## **МИНИСТЕРСТВО** СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(Минсельхоз России)

#### ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11. Для телеграмм; Москва, 84 Минроссельхоз. Tenexc: 411258 3EPHO Факс: (095) 9755850. Теп.: 9755860 E-mail: chief@devet.aris.ru

13.06.02 Nº 13-5-02/0466 Ha Nº

## [ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ]

по диагностике акарапидоза и экзоакарапидоза пчел

# **УТВЕРЖДАЮ**

T.



1

## 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Клещи рода Акарапис паразитируют на взрослых медоносных пчелах. На поверхности тела насекомых находят наружного клеща (Acarapis externus), спинного клеща (A. dorsalis) - возбудителей экзоакарапидоза пчел, а в их трахеях - A. woodi - возбудителя карантинного заболевания пчел - акарапидоза.

Клещи A. externus и A. dorsalis вызывают беспокойство и гибель зараженных пчел в период зимовки. При массовой заклещеванности пчел в семье возможен частичный или полный распад клуба и образование большого количества подмора. В активный пчеловодный сезон насекомые теряют способность к полету. При поражении пчел трахейным клещом A. woodi признаки болезни нетипичны. У насекомых появляется понос, они теряют способность к полету, когда одно или оба задних крыла изменяют свое типичное положение, располагаясь под разными углами, вплоть до перпендикулярного к оси их тела (феномен "К-крыло"). В зимний период происходит ослабление силы больных семей и их гибель весной или ранним летом.

Возможно одновременное поражение пчел всеми указанными видами клещей рода Акарапис.

- 1.2. Для исследования направляют не менее 50 живых внутриульевых пчел или такое же количество трупов свежего подмора. При массовом обследовании пчел на пораженность их A. woodi методом гомогенизации проба должна содержать около 200 пчел из семьи.
- 1.3. Живых пчел перед обследованием убивают этиловым эфиром или замораживанием при -20°C.

## 2. ПОРЯДОК ИССЛЕДОВАНИЯ

- 2.1. В лаборатории возбудителей экзоакарапидоза обнаруживают в смывах и при осмотре тела пчел.
- 2.1.1. Пчел помещают во флакон или пробирку, заливают жидкостью Удемана (87 частей 70%-ного этилового спирта, 5 частей глицерина, 8 частей ледяной уксусной кислоты), 70%-ным этиловым спиртом с 5% глицерина или водной эмульсией стирального

порошка (по объему на каждые 20 частей дистиллированной воды используют 1 часть стирального порошка) и встряхивают в течение 10-15 минут. Через сутки встряхивание повторяют, пчел удаляют пинцетом, жидкость центрифугируют при 2000 оборотах в минуту в течение 10 минут и сливают. Осадок исследуют под микроскопом в затененном поле зрения с целью обнаружения клещей.

- 2.1.2. На пчелах клещей можно найти под бинокулярной лупой МБС-1 или МБС-2. Паразитов снимают тонкой препаровальной иглой.
- 2.2. Для обнаружения A. woodi применяют индивидуальное вскрытие пчел пробы или при проведении массовых исследований одновременным исследованием всех пчел из пробы.
- 2.2.1. При индивидуальном исследовании пчелу кладут на спину и делают одии поперечный разрез грудки сзади передней пары ног, удаляют у ней голову, и второй разрез впереди средней пары ног и передних крыльев. Вырезанные сегменты тела, содержащие первую пару дыхалец и трахеи, для удаления мышечной ткани помещают в 8-10%-ный раствор КОН (NaOH), слегка нагревают в течение 20 минут и оставляют в растворе на ночь при комнатной температуре, после чего промывают и просматривают под увеличением ×8-20. Мелкие овальные тела клещей видны через прозрачные стенки трахеи. Наличие желтых, коричневых и черных пятен на стенках трахей подтверждают положительный диагноз на акарапидоз.
- 2.2.1.1. Для детального изучения структур тела клеща изолированные трахеи переносят на другое предметное стекло в каплю глицерина или дистиллированной воды и микроскопируют под большим увеличением (×100, ×400) в затененном поле эрения.
- 2.2.1.2. Для контрастирования деталей строения тела паразитов в трахеях срезы грудки (см. п. 2.2.1.) толщиной 1-1,5 мм помещают в 8-10%-ный раствор КОН (NaOH) и нагревают почти до кипения, выдерживая клещей в нем в течение 10 минут. Содержимое выливают на фильтр, промывают водопроводной водой, окрашивают в течение 5 минут 1%-ным водным раствором метиленового синего (сначала готовят раствор указанной концентрации и к нему добавляют хлористый натрий в таком количестве, чтобы его концентрация составляла 0,85%), выдерживают в дистиллированной воде 2-5 минут, прополаскивают 70%-ным этанолом и микроскопируют. На светло-голубом фоне трахеи видны темно-синие клещи.
- 2.2.1.3. Для дифференциации живых и мертвых клещей выделенные без предварительной обработки щелочью трахеи пчел помещают в каплю красителя (5 мг тиазол голубой тетразолин в 5 мл дистиллированной воды) на предметном стекле, накрывают, слегка придавливая покровное стекло, чтобы удалить воздух, и микроскопируют. В течение нескольких секунд живые клещи окрашиваются в пурпурный, а погибшие в зеленовато-желтый цвет.
- 2.2.2. При проведении массовых исследований пчел используют метод гомогенизации материала или компрессорный метод.
- 2.2.2.1. Перед гомогенизацией у пчел удаляют голову, крылья, ноги и брюшко. Оставшиеся грудки насекомых помещают в стакан объемом 100 мл, заливая в него на 1/4 объема дистиллированную воду. Гомогенизируют три раза по несколько секунд при 10000 оборотов/минуту. Суспензию пропускают через сито (с отверстием 0,8 мм), ополаскивают водой, доводя окончательный объем жидкости до 50 мл. Фильтрат центрифугируют при 1500 оборотов 5 минут, надосадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют несколько капель молочной кислоты, оставляя её на 10 минут, а затем микроскопируют. У обнаруженных клещей определяют видовую принадлежность.
- 2.2.2.2. При компрессорном методе у пчел удаляют голову, крылья, ноги и брюшко. Грудки насекомых помещают в пробирки с 8-10%-ным раствором щелочи (КОН или NaOH), выдерживая их при комнатной температуре в течение суток, затем промывают водопроводной водой и просушивают на фильтровальной бумаге. Положив грудку пчел на спинную сторону, захватывают её анатомическим пинцетом с боков и переносят на компрессорий. В каждую клеточку компрессория выдавливают содержимое грудки одной пчелы, и скальпелем слегка счищают возможные остатки трахей с места выхода со-

держимого. После заправки клеточек накладывают второе стекло, компрессорий свинчивают и просматривают под малым увеличением микроскопа. Недостаток этого метода - потеря трахей у некоторых пчел.

2.3. Патологический материал после проведения исследований сжигают.

#### 3. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ КЛЕШЕЙ

- 3.1. Клещи рода Акарапис морфологически сходны, мелкие и бесцветные, самки размером 0,07-0,14 × 0,1-0,21 мм, самцы 0,06-0,11 × 0,08-0,17 мм, тело сжато в спиннобрющном направлении, овально-вытянутой формы. Передний отдел тела паразита отделён от заднего поперечным желобком. На спинной стороне имеется 3 щитка. Ротовой аппарат колюще-сосущий, по бокам с вентральной стороны у самок расположены стигмы. Четыре пары ног с характерным набором щетинок.
  - 3.2. Самок клещей рода Акарапис дифференцируют по следующим признакам:
- А. externus: аподема (отходящие книзу от ротового конуса складки покрова, рис. А, 1.) занимают 2/3 длины проподосомы (переднего отдела тела); кокса IV (лучше видна при фазово-контрастной микроскопии просветлённого материала) усечённая (рис. А, 2.), длина последнего членика четвёртой пары ног более 11 мкм (рис. А, 3.). Чаще всего находят на нижней и боковых поверхностях сочленения между головой и грудью пчелы.
- A. woodi: аподема занимает 2/3 длины проподосомы (рис. Б, 1.); поверхность коксы IV с мелким зубцом (рис. Б, 2.); длина последнего членика четвёртой пары ног меньше 8 мкм (рис. Б, 3.). Обитает в трахеях пчёл.
- A. dorsalis: аподема занимает полную длину проподосомы (рис. В, 1.): кокса IV с глубоким зубцом (рис. В, 2.): последний членик четвёртой пары ног меньше 10 мкм (рис. В, 3.). Паразит на теле пчелы локализуется в области скуто-скутеллярной бороздки, у основания крыльев, на крыльях и первом брюшном сегменте.
- 3.3. A. woodi следует дифференцировать от проникающих в трахеи погибших пчел личинок клеща **Tyrophagus putrescentae**, которые имеют три пары ног, иную сегментацию тела и строение ног.
- 3.4. Наружных акараписов необходимо отличать от встречающихся на теле пчёл акароидных и других тромбидиформных клещей, используя соответствующие руководства по их определению (например, Определитель обитающих в почве клещей. Л.: Наука, 1977; М.: Наука, 1978 и др.).

## 4. ДИАГНОЗ

4.1. Диагноз на экзоакарапидоз считается положительным после обнаружения его возбудителей на теле пчел, а на акарапидоз - при выявлении **A. woodi** в трахеях насекомых.

•

Методические указания по диагностике возбудителей акарапидоза и экзоакарапидоза пчел переработаны и дополнены сотрудниками ВИЭВ, ВНИИВЭА, ВНИИВСГЭ, ТГСХА и ЗНКЛ ВГНКИ (г. Курган).

С утверждением настоящих Методических указаний утрачивают силу на территории Российской Федерации "Методические указания по диагностике наружных клещей акарапис на пчелах", утвержденные ГУВ МСХ СССР 05.07.1983 года и "Методические указания по диагностике акарапидоза пчел", утвержденные ГУВ МСХ СССР 20.04.1984 года.

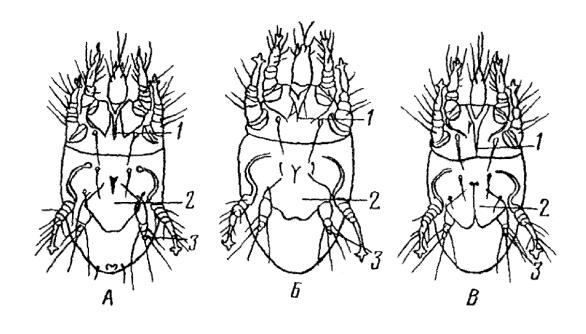


Рис. Различия в строении тела акараписов; A—A. externus; B— A. woodi; B— A. dorsalis; 1— аподема; 2— кокса; 3 -членик лапки (Мишель, 1962).