



МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ
ВЕТЕРИНАРИИ
(с Государственной ветеринарной инспекцией)

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

от 25.04.85г. № 115-6а

Москва

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Главного управления
ветеринарии Министерства сель-
ского хозяйства СССР

В.Соснин
А.Д.Третьяков
"25" апреля 1985 г.

По диагностике нозематоза
медоносных пчел

1. Общие положения

1.1. Нозематоз - инвазионная болезнь пчелиных семей, вызы-
ваемая микроспоридией *Nosema apis*. Бол. нь характеризуется ослаб-
лением пчелиных семей, снижением их продуктивности и гибелью
пчел.

Наиболее ост о (с клиническими признаками) болезнь проявля-
ется в апреле-мае и значительно слабее (асимптомно) - в конце
августа-начале сентября.

1.2. Диагноз на нозематоз ставят на основании клинических,
эпизоотологических и лабораторных данных.

1.3. Для исследования в ветеринарную лабораторию посылают
пробы по 50-100 живых пчел от семьи или свежий подмор от 10-20%
пчелиных семей, имеющихся на пасеке, погибшую матку, а также фека-
лии от пчел; 5,0 г меда, 0,5 г перги или пыльцевой обножки, смывы
с листов воишим.

1.3.1. Для прижизненной диагностики нозематоза матки ее ос-
торожно помещают под стеклянный колпак, на дно которого кладут
стеклянную пластинку или целлофан. Постланный материал с испраж-
нениями матки сушат и отправляют в лабораторию.

1.3.2. Сбор фекалий пчел проводят весной перед их массовым
облетом. С этой целью на передней стенке улья укрепляют на
1-1,5 часа лист белой бумаги (размаром 20 x 30 см) с обозначением
номера улья. Фекалии со стенок улья или рамок собирают путем их
соскоба с поверхностей.

2

1.3.3. Пробы меда отбирают непосредственно из семей пчел путем вскрытия ячеек или из среднего и нижнего слоя этого продукта, хранящегося в таре.

1.3.4. Пробы перги берут из сотов чистым шпателем, а пыльцевую обножку отбирают из пылеуловителей.

1.3.5. Для исследования восины из разных мест пачки отбирают по 5 листов, с обеих поверхностей которых делают смывы, расходуя на каждый лист по 50 мл воды. Смывы собирают в чистые флаконы.

2. Порядок исследования

2.1. При исследовании пчел от них отделяют брюшки в мерный цилиндр. К пробе пчел добавляют воду по 1 мл на пчелу, содержимое тщательно растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством песка (стекла) или в гомогенизаторе до получения суспензии. Каплю полученной суспензии помещают на предметное стекло, накрывают покровным и исследуют в затемненном поле микроскопа. Исследуют до 20 полей при увеличении 400-600 раз. При наличии спор ноземы видны овальные, преломляющие свет тела. Степень поражения пчел ноземой оценивается в крестах: до 10 спор - один крест, до 100 - два, до 1000 - три и свыше 1000 - четыре креста.

2.2. Погибшую пчелиную матку считают как пробу от семьи. Ее исследуют индивидуально, гомогенизируя с 1 мл воды. При обнаружении под микроскопом спор ноземы в гомогенате, независимо от их количества в поле зрения, степень инвазии оценивается в четыре креста.

2.3. Для определения количества спор в пробе ведут подсчет их в 5 больших или 80 маленьких квадратах камеры Горяева. Зная объем камеры, общий объем пробы и число пчел вычисляют количество спор на одну пчелу.

2.4. Фекалии осторожно снимают скальпелем со стеклянных пластинок, целлофана или бумаги на предметное стекло, добавляют 1-2 капли воды, тщательно размешивают препаровальной иглой до получения однородной массы, накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом.

2.5. К 2,1 г (1,5 мл) меда добавляют 5 мл воды и 10 мл этилового спирта, тщательно размешивают и центрифугируют при 2500-3000 об/мин 5-10 мин, после чего осадок исследуют под микроскопом.

3

2.6. 250 мг перги или пыльцевой обножки наносят на предметное стекло, добавляют 3-5 капель воды (лучше раствор Люголя), тщательно растирают и исследуют под микроскопом.

2.7. Смывы с листов воины разливают в стерильные центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин при 2500-3000 об/мин, полученный осадок исследуют под микроскопом.

2.8. С целью дифференциации спор нозем используют контрастные методы окраски. Мазки фиксируют в метиловом спирте (5-10 мин) или спирт-эфире (15-20 мин) и подвергают воздействию 10-30% перекиси водорода в течение 14 часов. Затем ополаскивают водой и красят азокармином в течение 7 часов при комнатной температуре или 2 часов при 56°C. Исследования проводят под увеличением 400-600 раз или иммерсионной системой микроскопа. Зрелые споры микроспоридий не окрашиваются, выглядят в виде вытянутых образований с закругленными концами.

2.9. Для выявления стадий развития возбудителя используют препараты-отпечатки со средней кишки или гистологические срезы этого органа. После фиксации препараты окрашивают по Романовскому-Гимза, Цаль-Нильсену и другими красителями.

2.10. Для определения жизнеспособности спор их окрашивают водным раствором акридина-оранжевого в разведении 1:20000-1:25000. Препараты промывают дистиллированной водой и исследуют под люминесцентным микроскопом (светофильтры: ФС-1-2, ФС-1-4, СЭС-24 или СЭС-14, БС-8-2, запирающий фильтр КС-18, окуляры 8х, 10х, объектив х90. Сила тока при микроскопировании 4,0-4,5 А). Живые споры светятся ярко-зеленым, а погибшие - медно-красным цветом.

2.11. Видовую принадлежность спор нозем определяют непрямой методом реакции иммунофлуоресценции (РИФ).

Подсушенные на воздухе мазки-отпечатки из средней кишки или из гомогената пчел фиксируют в течение 30 мин спирт-эфиром (1:1). На мазок наносят несколько капель иммунной сыворотки (цельной или разведенной 1:10). Препараты помещают на 1 час во влажную камеру при 37°C и после этого в течение 30 мин промывают в 0,15 М растворе МСГ (рН 7,2-7,4), (иммунная сыворотка в *Нозема фриз* пчел готовят ИЭВ).

На подсушенные препараты наносят по 1-2 капли антивидовой сыворотки иммунной сыворотки (готовит ИЭВ из Н.Ф. Гимален), выдерживают во влажной камере при 37°C в течение 1 часа и промывают 30 мин в физиологическом растворе (рН 7,2-7,4), при этом дважды

меняют раствор. После просушки на мазок наносят каплю нефлуоресцирующего иммерсионного масла или диметилфталата и исследуют под люминесцентным микроскопом (см. пункт 2.10).

Реакцию считают положительной при наличии ярко-зеленой люминесценции оболочек спор *Noctua apis*.

В контрольных мазках, обработанных нормальной сывороткой вместо иммунной, свечения не наблюдается; в мазках, содержащих искомым антиген *N. apis* (готовит ВИЭВ) реакция должна быть положительной.

Печ. цех Минсельхоза СССР, тираж 300 экз., заказ № 305