

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВЫХ МЕТОДОВ ОБНАРУЖИВАНИЯ ПАТОГЕННЫХ АГЕНТОВ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Рут ВАЙТ¹, Хелен ТОМПСОН¹, М. БРАУН¹, М. ВАТКИНС², М. БЮ¹, ВЕЛИКОБРИТАНИЯ

Ruth WAITE¹, Helen THOMPSON¹, M. BROWN¹, M. WATKINS², M. BEW¹

¹National Bee Unit, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, ENGLAND

²Vita (Europe) Ltd, 21 Wote Street, Basingstoke, RG21 7NE, ENGLAND

Аннотация

National Bee Unit, часть Central Science Laboratory (исполнительное агентство Департамента среды, питания и сельских проблем) занимается разработкой новых техник обнаруживания патогенных агентов пчел. В настоящее время изучаются два метода: тест на основе антител, для идентифицирования различных форм гнильца и лабораторный тест на основе нуклеотидов для вирусов.

Наборы инструментов теста в полевых условиях для гнильца предназначены для обнаруживания патогенных микроорганизмов *Melissococcus plutonius* и *Paenibacillus larvae*, подвид *larvae*. Моноклонные противотела (IgG) получены в Центральной научной лаборатории (CSL) при применении свежеизолированных бактерий, полученных из инфицированного материала. Наборы основываются на существующей технологии CSL. Антитела экзамированы для установления специфичности для бактерии, причем тестированы для перекрестной реактивности с другими бактериями, в том числе для *Paenibacillus alvei* и *Brevibacillus laterosporus*. Наборы для американского гнильца (AFB) были подтверждены в лаборатории в 2002 г и готовы для применения в полевых условиях в 2003 г. Для европейского гнильца (EFB) работы продолжаются.

Техника обнаруживания вирусов основывается на методе PCR под названием TaqMap®. Имеются генетические части многочисленных вирусов пчел и проектированы начальные стадии для определенных вирусов (вируса Кашмир и вируса острого паралича) для их обнаружения в пробах пчелиных семей. Методология располагает большим количеством проб-баз, с 1500 потенциальными тестами в каждую неделю, способными одновременно обнаруживать четыре разных вируса. Следовательно, данная технология располагает высоким потенциалом для проектов исследования не только во Великобритании, но и за рубежом. Разработан также зонд ДНК для идентифицирования ДНК африканизированной пчелы.

Введение

Несмотря на прогресс в области диагностирования болезней, методы, применяемые в данной области продолжают основываться на традиционных технологиях, как элементарная микроскопия или серологическое тестирование. National Bee Unit (NBU), часть Центральной научной лаборатории экзамирует новые техники для быстрого обнаруживания патогенных агентов пчел. В данный момент испытываются два метода: один из них – тест в полевых условиях для идентифицирования форм гнильца, второй – лабораторный тест, основывающийся на наличии нуклеотидов, для идентифицирования вирусов. Цель настоящей работы – введение данных методов для диагноза болезней пчел.

Медоносные пчелы инфицированы относительно небольшим числом болезней, которые поражают в основном взрослых особей или личинок. Две из этих болезней – американский гнилец и европейский гнилец. Обе вызваны бактериями и поражают личинок. Частота этих болезней имеет большое экономическое влияние на пчеловодную промышленность, ведь пчелы играют высокую роль в опылении растений и производстве меда и воска (КАРРЕК и ВИЛЛИАМС, 1998). Обе болезни описаны в литературе по специальности (ШИМАНУКИ, 1983; ШИМАНУКИ, 1990; ХАНСЕН и БРОДСГААРД, 1999). Американский гнилец (АГ) вызывается *Paenibacillus larvae*, подвид *larvae*, (ХОРНИЦКИ, 1998), известная раньше как *Bacillus larvae* (ГЕЙНДРИКХ с сотр., 1996), аэробная бактерия, генерирующая споры. Европейский гнилец (ЕГ) вызывается микроаэрофильной бактерией *Melissococcus plutonius*, известная раньше как *Melissococcus pluton* (БЕЙЛИ и КОЛЛИНС, 1982; БЕЙЛИ, 1983; ТРЮПЕР и де'КЛАРИ, 1998). Но есть и другие бактерии, обнаруженные в личинках, пораженных ЕГ, как, например, *Paenibacillus alvei* и *Brevibacillus laterosporus*, которые считают сапрофитными второстепенными организмами (АЛИППИ, 1991). Обе указанные болезни встречаются во всем мире, хотя АГ вообще уделяется большее внимание. ЕГ является мажорным объектом исследований во Великобритании, но он относительно мало исследуется в других зонах мира (ШИМАНУКИ, 1990; ТОМПСОН и БРАУН, 2001). В условиях законодательства по болезням пчел во Великобритании обе болезни должны быть объявлены авторитетам по специальности. В Англии и Уэльсе NBU координирует программы здоровья пчел, как для Defra, так и для Департамента сельского хозяйства Уэльса (NAWAD). NBU располагает группой инспекторов по пчеловодству, которые контролируют все пчелиные семьи английской и уэльской территории. Если предполагается, что одна семья инфицирована одной из этих болезней они берут личиночную симптоматическую пробу, которую отправляют в лабораторию диагноза NBU.

Благоприятный эффект имеет набор теста, способный подтверждать болезнь в условиях поля. Он позволяет инспекторам по пчеловодству на месте подтверждать диагноз, а это способствует более эффективному эффекту борьбы против болезни. Центральная научная лаборатория (CSL) располагает 600 научных работников в разных областях, в том числе молекулярной биологии,

аналитической химии и патологии насекомых. В рамках организации функционирует и группа для развития наборов тестирования в полевых условиях для быстрого диагностирования заболеваний, главным образом растений. Такие наборы, названные установками бокового течения (LFD) развиты для быстрого диагностирования в поле вирусов растений (картофеля X и Y) (ДЕНКС и БАРКЕР, 2000). Наша работа направлена на применение этой технологии для получения наборов по диагностированию гнильца.

В случае пчел другой проблемой является присутствие вирусов. Имеется ряд техник для борьбы с ними, в том числе иммуннодиффузия в геле или тесты на основе ELISA, которые используют поликлональные противотела (АНДЕРСОН, 1984; ТОДД и БОЛЛ, 2003). Имеющиеся в данный момент методы полезны для сильно инфицированных проб или для небольшого количества проб, но трудно применяются для широкомасштабных проб. Кроме того, серологические методы, (специфичные и чувствительные), для обнаружения вирусов медоносной пчелы применяются с трудом, так как многие препараты вирусов пчел являются смесями. Большинство семей имеют один или больше вирусов (БЕЙЛИ с сотр., 1981; ШТОЛЬЦ с сотр., 1995; ЕВАНС и ХУНГ, 2000). По этой причине довольно трудно производить реальные специфичные противосыворотки для каждого вируса пчел (АНДЕРСОН, 1984).

В последние годы сегментированы многие вирусы пчел. Они находятся в банках данных и свободно доступны для публики, например GenBank и EMBL (ГОШ с сотр., 1999; ГОВАН с сотр., 2000). Названия вирусов установлены приблизительно (ЕВАНС и ХУНГ, 2000; МАЙО, 2002). Но все же предприняты некоторые исследования для установления их частоты (АЛПЕН и БОЛЛ, 1996). Повышенное наличие вирусных секвенций позволило NBU применять новую технику идентификации вирусов, названную TaqMan®.

Материал и методика

Установки бокового течения

Первоначальные исследования

Наборы тестирования в условиях поля, названные установками бокового течения проектированы для обнаружения бактерии, ассоциированной с АГ (*P. larvae* подвид *larvae*). В Центральной научной лаборатории развито несколько моноклональных противотел и изучены для установления их специфичности к *P. larvae* подвид *larvae*. После первоначального исследования одно противотело избрано как самое подходящее по его активности, способности быть использовано в LFD и отсутствию перекрестной реакции против других бактерий улья, в том числе *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* подвид *pulvificiens* и *P. alvei*.

Лабораторное утверждение

Лабораторное утверждение включает тестирование разных проб, которые, обычно, высылаются в лабораторию диагноза NBU для установления, являются ли они специфичными для *P. larvae* подвид *larvae* или нет. Несмотря на то, что большинство протестированных проб оказались инфицированными одним из двух упомянутых заболеваний, обнаружены и другие, как известковый расплод, а также здоровые личинки.

TaqMan® для идентификации вирусов

Первоначальные исследования

Для сравнения варибельности между и внутривирусной последовательности, гены покрова вируса Кашмир пчел (KBV), вируса острова паралича пчел (ABPV), вируса мешотчатого расплода (SBV) и вируса черного маточника (BQCV) были взяты из банка данных EMBL. Были осуществлены многочисленные расположения последовательности применяя алгоритм CLUSTAL V в пакете Megalign (стар ДНК). Затем осуществлен филогенетический анализ применяя алгоритм Юкса и Кантора и образуя комки, присоединенные к TREECON (Ван Де ПЕР и Де ВАХТЕР, 1994). Статистическое значение появления разветвлений определено путем образования 100 ответов нового взятия проб "шнурком".

Зонд TaqMan® и рисунок начальной стадии

Рисунок начальной стадии и зонды для тестов TaqMan® осуществлены при использовании программы Primer Express™ (PE-Biosystems), как показали МУМФОРД с сотр. (2000). Начальные стадии и зонд FAM проектированы для KBV, CWV, SBV и BQCV. Зоны избранной части для проекта

теста были те, в которых существовала высокая степень вариации между вирусными видами и высокий уровень консервирования внутри вида. Положительный внутренний контрольный тест (IPC) разработан для рибозомиального 18S гена медоносной пчелы *Apis mellifera*. Зонд этого теста этикетирован VIC; он может быть комплексно использован для любого разработанного вирусного теста. Данный контроль позволил мониторизировать эффективность вытяжки ДНК из проб и предупредить ложные отрицательные результаты.

Тесты с TaqMan®

Реакции TaqMan® определены на пластинках с 96 отверстиями, применяя реактивные инструменты (PE- Biosystems) по полученным протоколам, но с добавлением 25 единиц M-MLV (Promega) для каждой реакции, к которой добавлен 1 µл вытяжки ДНК, до конечного объема 25 µл. Пластинки центрифугированы в условиях системы (48 °C/30 мин., 95 °C/10 мин., 40 циклов 60 °C/1 мин., 95 °C/15 сек.), в рамках единицы 7700 или 7900 системы детекции.

Результаты

Установки бокового течения

Первоначальные исследования

Были развиты противотела, активные против *P. larvae* подвид *larvae*. Экзаминированы лучшие из них, а одно избрано для продолжения исследований. Оно оказалось полностью специфичным для *P. larvae* подвид *larvae*, показывая отсутствие реактивности против следующих бактерий: *M. plutonius*, *B. laterosporus*, *P. larvae* подвид *pulvifaciens*, *P. alvei*, неидентифицированной анаэробной бактерии, изолированной из пробы, инфицированной Европейским гнильцом, *Escherichia coli* или *Ralstonia solanacearum*. Данное антитело было введено в тест установки бокового течения.

Утверждение в лаборатории

Таблица I вкратце перечисляет результаты утверждения в лаборатории для установки бокового течения в случае американского гнильца.

Таблица I

Тесты лабораторного утверждения установки бокового течения американского гнильца

Тип пробы	Всего тестировано	Реакция с LFD
AFB Положительная проба	77	71
EFB Положительная проба	87	1
Другие (например, извест ковый расплод)	31	0

Результаты показывают, что тест LFD оказался высоко специфичным для личинок, инфицированных американским гнильцом. Регистрирована только одна положительная ложная реакция у одной замороженной личинки, инфицированной европейским гнильцом. Она показала слабую положительную реакцию. Можно считать, что это изолированный случай, который, вероятно, не может повторяться. Пробы, первоначально диагностированы как положительные для американского гнильца, но затем не реагировали на набор LFD, были очень разбавленными. Результаты не удивительны, так как наборы разработаны для обнаруживания большого числа спор у одной симптоматической личинки. Не регистрированы реакции с другими тестированными личинками, например, содержащими *P. alvei* или *B. laterosporus* или с личинками, кажущимися здоровыми, происходящими из тех же сотов, как и личинки, инфицированные американским или европейским гнильцом.

TaqMan® для идентификации вирусов

Анализ единицы

Сравнивая единицы, интересные для вирусов, нами избраны зоны, способные предоставлять успешное сепарирование видов вирусов. Привлекают внимание вирус Кашмир и вирус острого паралича пчел. Данные два вида тесно связаны, несмотря на то, что последующий анализ показал, что верхний покров можно использовать для их сепарирования. Нам не удалось получить очищенную пробу вируса острого паралича пчел, для демонстрации отсутствия перекрестной реактивности. Единственная находящаяся в распоряжении единица вируса туманного крыла представлена геном

репликазы. Доказано, что ген репликазы вируса туманного крыла был идентичным с геном вируса Кашмир.

Тесты TaqMan®

Тесты TaqMan® применены на гамме очищенных вирусных препаратов, полученных от CSIRO, Австралия. Результаты представлены на рис. 1.

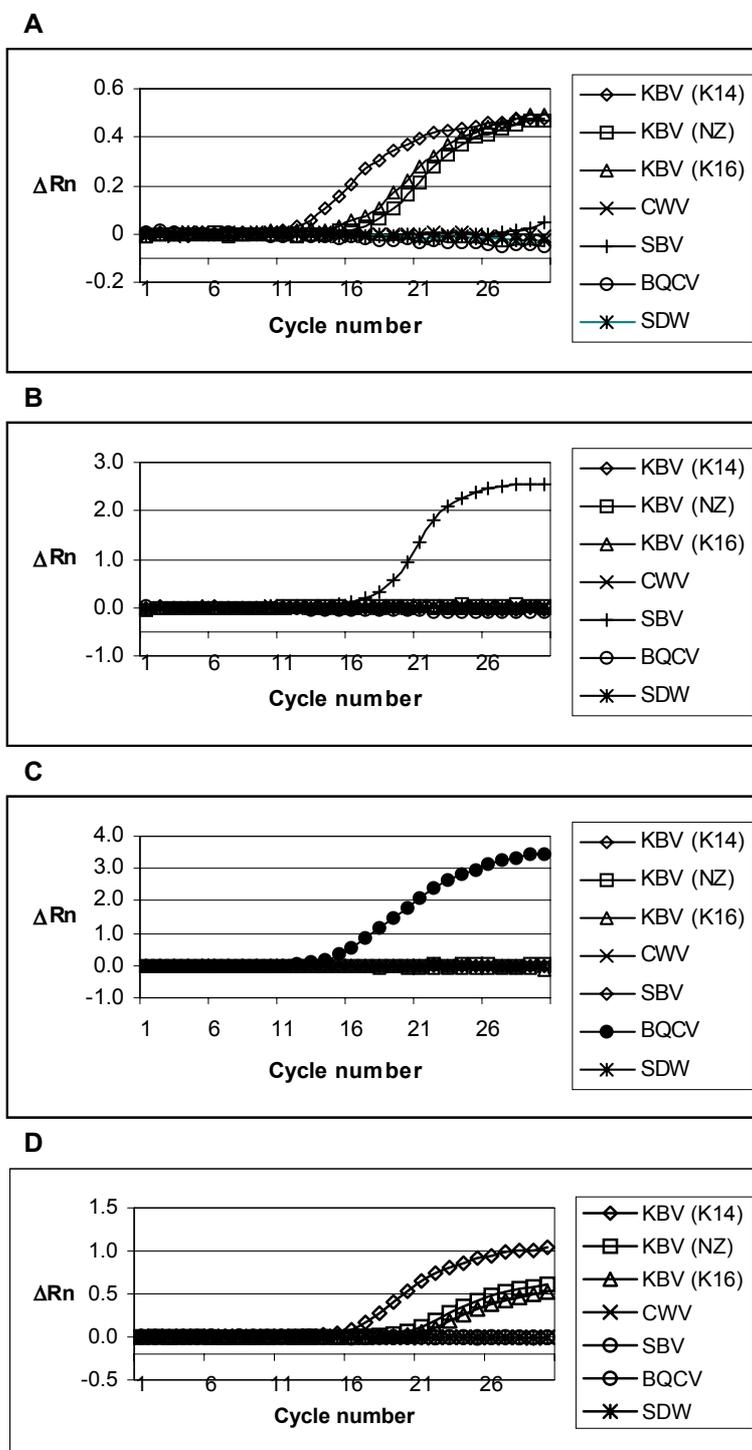


Рис. 1. Иллюстрирование обнаруживания вирусов пчел. А: Обнаруживание вируса Кашмир (KBV) с тестом KBV, В: Вирус мешотчатого расплода (SBV) с тестом SBV, С: Вирус черного маточника (BQCV) с тестом BQCV и D: Вирус KBV с тестом вируса туманного крыла CWV. SDW – отрицательный контроль, разбавленный с водой.
 (Cycle number = Число циклов)

В каждом случае тест дал ожидаемый результат. Тесты для вируса мешотчатого расплода и вирус черного маточника являются полностью специфичными, в то время как тесты для вируса Кашмир и туманного крыла показали все изолированные формы вируса Кашмир. Ни один из тестов не обнаружил ДНК в препарате вируса туманного крыла; необходимо продолжать исследования, хотя предполагается, что ДНК из препарата был деградированным. Тест для вируса Кашмир оказался специфичным для всех изолированных форм вируса Кашмир.

Дискуссии

Представленные в данной работе методы являются новыми в области диагноза болезней медоносной пчелы, несмотря на то, что они уже несколько лет применяются для болезней растений (МУМФОРД с сотр., 2000; ДАНКС и БАРКЕР, 2000). Они успешно приспособлены были для применения в случае пчел.

Полевые тесты для американского гнильца – совсем новый концепт в диагнозе болезней пчел. В странах, где обнаружены болезни пчел, анализы, обычно, проводятся в лаборатории (АЛИППИ, 1991; ОЙЕ, 2000). Возможность их проведения в полевых условиях представляет большой интерес, главным образом, в странах, где нет средств располагать обширными службами инспекции, как Австралия (ГУДВИН, личное сообщение). Наборы для обнаруживания европейского гнильца находятся в фазе утверждения в лаборатории. Предполагается, что стадия утверждения в условиях поля будет инициирована во Великобритании до конца сезона 2003 г. Данное заболевание радует самым большим интересом во Великобритании (ТОМПСОН и БРАУН, 1999).

Обнаруживание вирусов техникой TaqMan® имеет огромный потенциал для будущей деятельности, как во Великобритании, так и в других странах. Любое исследование вопроса присутствия вирусов пчел в пчелиных семьях зависело до сих пор от доступа к противосывороткам. Сравнение данных зависело от специфичности противосывороток, разработанных в разных лабораториях. Это очень важно, так как пчелы и их семьи часто представляют вирусные инфекции (ЕВАНС, 2001). Количественные тесты, подобные с ELISA требуют также доступа к адекватным противотелам и очищенным вирусным препаратам (ТОДД и БОЛЛ, 2003). В большинстве случаев, проведенным исследованиям не удалось обнаруживать не кажущиеся инфекции (ХОРНИЦКИ, 1987; АЛЛЕН и БОЛЛ, 1996). В результате применяемых методологий они ограничены и в размере применяемых проб (ТОДД и БОЛЛ, 2003), не всегда предоставляя выводные результаты (РИБИЕР с сотр., 2000). Однако, как показала настоящая работа, применение технологии TaqMan® превосходит проблемы, связанные с доступом к реактиву. Ее можно использовать в случае большого числа проб, причем применение контроля внутреннего рибозомиального гена 18S позволяет определять эффективность экстракции.

Эти новые технологии могут быть успешно применены для обнаруживания болезней пчел. Продолжение исследований могут вести к пониманию ряда неизвестных пока проблем и, может быть, к изысканию лучших способов контролирования болезней пчел.

Выражение благодарности

Авторы благодарят Криса ДАНКСА, Викторию ТОМКИС и Джонатана ФЛИНТА для разработки установки бокового потока, Нейла БУНАМА для разработки TaqMan® и Дениса АНДЕРСОНА для предоставления вирусных проб.

ЛИТЕРАТУРА

- Alippi A.M. (1991), A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*, in Argentina, *J. Apic. Res.* 30, 75-80
- Allen M., Ball B. (1996), The incidence and world distribution of honey bee viruses, *Bee World* 77, 141-162
- Anderson D.L. (1984), A comparison of serological techniques for detecting and identifying honeybee viruses, *J. Invertebr. Pathol.* 44, 233-243
- Bailey L. (1983), *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.), *J. Appl. Bacteriol.* 55, 65-69
- Bailey L., Ball B.V., Perry J.N. (1981), The prevalence of viruses of honeybees in Britain, *Ann. Appl. Biol.* 97, 108-118
- Bailey L., Collins M.D. (1982), Reclassification of '*Streptococcus pluton*' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton*, nom. rev.; comb. nov., *J. Appl. Bacteriol.* 53, 215-217
- Carreck N., Williams I. (1998), The economic value of bees in the UK, *Bee World* 79, 115-123
- Danks C., Barker I. (2000), On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices, *Bulletin OEPP* 30, 421-426
- Evans J.D. (2001), Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses, *J. Invertebr. Pathol.* 78, 189-193
- Evans J.D., Hung A.C. (2000), Molecular phylogenetics and the classification of honey bee viruses, *Arch. Virol.* 145, 2015-2026
- Ghosh R.C., Ball B.V., Willcocks M.M., Carter M.J. (1999), The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus, *J. Gen. Virol.* 80, 1541-1549
- Govan V.A., Leat N., Allsopp M., Davison S. (2000), Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses, *Virology* 277, 457-463
- Hansen H., Brødsgaard C.J. (1999), American foul brood: A review of its biology, diagnosis and control, *Bee World* 80, 5-23

- Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., Devos P., Logan N.A., Ali N., Berkeley R.C.W. (1996), Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 270-279
- Hornitzky M.A.Z. (1987), Prevalence of virus infections of honeybees in Eastern Australia, *J. Apic. Res.* 26, 181-185
- Hornitzky M.A.Z. (1998), The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly, *J. Apic. Res.* 37, 267-271
- Mayo M.A. (2002), Virus taxonomy - Houston 2002, *Arch. Virol.* 147, 1071-1076
- Mumford R., Barker I., Walsh K., Boonham N. (2000) The reliable detection of Potato mop-top and Tobacco rattle viruses directly from potato tubers, using a multiplex TaqMan[®] assay, *Phytopathology* 90, 1-6
- OIE (2000) Bee diseases in: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines (4th Edition), Section 2.9, www.oie.int, accessed 15th May 2003
- Ratnieks F.L.W. (1992), American foulbrood: The spread and control of an important disease of the honey bee, *Bee World* 73, 177-191
- Ribiere M., Faucon J.-P., Pepin M. (2000), Detection of chronic honey bee (*Apis mellifera* L.) paralysis virus infection: Application to a field survey, *Apidologie* 31, 567-577
- Shimanuki H. (1983), European foulbrood disease: its occurrence, treatment and prevention in the United States of America in: Proceedings of the International Symposium on European foulbrood, Quebec, Canada, 18-20 October 1981, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Quebec, Canada, pp 91-108
- Shimanuki H. (1990), Chapter Three: Bacteria in: Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, second edition, edited by R.A. Morse and R. Nowogrodzki, published by Cornell University Press, pp 28-47
- Stoltz D., Shen X.-R., Boggis C., Sisson G. (1995), Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection, *J. Apic. Res.* 34, 153-160
- Thompson H.M., Brown M.A. (1999), The role of the National Bee Unit in controlling statutory bee diseases, *Bee World* 80, 132-139
- Thompson H.M., Brown M.A. (2001), Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood?, *Bee World* 82, 130-138
- Todd J., Ball B. (2003), Viruses in New Zealand honey bees, *Bee Craft* (February), 12-13
- Trüper H.G., De' Clari L. (1998), Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition', *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 615
- Van de Peer Y., De Wachter R. (1994), TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment, *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570