

Научная статья  
УДК 638.162.3:576.385  
doi: 10.17223/19988591/70/8

## Выявление вируса мешотчатого расплода в личинках пчел и меда, определение его вирулентности

Виктория Алексеевна Строкова<sup>1</sup>, Александр Викторович Королев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научный центр пчеловодства, Рыбное, Россия

<sup>2</sup> Московская государственная академия ветеринарной медицины  
и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8364-8512>, [beevetnic@yandex.ru](mailto:beevetnic@yandex.ru)

<sup>2</sup> [5274381@mail.ru](mailto:5274381@mail.ru)

**Аннотация.** Вирус мешотчатого расплода пчел (*sacbrood virus*) является одной из распространенных и опасных болезней пчел и пчелиного расплода. Вирус разрушает клетки гипофарингеальных желез и жирового тела пчелы и личинок, что, в свою очередь, часто приводит к гибели личинок и сокращению продолжительности жизни пчел. С использованием метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени вирус мешотчатого расплода выявлен в меде. Показано цитопатическое действие вируса, выделенного из меда больных пчелиных семей, на культуры клеток млекопитающих. Обнаружены схожие значения количества вируса в личинках и меде, а также определена прямая корреляция наличия вируса в меде от клинически больных семей и культуре клеток млекопитающих. Нами впервые показано *in vitro*, что в меде от клинически больных семей, пораженных вирусом мешотчатого расплода, сохраняется вирулентный возбудитель как минимум в течение 10 суток (с момента отбора проб). Анализ меда методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени и индикация вируса на культуре клеток млекопитающих может служить методом неинвазивной диагностики мешотчатого расплода пчел.

**Ключевые слова:** вирус мешотчатого расплода пчел, мед, qRT-ПЦР, культура клеток, ЦПД

**Для цитирования:** Строкова В.А., Королев А.В. Выявление вируса мешотчатого расплода в личинках пчел и меда, определение его вирулентности // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 70. С. 143–156. doi: 10.17223/19988591/70/8

Original article

doi: 10.17223/19988591/70/8

## Detection of the sacbrood virus in bee larvae and honey, determination of its virulence

Victoria A. Strokov<sup>1</sup>, Alexander V. Korolev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal Scientific Center of Beekeeping, Rybnoye, Russia

<sup>2</sup> Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology  
named after K.I. Scriabin, Moscow, Russia

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8364-8512>, [beevetnic@yandex.ru](mailto:beevetnic@yandex.ru)

<sup>2</sup> [5274381@mail.ru](mailto:5274381@mail.ru)

**Summary.** Sacbrood virus (SBV) is a prevalent and serious disease affecting bees and their brood. The virus primarily targets larvae that are 2 to 3 days old, as well as adult bees. Under natural conditions, larvae become infected when they are fed by nurse bees, which themselves become infected while cleaning cells containing deceased larvae. The sacbrood virus damages the cells of the hypopharyngeal glands and the fatty body of both bees and larvae, often resulting in larval mortality and a decreased lifespan for adult bees. The clinical presentation of sac brood in bees is characterized by variegated brood, where the head ends of some larvae are visible, dead larvae appear in the shape of a 'boat', many empty cells. Additionally, dead bee larvae are observed in the form of sacs filled with liquid. However, these larvae can only be detected in cases of severe infection. The discovery of insect viruses in honey indicates that healthy bees may become infected with these viruses through nectar collected from honey-producing plants. According to bibliographic monitoring, honey within the Russian Federation has not yet been studied for the presence of viruses. Today, the issue of bee infection with the SBV remains a significant concern. A clear clinical picture of the disease typically emerges only in severe cases. However, the disease can go undetected even with a low level of damage to the bee colony caused by the sacbrood virus. Up to 6% of bee larvae may die due to this insidious disease. There may be a correlation between the concentration of SBV in the brood and honey, as a virulent pathogen can persist in honey. Consequently, the detection of SBV in honey could serve as a non-invasive method for the early diagnosis of the disease. The purpose of this study is to identify the sacbrood virus in honey and bee larvae and to assess its potential virulence by infecting mammalian cell cultures.

A veterinary examination of bee colonies in two apiaries located in Moscow Oblast was conducted, revealing a clinical presentation in seven colonies affected by the sacbrood virus (see Table 2). Molecular genetic analyses were performed at the Syntol LLC laboratory in Moscow, Russia. Samples of honey and bee larvae were tested for the presence of the sacbrood virus using real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) with the Iso Test-SBV (Syntol LLC, Moscow, Russia), following the manufacturer's guidelines. Amplification products were detected through real-time fluorescence on an ANK-32 analyzer. The following dyes were utilized: carboxyfluorescein (FAM - negative control) and carboxy-X-rhodamine (ROX). The detection of the bee brood sac virus was conducted using the A4×L cell culture, which consists of pig kidney SPEV-TK cells and horse lymphocytes (an interspecific hybrid strain) at the Department of Cellular Biotechnology and Nutrient Media of RES, Moscow, Russia. Honey samples for infecting the cell cultures were prepared as follows: 0.5 g of honey was dissolved in 1 ml of physiological saline, then centrifuged in a T-24 centrifuge at

10,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was transferred to a test tube, and the centrifugate was filtered through a 0.45 µm microfilter.

As a result of the studies, it was revealed that the sacbrood virus was present in honey and bee larvae across all examined bee colonies (see Table 3). Experiments involving the infection of a cell culture with the SBV isolated from honey demonstrated that after 168 hours of cultivation on the A4×L cell culture, cell degeneration was observed. This included the disruption of the monolayer's integrity, destruction of the cell membrane, vacuolization of the cytoplasm, and pyknosis of the nuclei. In contrast, the control group exhibited 98% preservation of the cell monolayer. The sacbrood virus isolated from honey induces cytopathic effects (CPE) on mammalian cell cultures. It is possible to identify the SBV in honey from infected colonies using a hybrid culture of mammalian cells, A4×L. The CPE of the virus was noted on the seventh day, indicating its virulence and confirming the potential for infection of bee colonies through honey. Similar quantities of the virus were detected in both larvae and honey (see Fig. 1, A). A strong correlation was also observed between the SBV content in honey and that in the A4×L hybrid cell culture (see Fig. 1, B). We have demonstrated for the first time in vitro that honey from clinically affected colonies retains the virulent sacbrood virus for at least 10 days from the time of sampling. The analysis of honey using qRT-PCR to detect SBV, along with the assessment of the virus's virulence on A4×L cell culture, can serve as an additional diagnostic method for sacbrood disease in bees.

*The article contains 1 Figure, 3 Tables and 31 References.*

**Keywords:** sacbrood virus, honey, qRT-PCR, cell culture, CPD

**For citation:** Strokova VA, Korolev AV. Detection of the sacbrood virus in bee larvae and honey, determination of its virulence. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;70:143-156. doi: 10.17223/19988591/70/8

## Введение

Вирус мешотчатого расплода пчел (SBV) является одной из распространенных и опасных болезней пчел и пчелиного расплода [1–6]. Согласно современной классификации, SBV относится к семейству *Iflaviridae*, порядку *Picornavirales* и роду *Iflavirus*. Вирус представляет собой сферический вирион в диаметре 30 нм, геном представлен линейной одноцепочечной молекулой РНК (+цепь) длиной около 8 900 нуклеотидных оснований с одной открытой рамкой считывания [7]. Вирус поражает личинок 2–3-дневного возраста и взрослых пчел. Заражение личинок в естественных условиях происходит в процессе их кормления пчелами-кормилицами, которые, в свою очередь, заражаются при чистке ячеек с погибшими личинками [8].

Клиническая картина мешотчатого расплода пчел заключается в следующем: пестрый расплод (в некоторых ячейках видны головные концы, погибшая личинка в форме «лодочка», много пустых ячеек), погибшие личинки пчел в виде мешочков, заполненных жидкостью. Однако обнаружить таких личинок можно только в случае тяжелого протекания болезни [7]. В этом случае в семье характерно наличие только одного вируса, что показано в статьях А.В. Королева и канадского энтомолога D. Suresh [2, 9]. Словенский вирусолог L. Šimenc установила положительную корреляцию между высокой вирусной нагрузкой и клиническими признаками мешотчатого расплода [10]. По данным французских исследователей P. Blanchard и

F. Schurt, в пчелиных семьях, в которых проявляются клинические признаки мешотчатого расплода, вирусная нагрузка превышает  $9 \log^{10}$  копий генома на пчелу [11, 12].

Обнаружение вирусов насекомых в меде позволяет предположить, что здоровые пчелы могут заражаться вирусом из нектара, собранного с медоносов для использования его во время изготовления меда [13]. Передача генотипа А вируса деформации крыла (DWV-A) возможна через мед и пыльцу [14–16]. РНК вируса черного маточника (BQCV) была обнаружена в 24 образцах меда (80%) из Сербии. Кашмирский вирус пчел (KBV) был определен в одном образце (20%) импортного меда, и вирус мешотчатого расплода – во всех 24 пробах меда и в 91,8% образцов пыльцы с пасеки Чешской Республики [17, 18]. Согласно библиографическому мониторингу, мед на территории Российской Федерации еще не исследовался на наличие вирусов.

Идентифицировать вирусы пчел в поступающих в лабораторию пробах (расплод и взрослые пчелы, продукты пчеловодства) возможно с помощью следующих методов: серологического с применением кроличьей гипериммунной сыворотки, иммунологического (реакция иммунодиффузии (РИД) в агаровом геле, реакция коагутинации (РКоА)), иммунохроматографического метода, культивирования вирусов на пчелах и куколках, электронной микроскопии, полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5–12, 17–24]. В настоящее время большинство отечественных и зарубежных авторов в своих исследованиях, связанных с вирусными инфекциями пчел, используют метод ПЦР [1–3, 5–12, 17–24], который широко используется в мировой практике. ПЦР – метод молекулярно-генетической диагностики, позволяющий определить наличие и видовую принадлежность вирусов, находящихся в организме в низких концентрациях.

На сегодняшний день вопрос заражения пчел мешотчатым расплодом остается актуальным. Четкая клиническая картина болезни возможна только в случае ее тяжелого протекания. Однако болезнь может оставаться незамеченной даже при невысокой степени поражения пчелиной семьи вирусом мешотчатого расплода. До 6% личинок пчел погибают при отсутствии клинической картины болезни [19]. Возможно, существует взаимосвязь между количеством SBV в расплоде и меде, а также в меде может сохраняться вирулентный возбудитель. В связи с этим выявление вируса SBV в меде может служить неинвазивным методом ранней диагностики заболевания.

Цель работы – выявить вирус мешотчатого расплода пчел в меде и личинках пчел и определить его возможную вирулентность путем заражения культуры клеток млекопитающих.

### **Материалы и методы**

При проведении ветеринарного осмотра пчелиных семей двух пасек Московской области [25] выявлена клиническая картина поражения 7 семей вирусом мешотчатого расплода (3 семьи на пасеке № 1 и 4 семьи на пасеке № 2). Образцы меда (100 г) отбирали в отдельные стерильные

емкости, которые подписывали и хранили не более 10 суток при 5°C. Пробы личинок отбирали из пораженных SBV семей в количестве 3–5 штук (из одной семьи) в стерильные емкости и хранили не более 10 суток при температуре от –15°C до –20°C.

Молекулярно-генетические исследования проводили на базе лаборатории ООО «Синтол». Пробы меда и личинок пчел анализировали на вирус мешотчатого расплода методом ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (qRT-ПЦР, qRT-PCR) набором реагентов «Изо Тест-SBV» (НПФ «Синтол», Россия, г. Москва). Для выделения суммарной РНК вируса мешотчатого расплода пчел из меда исследуемый материал использовали без предварительной подготовки. РНК из меда и личинок выделили на магнитных частицах с помощью набора реагентов «М-Сорб-Инсект» (НПФ «Синтол», Россия, г. Москва) по протоколу производителя. С выделенной РНК проводили реакцию обратной транскрипции (синтез одноцепочечной молекулы ДНК на матрице мРНК) с использованием фермента ревертазы, согласно инструкции к набору реагентов «Изо Тест-SBV» (НПФ «Синтол», Россия, г. Москва).

Полученную кДНК анализировали методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров, комплиментарных концам 5' → 3' РНК вируса мешотчатого расплода пчел (табл. 1) [26]. Режим амплификации: 1-я ступень – 62°C, 1 повтор, 30 с; 2-я ступень – 48°C, 1 повтор, 900 с; 3-я ступень – 90°C, 1 повтор, 30 с; 4-я ступень – 62°C, 1 повтор, 90 с; 5-я ступень – 85°C, 1 повтор, 40 с; 6-я ступень – 66°C, 40 повторов, 50 с. Продукты амплификации выявляли путем флуоресцентной детекции в режиме реального времени на анализаторе АНК-32. Использовали следующие красители: карбоксифлуоресцеин (FAM – отрицательный контроль) и карбокси-Х-родамин (ROX).

Индикацию вируса мешотчатого расплода пчел проводили на культуре клеток (ККл) А4×L (почка свиньи СПЭВ-ТК-х, лимфоциты лошади (межвидовой гибридный штамм)) (отдел клеточной биотехнологии и питательных сред ВИЭВ, Россия, г. Москва). Для поддержания клеточной культуры использовали среду Игла МЕМ 200 мл + сыворотка КРС 7% + фетальная сыворотка 3% (НПП «ПанЭко», Россия, МО). Для снятия клеток при пересеве использовали смесь 0,02% раствора версена с 0,25% раствором трипсина в соотношении 9:1 (НПП «ПанЭко», Россия, МО). Гибридная ККл А4×L представлена эпителиоподобными и лимфоцитоподобными клетками. Цитопатическое действие (ЦПД) вируса определяли после третьего пассажа.

Пробы меда для заражения культур клеток готовили следующим образом: 0,5 г меда растворили в 1 мл физиологического раствора, центрифугировали на центрифуге Т-24 при 10 000 об./мин 10 минут, надосадочную жидкость слили в пробирку, центрифугат профильтровали через микрофильтр 0,45 мкм. Для приготовления цитологических препаратов суспензию клеток внесли в количестве 2 мл в стерильные пенициллиновые флаконы с покровными стеклами, закрыли и поместили в термостат при 34,0°C на 72 часа.

Таблица 1 [Table 1]

**Последовательность использованных олигонуклеотидов (праймеров)**  
[Sequence of used oligonucleotides (primers)]

| Название<br>[Title] | Последовательность, 5' → 3'<br>[Sequence] |
|---------------------|-------------------------------------------|
| S-1f                | GGATGAAAGGAAATTACCAG                      |
| S-1r                | CCACTAGGTGATCCACACT                       |

Заражение ККл проводили по стандартной методике, рекомендованной МЭБ. Предварительно подготовленную суспензию меда с вирусом вносили при формировании 100% монослоя клеток. Использовали 8 пенициллиновых флаконов с культурой клеток A4×L на каждую пробу меда (6 опытных флаконов с SBV, 2 флакона являлись контрольными). Из контрольных флаконов удалили среду и внесли бессыывороточную среду Игла MEM с добавлением пенициллина. В опытные флаконы добавили суспензию меда с SBV и поместили в термостат при 34,0°C (экспозиция 2 часа). Затем из флаконов удалили содержимое, добавили бессыывороточную среду, поместили в термостат при 34,0°C и ежедневно контролировали состояние монослоя. Клеточную суспензию из контрольных и опытных флаконов осадил при 8 000 об./мин в течение 2 мин, отобрали культуральную жидкость, которую исследовали с использованием метода qRT-ПЦР.

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения ANK\_Cycles. Основным статистическим показателем являлся номер цикла на пороговом уровне логарифмической флуоресценции, который определяется как число Ct. Критерий корреляции изучаемых величин определяли по Пирсону в программе MS Excel 2016 [27]. Оценку специфической значимости коэффициента корреляции осуществляли при помощи *t*-критерия Стьюдента ( $t_r$ ).

### Результаты исследования и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено, что во всех изученных пчелиных семьях присутствует вирус мешотчатого расплода в меде и личинках пчел (табл. 2), что согласуется с данными, полученными исследователями E. Čukanová et al. при анализе меда из инфицированных SBV пчелиных семей [18].

Опыты с заражением культуры клеток вирусом мешотчатого расплода, выделенного из меда, показали, что через 168 часов (7 суток) культивирования на культуре клеток A4×L отмечается дегенерация клеток: нарушение целостности монослоя, разрушение клеточной оболочки и вакуолизация цитоплазмы, а также пикноз ядер в отличие от контроля, где наблюдали 98% сохранности монослоя клеток. Вирус мешотчатого расплода, выделенный из меда, оказывает ЦПД на культуру клеток млекопитающих, что наблюдается во всех опытных образцах (табл. 3). Корейским исследователем Chang-Hee Kweon получена аналогичная картина (нарушение целостности монослоя, вакуолизация цитоплазмы, пикноз ядер) воздействия SBV

Таблица 2 [Table 2]

**Результаты ПЦР-диагностики меда и личинок пчел**  
[The results of PCR diagnostics of honey and bee larvae]

| № пасеки/пчелиной семьи<br>[Number of apiary/bee family] | Наличие SBV, Ct ROX<br>[Availability of SBV] |                |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------|
|                                                          | Личинка<br>[The larva]                       | Мед<br>[Honey] |
| 1/1                                                      | +32,86                                       | +29,06         |
| 1/2                                                      | +33,38                                       | +28,55         |
| 1/3                                                      | +30,70                                       | +28,72         |
| 2/4                                                      | +31,23                                       | +29,43         |
| 2/5                                                      | +30,25                                       | +28,63         |
| 2/6                                                      | +31,55                                       | +29,13         |
| 2/7                                                      | +32,72                                       | +29,56         |

*Примечание.* Здесь и в табл. 3 Ct – номер цикла на пороговом уровне логарифмической флуоресценции по красителю ROX.

[Note. Here and in table 3. Ct is the cycle number at the threshold level of logarithmic fluorescence for the ROX dye].

Таблица 3 [Table 3]

**Индикация SBV из меда на культуре клеток A4×L**  
[Indication of SBV from honey on A4×L cell culture]

| № пасеки/<br>пчелиной<br>семьи<br>[Number of<br>apiary/bee<br>family] | Мед<br>[Honey]                                   | Культура клеток A4×L<br>[A4×L cell culture]       |                                                  |                                                   |                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                                                       |                                                  | Опыт (n = 6)<br>[Experience]                      |                                                  | Контроль (n = 2)<br>[Control]                     |                                                  |
|                                                                       | SBV<br>(qRT-<br>ПЦР<br>[qRT-<br>PCR]),<br>Ct ROX | Цитопатическое<br>действие<br>[Cytopathic effect] | SBV<br>(qRT-<br>ПЦР<br>[qRT-<br>PCR]),<br>Ct ROX | Цитопатическое<br>действие<br>[Cytopathic effect] | SBV<br>(qRT-<br>ПЦР<br>[qRT-<br>PCR]),<br>Ct ROX |
| 1/1                                                                   | +29,06                                           | +                                                 | +22,90                                           | –                                                 | –                                                |
| 1/2                                                                   | +28,55                                           | +                                                 | +21,78                                           | –                                                 | –                                                |
| 1/3                                                                   | +28,72                                           | +                                                 | +21,93                                           | –                                                 | –                                                |
| 2/4                                                                   | +29,43                                           | +                                                 | +23,14                                           | –                                                 | –                                                |
| 2/5                                                                   | +28,63                                           | +                                                 | +21,86                                           | –                                                 | –                                                |
| 2/6                                                                   | +29,13                                           | +                                                 | +23,04                                           | –                                                 | –                                                |
| 2/7                                                                   | +29,56                                           | +                                                 | +23,25                                           | –                                                 | –                                                |

*Примечание.* Культура клеток A4×L – почка свиньи СПЭВ-ТК-х, лимфоциты лошади (межвидовой гибридный штамм). «–» – цитопатическое действие вируса мешотчатого расплода пчел на культуру клеток A4×L отсутствует.

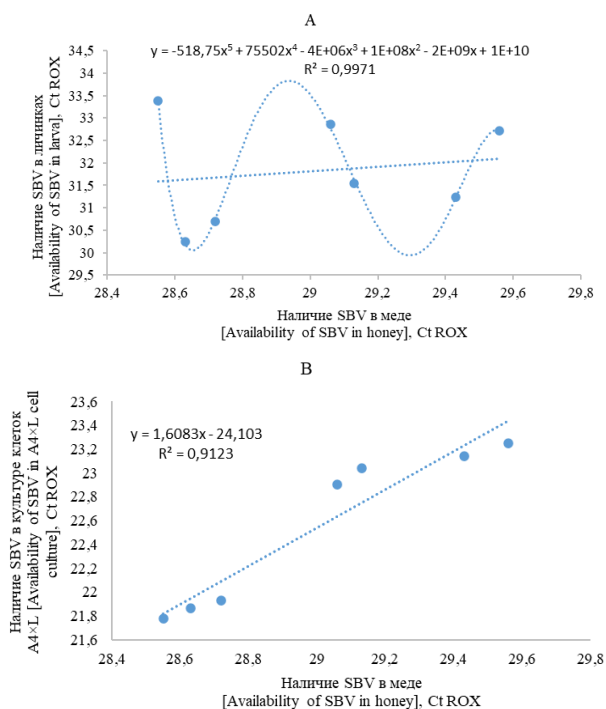
[Note. A4×L cell culture - pig kidney SPEV-TK-x horse lymphocytes (interspecific hybrid strain). «–» - the cytopathic effect of the bee sac brood virus on A4×L cell culture is absent].

на культуру клеток млекопитающих, но вирус был выделен из больных личинок пчел [28].

Таким образом, вирус мешотчатого расплода, выделенный из меда клинически больных семей, оказывает ЦПД на культуру клеток млекопитающих (A4×L) на 7-е сутки, что доказывает его вирулентность.

Для выявления линейной связи между наличием SBV в меде и личинках пчел, а также между зараженностью SBV меда и культуры клеток был выполнен корреляционный анализ (рис. 1). Для выявления нелинейной связи между наличием вируса в меде и личинках был найден показатель косинусного сходства. Показан высокий коэффициент корреляции между наличием вируса в меде и культуре клеток ( $r = 0,955$ ,  $t_r = 6,657$ ,  $p = 0,01$ ) (рис. 1, B), но не выявлено корреляции между наличием вируса SBV в меде и личинках пчел ( $r = 0,167$ ,  $t_r = 0,385$ ,  $p > 0,05$ ).

Полученное значение коэффициента корреляции говорит об отсутствии линейной связи между наличием SBV в личинках (X) и наличием SBV в меде (Y) (рис. 1, A), однако между этими показателями есть нелинейная связь ( $k = 0,9994$ ), которая указывает на близкие значения количества вируса в меде и личинках.



**Рис. 1.** Зависимость между содержанием вируса мешотчатого расплода пчел в меде и личинках (A), а также культуре клеток A4×L (B)  
**[Fig. 1.** Relationship between the content of bee sacbrood virus in honey (X-axis) and the content of bee sacbrood virus in larvae (A) and A4×L cell culture (B) (Y-axis)]

Вирус мешотчатого расплода активно размножается в гипофарингеальных железах молодых рабочих пчел, которые отвечают за физиологическое состояние медоносных пчел, что впервые в своих исследованиях отметила А. Maurizio [2, 4, 7, 29]. При нормальных условиях развития пчелиной семьи альвеолы желез значительно увеличиваются к 12-му дню. В это время в гипофарингеальных железах молодых рабочих пчел вырабатываются основные компоненты маточного молочка, которое они используют для кормления личинок рабочих пчел матки и трутня. В результате некачественного питания медоносных пчел, альвеолы желез достигают своего максимального значения в более ранние сроки, что, в свою очередь, приводит к раннему старению пчел и уменьшению продолжительности жизни [30]. При этом молодые рабочие пчелы раньше начинают выполнять не характерные для них работы (фуражирование, сбор пыльцы и т.д.), когда как должны заниматься чисткой ячеек и вылетать из улья с 18–21-го дня жизни [31]. Мы предполагаем, что вирусные инфекции также влияют на развитие гипофарингеальных желез пчел, при этом происходят морфологические изменения и нарушаются физиологические функции желез, что приводит к выполнению нехарактерных функций рабочих пчел и их раннему старению. У таких пчел раньше начинает вырабатываться фермент инвертаза, который они используют при получении меда, что, возможно, объясняет близкие значения количества вируса мешотчатого расплода в личинках и меде.

Нами показана тесная связь между содержанием SBV в меде и гибридной культуре клеток млекопитающих A4×L ( $r_{xy} = 0,955$ ). Количество вируса в культуре клеток напрямую зависит от количества вируса в меде. Отмеченные нами изменения в клеточной суспензии в виде нарушения целостности монослоя, разрушения целостности клеточной оболочки, вакуолизации цитоплазмы и пикноза ядер указывают на ЦПД вируса мешотчатого расплода пчел на гибридную культуру клеток A4×L. Следовательно, вирус мешотчатого расплода пчел в меде от клинически больных семей вирулентен. Согласно нашим исследованиям, вирулентный возбудитель вируса мешотчатого расплода пчел сохраняется в меде как минимум в течение 10 суток (с момента отбора проб), что указывает на наличие заболевания на пасеке и возможное заражение здоровых пчелиных семей.

Диагностика мешотчатого расплода пчел на пасеках осуществляется посредством клинического осмотра пчелиных семей на предмет обнаружения погибших личинок в форме «лодочка», с последующим лабораторным анализом взятых проб на предмет выявления SBV. Исследование меда на наличие вируса мешотчатого расплода методом qRT-ПЦР и индикация вируса на культуре клеток A4×L могут служить неинвазивным методом диагностики болезни мешотчатого расплода пчел.

### **Заключение**

Определить вирулентность вируса мешотчатого расплода пчел в меде от больных семей возможно на гибридной культуре клеток млекопитающих A4×L. Отмечено ЦПД вируса на 7-е сутки, что указывает на его виру-

лентность в культуре клеток и подтверждает возможность заражения пчелиных семей данным вирусом через мед.

Нами впервые показано *in vitro*, что в меде от клинически больных семей, пораженных вирусом мешотчатого расплода, сохраняется вирулентный возбудитель как минимум в течение 10 суток (с момента отбора проб).

Нами определены близкие значения количества вируса в личинках и в меде. Также показана очень тесная связь между содержанием SBV в меде и содержанием SBV в гибридной культуре клеток A4×L.

Анализ меда методом qRT-ПЦР на наличие SBV, и определение вирулентности вируса на культуре клеток A4×L может служить дополнительным методом диагностики мешотчатого расплода пчел.

#### Список источников

- Correa-Benítez A., Anguiano-Baez R., Heneidi-Zeckua A., Dávalos-Flores J.L., Peña-Haaz N.T., Pérez-Martínez E.E., Carbajal-Rodríguez M., Vasquez-Valencia I., Almazán-Maldonado N., Petukhova T., Guzman-Novoa E. Prevalence of adult honey bee (*Apis mellifera* L.) pests and pathogens in the five beekeeping regions of Mexico // *Animals* (Basel). 2023. Vol. 13 (11). 1734. doi: 10.3390/ani13111734
- Королев А.В., Нестерчук С.Л., Кокаева З.Г., Капустина Т.А. Циркуляция вирусов в популяции медоносных пчел в летне-осенний период // *Пчеловодство*. 2022. № 7. С. 20–22.
- Ullah A., Tlak Gajger I., Majoros A., Dar S.A., Khan S., Kalimullah, Haleem Shah A., Nasir Khabir M., Hussain R., Khan H.U., Hameed M., Anjum S.I. Viral impacts on honey bee populations: A review // *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021. Vol. 28 (1). PP. 523–530. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.037
- Стреленко П.А., Притыченко П.А. Вирусные болезни пчел // *Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и болезней пчел в современных условиях: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Смирновой Нины Ивановны и Дню белорусской науки*. 2024. С. 204–208.
- Alqurneh M., Bauer L., Hamdan A., Nairoukh I., Kaatz H. Prevalence of viruses in Palestinian honey bee colonies // *Egyptian Journal of Agricultural Sciences*. 2024. Vol. 75 (1). PP. 32–41. doi: 10.21608/ejarc.2024.341278
- Aubert M., Ball B.V., Fries I., Moritz R.F.A., Milani N., Bernardinelli I. Impact of virus infection in honey bees // *Virology and the Honey Bee*. Luxembourg: European Communities, 2008. PP. 233–253.
- Батуев Ю.М. Мешотчатый расплод // *Пчеловодство*. 2010. № 10. С. 24–27.
- Chen Y., Evans J., Feldlaufer M. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera* L. // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2006. № 92. PP. 152–159. doi: 10.1016/j.jip.2006.03.010
- Suresh D., Kumar S., Currie R. Occurrence, detection, and quantification of economically important viruses in healthy and unhealthy honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies in Canada // *The Canadian Entomologist*. 2015. Vol. 148 (1). PP. 22–35. doi: 10.4039/tce.2015.23
- Šimenc L., Knific T., Toplak I. The comparison of honeybee viral loads for six honey bee viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV) in healthy and clinically affected honeybees with TaqMan quantitative Real-Time RT-PCR assays // *Viruses*. 2021. Vol. 13 (7). 1340. doi: 10.3390/v13071340
- Blanchard P., Guillot S., Antúnez K., Köglberger H., Kryger P., de Miranda J.R., Franco S., Chauzat M., Thiéry R., Ribière M. Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan assay for quantitation of sacbrood virus (SBV) and its applica-

- tion to a field survey of symptomatic honey bee colonies // Journal of Virological Methods. 2014. № 197. PP. 7–13. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.09.012
12. Schurr F., Tison A., Militano L., Cheviron N., Sircoulomb F., Rivière M., Ribière-Chabert M., Thiéry R., Dubois E. Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honey bee viruses // Journal of Virological Methods. 2019. № 270. PP. 70–78. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.04.020
13. Roger A.C. Jones. Plant and insect viruses in managed and natural environments: novel and neglected transmission pathways // Advances in Virus Research, Academic Press. 2018. № 101. PP. 149–187. doi: 10.1016/bs.aivir.2018.02.006
14. Schittny D., Yañez O., Neumann P. Honey bee virus transmission via hive products // Veterinary Sciences. 2020. Vol. 7 (96). 96. doi: 10.3390/vetsci7030096
15. Balkanska R., Shumkova R., Atsenova N., Salkova D., Dundarova H., Radoslavov G., Hristov P. Molecular detection and phylogenetic analysis of deformed wing virus and sacbrood virus isolated from pollen // Veterinary Science. 2023. Vol. 10 (2). 140. doi: 10.3390/vetsci10020140
16. Mazzei M., Carrozza M.L., Luisi E., Forzan M., Giusti M., Sagona S., Tolari F., Felioli A. Infectivity of DWV associated to flower pollen: experimental evidence of a horizontal transmission route // Public Library of Science One. 2014. Vol. 9 (11). e113448. doi: 10.1371/journal.pone.0113448
17. Milićević V., Radojičić S., Kureljušić J., Šekler M., Nešić K., Veljović L., Maksimović Zorić J., Radosavljević V. Molecular detection of black queen cell virus and kashmir bee virus in honey // AMB Express. 2018. Vol. 8 (1). 128. doi: 10.1186/s13568-018-0655-7
18. Čukanová E., Proďálová J., Palíková M., Kováčová K., Linhart P., Papežíková I. Can the examination of different types of hive samples be a non-invasive method for detection and quantification of viruses in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies? // Journal of Veterinary Research. 2023. Vol. 67 (3). PP. 323–331. doi: 10.2478/jvetres-2023-0046
19. Bailey I., Gibbs A.J., Woods R.D. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) // Virology. 1964. Vol. 23 (3). PP. 425–429. doi: 10.1016/0042-6822(64)90266-1
20. Brzoskowski Chagas D., Liz Monteiro F., da Silva Barcelos L., Iuri Frühauf M., Botton N.Y., Ribeiro L.C., Fischer G. Detection of honey bee viruses in apiaries in Southern Brazil through two standardized multiplex RT-PCR // Journal of Apicultural Research. 2022. Vol. 62 (5). PP. 1207–1214. doi: 10.1080/00218839.2022.2106089
21. Bailey L., Woods R.D. Three previously undescribed viruses from the honey bee // Journal of General Virology. 1974. Vol. 25 (2). PP. 175–86. doi: 10.1099/0022-1317-25-2-175
22. De Miranda J.R., Bailey L., Ball B.V., Blanchard P., Budge G.E., Chejanovsky N., Chen Y., Gauthier L., Genersch E., de Graaf D.C., Ribière M., Ryabov E.V., De Smet L., van der Steen J.J. Standard methods for virus research in *Apis mellifera* L. // Journal of Apicultural Research. 2013. Vol. 52 (4). PP. 1–56. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.22
23. Shen M., Cui L., Ostiguy N., Cox-Foster D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honey bee host and the parasitic *Varroa mite* // Journal of General Virology. 2005. № 86. PP. 2281–2289. doi: 10.1099/vir.0.80824-0
24. Šimenc L., Knific T., Toplak I. The comparison of honey bee viral loads for six honey bee viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV) in healthy and clinically affected honey bees with TaqMan quantitative Real-Time RT-PCR assays // Viruses. 2021. Vol. 13 (7). 1240. doi: 10.3390/v13071340
25. СП 13-4-2/1362. Инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации болезней, отравлений и основных вредителей пчел от 17 августа 1998 г. 23 с.
26. Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E., Bergoin M. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor mite* populations in France // Applied and Environmental Microbiology. 2004. Vol. 70 (12). PP. 7185–7191. doi: 10.1128/AEM.70.12.7185-7191.2004

27. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel: Энциклопедия. Киев: Морион, 2001. 408 с.
28. Chang-Hee Kweon, Mi-Sun Yoo1, Jin-Hyeong Noh, Kondreddy Eswar Reddy, Dong-Kun Yang, Sang-Ho Cha, Seung-Won Kang. Derivation of cell-adapted sacbrood virus (SBV) from the native Korean honey bee // *Virus Research*. 2015. № 198. PP. 15–21. doi: 10.1016/j.virusres.2014.12.008
29. Maurizio A. Pollen nutrition and life processes of the honey bee // *Agricultural Yearbook of Switzerland*. Bern. 1954. Vol. 68 (2). PP. 115–182.
30. Королев А.В. Технологические приемы оптимизации жизнедеятельности пчелиных семей в блочных теплицах: дис. ... канд. сельскохозяйств. наук. М.: Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 2012. 135 с.
31. Таранов Г.Ф. Биология пчелиной семьи. СПб.: Наука, 2021. 288 с.

### References

1. Correa-Benítez A, Anguiano-Baez R, Heneidi-Zeckua A, Dávalos-Flores JL, Peña-Haaz NT, Pérez-Martínez EE, Carbajal-Rodríguez M, Vasquez-Valencia I, Almazán-Maldonado N, Petukhova T, Guzmán-Novoa E. Prevalence of adult honey bee (*Apis mellifera* L.) pests and pathogens in the five beekeeping regions of Mexico. *Animals (Basel)*. 2023;13(11):1734. doi: 10.3390/ani13111734
2. Korolev AV, Nesterchuk SL, Kokaeva ZG, Kapustina TA. Tsirkulyatsiya virusov v populyatsii medonosnykh pchel v letne-osenniy period [Circulation of viruses in the population of honey bees in the summer-autumn period]. *Pchelovodstvo*. 2022;7:20-22. In Russian
3. Ullah A, Tlak Gajger I, Majoros A, Dar SA, Khan S, Kalimullah, Haleem Shah A, Nasir Khabir M, Hussain R, Khan HU, Hameed M, Anjum SI. Viral impacts on honey bee populations: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(1):523-530. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.037
4. Strelenko PA, Pritychenko PA. Virusnye bolezni pchel [Viral diseases of bees]. In: *Aktual'nye voprosy veterinarnoy virusologii, mikrobiologii i bolezney pchel v sovremennykh usloviyakh*. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 95-letiyu so dnya rozhdeniya doktora veterinarnykh nauk, professora Smirnovoy Niny Ivanovny i Dnyu belorusskoy nauki [Current issues of veterinary virology, microbiology and bee diseases in modern conditions. Proc. of the International Scientific and Practical Conference dedicated to the 95th anniversary of the birth of Doctor of Veterinary Sciences, Professor Nina Smirnova and the Day of Belarusian Science (Vitebsk, Belarus, 7-8 December, 2023)]. Vitebsk: "Vitebsk Order" Badge Honorary degree of the State Academy of Veterinary Medicine; 2024. pp. 204-208. In Russian
5. Alqurneh M, Bauer L, Hamdan A, Nairoukh I, Kaatz H. Prevalence of viruses in Palestinian honey bee colonies. *Egyptian Journal of Agricultural Sciences*. 2024;75(1):32-41. doi: 10.21608/ejarc.2024.341278
6. Aubert M, Ball BV, Fries I, Moritz RFA, Milani N, Bernardinelli I. Impact of virus infection in honey bees. In: *Virology and the honey bee*. Luxembourg: European Communities; 2008. pp. 233-253.
7. Batuev YuM. Meshotchatyy rasplod [Baggy brood]. *Pchelovodstvo*. 2010;10:24-27. In Russian
8. Chen Y, Evans J, Feldlaufer M. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2006;92:152-159. doi: 10.1016/j.jip.2006.03.010
9. Suresh D, Kumar S, Currie R. Occurrence, detection, and quantification of economically important viruses in healthy and unhealthy honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies in Canada. *The Canadian Entomologist*. 2015;148(1):22-35. doi: 10.4039/tce.2015.23

10. Šimenc L, Knific T, Toplak I. The comparison of honey bee viral loads for six honey bee viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV) in healthy and clinically affected honey bees with TaqMan quantitative Real-Time RT-PCR assays. *Viruses*. 2021;13(7):1340. doi: 10.3390/v13071340
11. Blanchard P, Guillot S, Antúnez K, Köglberger H, Kryger P, de Miranda JR, Franco S, Chauzat M, Thiéry R, Ribière M. Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan assay for quantitation of sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *Journal of Virological Methods*. 2014;197:7-13. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.09.012
12. Schurr F, Tison A, Militano L, Cheviron N, Sircoulomb F, Rivière M, Ribière-Chabert M, Thiéry R, Dubois E. Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honey bee viruses. *Journal of Virological Methods*. 2019;270:70-78. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.04.020
13. Roger AC Jones. Plant and insect viruses in managed and natural environments: novel and neglected transmission pathways. *Advances in Virus Research, Academic Press*. 2018;101:149-187. doi: 10.1016/bs.aivir.2018.02.006
14. Schittny D, Yañez O, Neumann P. Honey bee virus transmission via hive products. *Veterinary Sciences*. 2020;7(96):96. doi: 10.3390/vetsci7030096
15. Balkanska R, Shumkova R, Atsenova N, Salkova D, Dundarova H, Radoslavov G, Hristov P. Molecular detection and phylogenetic analysis of deformed wing virus and sacbrood virus isolated from pollen. *Veterinary Science*. 2023;10(2):140. doi: 10.3390/vetsci10020140
16. Mazzei M, Carrozza ML, Luisi E, Forzan M, Giusti M, Sagona S, Tolari F, Felicioli A. Infectivity of DWV associated to flower pollen: Experimental evidence of a horizontal transmission route. *Public Library of Science One*. 2014;9(11):e113448. doi: 10.1371/journal.pone.0113448
17. Miličević V, Radojičić S, Kureljušić J, Šekler M, Nešić K, Veljović L, Maksimović Zorić J, Radosavljević V. Molecular detection of black queen cell virus and kashmir bee virus in honey. *AMB Express*. 2018;8(1):128. doi: 10.1186/s13568-018-0655-7
18. Čukanová E, Prodělalová J, Palíková M, Kováčová K, Linhart P, Papežiková I. Can the examination of different types of hive samples be a non-invasive method for detection and quantification of viruses in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies? *Journal of Veterinary Research*. 2023;67(3):323-331. doi: 10.2478/jvetres-2023-0046
19. Bailey I, Gibbs AJ, Woods RD. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.). *Virology*. 1964;23(3):425-429. doi: 10.1016/0042-6822(64)90266-1
20. Brzozkowski Chagas D, Liz Monteiro F, da Silva Barcelos L, Iuri Frühauf M, Botton NY, Ribeiro LC, Fischer G. Detection of honey bee viruses in apiaries in Southern Brazil through two standardized multiplex RT-PCR. *Journal of Apicultural Research*. 2022;62(5):1207-1214. doi: 10.1080/00218839.2022.2106089
21. Bailey L, Woods RD. Three previously undescribed viruses from the honey bee. *Journal of General Virology*. 1974;25(2):175-186. doi: 10.1099/0022-1317-25-2-175
22. De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge GE, Chejanovsky N, Chen Y, Gauthier L, Genersch E, de Graaf DC, Ribière M, Ryabov EV, De Smet L, van der Steen JJ. Standard methods for virus research in *Apis mellifera* L. *Journal of Apicultural Research*. 2013;52(4):1-56. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.22
23. Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honey bee host and the parasitic *Varroa mite*. *Journal of General Virology*. 2005;86:2281-2289. doi: 10.1099/vir.0.80824-0
24. Šimenc L, Knific T, Toplak I. The comparison of honey bee viral loads for six honey bee viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV) in healthy and clinically affected honey bees with TaqMan quantitative Real-Time RT-PCR assays. *Viruses*. 2021;13(7):1240. doi: 10.3390/v13071340

25. Instruksiya o meropriyatiyakh po preduprezhdeniyu i likvidatsii bolezney, otravleniy i osnovnykh vreditel'ey pchel. SP 13-4-2/1362 [Instructions on measures for the prevention and elimination of diseases, poisoning and major pests of bees]. Moscow: Rosselkhoz-nadzor; 1998. 23 p. In Russian
26. Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(12):7185-7191. doi: 10.1128/AEM.70.12.7185-7191.2004
27. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniem Excel: Entsiklopediya [Statistical methods in biomedical research using Excel: An Encyclopedia]. Kiev: Morion Publ.; 2001. 408 p. In Russian
28. Chang-Hee Kweon, Mi-Sun Yoo1, Jin-Hyeong Noh, Kondreddy Eswar Reddy, Dong-Kun Yang, Sang-Ho Cha, Seung-Won Kang. Derivation of cell-adapted sacbrood virus (SBV) from the native Korean honey bee. *Virus Research*. 2015;198:15-21. doi: 10.1016/j.virusres.2014.12.008
29. Maurizio A. Pollen nutrition and life processes of the honey bee. *Agricultural Yearbook of Switzerland*. Bern. 1954;68(2):115-182.
30. Korolev AV. Tekhnologicheskie priemy optimizatsii zhiznedeyatel'nosti pchelinykh semei v blochnykh teplitsakh [Technological techniques for optimizing the vital activity of bee colonies in block greenhouses] [CandSci. Dissertation, Agriculture]. Moscow: Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Scriabin; 2012. 135 p. In Russian
31. Taranov GF. Biologiya pchelinoi sem'i: Monografiya [Biology of the bee family: Monograph]. Saint Petersburg: Nauka; 2021. 288 p. In Russian

**Информация об авторах:**

**Строкова Виктория Алексеевна**, магистр ветеринарно-санитарной экспертизы; научный сотрудник отдела профилактики и лечения болезней пчел, Федеральный научный центр пчеловодства (Рыбное, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8364-8512>.

E-mail: beevetnic@yandex.ru

**Королев Александр Викторович**, канд. с.-х. наук, доцент кафедры частной зоотехнии, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина (Москва, Россия).

E-mail: 5274381@mail.ru

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

**Information about the authors:**

**Victoria A. Strokova**, Master of Science in veterinary expertise; researcher, Department of prevention and treatment of bee diseases, Federal scientific center for beekeeping (Rybnoye, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8364-8512>.

E-mail: beevetnic@yandex.ru

**Alexander V. Korolev**, Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor at the Department of private animal science, Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named after K.I. Scriabin (Moscow, Russian Federation).

E-mail: 5274381@mail.ru

*The Authors declare no conflict of interest.*

*Статья поступила в редакцию 19.01.2024;  
одобрена после рецензирования 17.03.2024; принята к публикации 19.05.2025*

*The article was submitted 19.01.2024;  
approved after reviewing 17.03.2024; accepted for publication 19.05.2025*