, held in Kralupy near Prague, Czech Republic, 17–19 October 2000. Bee Research Institute, Dol, Czech Republic, 223–238.

WOYKE J. (1987). Length of stay of the parasitic mite *Tropilaelaps clareae* outside sealed honeybee brood cells as a basis for its effective control. *J. Apic. Res.*, 26, 104–109.

*

* *

Прим.: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по болезням пчел (смотрите Часть 4 данного Кодекса по наземным животным. Также наиболее актуальный список можно найти на сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Для получения более подробной информации о диагностических тестах и реагентах, используемых для диагностики болезней пчел, пожалуйста, свяжитесь с Референтными лабораториями МЭБ

NB: ВЕРСИЯ ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 2004 ГОДУ. ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ПРИНЯТЫ В 2017 ГОДУ