



DOI: 10.22363/2312-797X-2017-12-2-168-176

ПОДБОР КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ДЛЯ НАКАПЛИВАНИЯ IN VITRO ВИРУСА МЕШОТЧАТОГО РАСПЛОДА ПЧЕЛ

А.Г. Калинин^{1,2}, Т.В. Гальнбек², Е.В. Куликов¹

¹Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

²ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко
Рязанский проспект, 24-1, Москва, Россия, 109428

Проблемой своевременной диагностики является недоступность метода культивирования клеток *in vitro* вирусов пчел, из-за чего ограничивается понимание биологических механизмов, лежащих в основе вирусных заболеваний. Данные затруднения в работе вирусологов приводят к несвоевременной диагностике заболеваний и, как следствие, большим потерям в хозяйствах. В настоящее время существует очень мало сведений о культивировании вирусов пчел на гетерогенных клеточных культурах, дающих после пассажа патогена какие-либо дегенеративные изменения. Однако в последние годы идет активный спор по культивированию вирусов пчел на клеточных культурах. Уже сейчас стало известно, что наибольшей чувствительностью к вирусу мешотчатого расплода относятся эксплантаты яичников нимф маток пчел, культуры куриных фибробластов, ткань пчелиных фибробластов из грудных мышц взрослой пчелы, культуры тканей из репродуктивных органов, мышц и яиц пчелы первичнотрипсинизированная культура почек обезьян, первичная культура клеток, полученная от личинок рабочих пчел, культуры ПК-15, IBRS. Основная проблема культивирования вирусов пчел — малое количество данных о чувствительных клеточных культурах гетерологического типа. Однако исследования в данной области продолжаются, и ученые во всех странах мира пытаются решить серьезную задачу культивирования вирусов пчел. Основная проблема культивирования вирусов пчел — малое количество данных о чувствительных клеточных культурах гетерологического типа. Однако исследования в данной области продолжаются, и ученые во всех странах мира пытаются решить серьезную задачу культивирования вирусов пчел. В этой связи дать аналитический обзор по клеточному культивированию вирусов мешотчатого расплода пчел является определенной потребностью для правильного подхода к алгоритму диагностики.

Ключевые слова: пчелы, вирус мешотчатого расплода, клеточные культуры, культивирование вирусов пчел на клеточных культурах

Введение. Пчеловодство как отрасль сельского хозяйства выполняет важные функции по производству ценной продовольственной продукции, обеспечению опыления сельскохозяйственных культур и решению задач по занятости сельского населения. По данным ФАО, ежегодно в мире почти 80 млн пчелиных семей производят 1,5 млн т меда (в среднем 18,75 кг на одну семью).

Большое влияние на распространение вирусных заболеваний оказывают природно-климатические особенности регионов, а также санитарно-дезинфекционные

мероприятия и специфические лекарственные средства. Эта проблема является весьма актуальной, потому как до последнего времени лечебно-профилактических противовирусных средств для применения в пчеловодстве практически не было. Помимо этого отсутствуют специфические методы диагностики для выявления вирусов пчел [9]. Данные затруднения в работе вирусологов приводят к несвоевременной диагностике заболеваний и, как следствие, большим потерям в хозяйствах.

Одной из основных болезней пчел, вызываемых вирусами, является мешотчатый расплод [16]. Он широко распространен в популяциях медоносной пчелы на всех континентах. Вирусная инфекция у взрослых пчел развивается без клинических проявлений, но сокращает продолжительность жизни особей. Вирус накапливается в слюнных железах пчелы, а затем разносится внутри колонии при кормлении расплода и обмене кормом. Молодые личинки заражаются, потребляя инфицированный корм. Вирус начинает реплицироваться на личиночной стадии пчелы, вызывая пожелтение личинок после запечатывания расплода. Эта патология наносит значительный ущерб пчеловодству, так как больные семьи без оказания помощи не дают товарного меда и не обеспечивают себя кормом, хозяйства лишаются возможности продавать маток и пакеты пчел [11].

Цель работы: дать аналитический обзор по клеточному культивированию вирусов мешотчатого расплода пчел.

Результаты анализа и его обсуждение. Пчеловодство как отрасль сельского хозяйства выполняет важные функции по производству ценной продовольственной продукции, обеспечению опыления сельскохозяйственных культур и решению задач по занятости сельского населения. По данным ФАО, ежегодно в мире почти 80 млн пчелиных семей производят 1,5 млн т меда (в среднем 18,75 кг на одну семью). Российская Федерация (РФ) по итогам 2012 г. занимала шестое место в мире по получению меда (64,898 тыс. т — 3,8% от мирового производства) и числу пчелиных семей (3250 тыс. ульев — 4,07%). По объему производства меда в мире лидировал Китай — 436 тыс. т (27,4%). По численности пчелиных семей первое место занимала Индия — 11,5 млн ульев (14,4%) [10].

Согласно данным Федеральной службы государственной статистики РФ и Башкортостана, в 2012 г. по сравнению с 2010 г. производство меда в РФ выросло на 26%, в Республике Башкортостан (РБ) — на 20%, причем основной объем продукции производят в личных подсобных хозяйствах (ЛПХ) населения. Число пчелиных семей в РБ в 2012 г. по сравнению с 2010 г. увеличилось на 23,7%, в РФ — на 7,7%. Необходимо отметить, что при этом число пчелиных семей, содержащихся в сельскохозяйственных организациях, уменьшилось на 26,4 и 10,9% соответственно (табл. 1) [12].

Особую опасность для пчеловодства представляют вирусы, хотя вирусные инфекции не вошли в число самых опасных заболеваний пчел, ущерб от них может быть значительным. Большинство вирусных инфекций — бессимптомные, но в определенных условиях вирусы способны быстро реплицироваться и приводить к появлению видимых признаков заболевания, к гибели пчел [2].

Таблица 1

Производство меда и структура пчеловодства в РФ по типам хозяйств [3]

Показатели	РФ		
	2010 г.	2011 г.	2012 г.
Доля производства меда, % от общего объема:			
Сельскохозяйственные организации	3,4	2,7	2,2
ЛПХ	93,3	93,1	93,3
КФХ и ИП	3,3	4,2	4,5
Производство меда, т:			
Хозяйства всех категорий	51 535	60 011	64 898
Сельскохозяйственные организации	1 749	1 642	1 459
ЛПХ	48 063	55 855	60 553
КФХ и ИП	1 723	2 514	2 886
Число пчелиных семей, тыс. шт.:			
Хозяйства всех категорий	3 049,3	3 250,1	3 284,3
Сельскохозяйственные организации	137,2	137,3	122,2
ЛПХ	2 791,2	2 964,3	2 999,7
КФХ и ИП	120,9	148,5	162,4

Примечание. КФХ — крестьянские фермерские хозяйства; ИП — индивидуальные предприниматели.

Существует около 20 вирусов, которые представляют большую опасность для пчел. Отдельные штаммы очень контагиозны, приводят к коллапсу пчелиной семьи, что служит причиной потери огромного количества пчел, обуславливает экономический упадок отрасли [10]. К вирусным заболеваниям пчел в России относятся такие вирусы, как вирус деформации крыла, вирус черного маточника, Кашмир-вирус, вирусы острого и хронического паралича пчел. Данные по встречаемости болезней пчел представлены в табл. 2 (первым столбиком указано количество случаев встречаемости вируса, вторым — частота встречаемости) [7].

Таблица 2

Встречаемость вирусов пчел

№ п.п.	Регион	N	Наименование вируса											
			ABPV		DWV		CBPV		KBV		SBV		BQSV	
1	СК	31(93)	8	0,2580	2	0,645	1	0,0322	0	0,0	26	0,8387	0	0,0
2	РА	14(42)	5	0,3571	11	0,7857	4	0,2857	3	0,2143	7	0,5	7	0,5
3	ТУ	7(21)	7	1,0	7	1,0	5	0,7143	3	0,4286	5	0,7143	5	0,7143
4	АБ	5(15)	3	0,6	4	0,8	4	0,8	4	0,8	4	0,8	4	0,8
5	УД	30(30)	4	0,4	7	0,7	0	0,0	0	0,0	4	0,4	0	0,0
6	МОИ	3(90)	0	0,0	3	1,0	0	0,0	0	0,0	2	0,6666	0	0,0
7	МОД	4(12)	0	0,0	1	1,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Большое влияние на распространение вирусных заболеваний оказывают природно-климатические особенности регионов. Так, например, в Кавказском регионе, где преобладает избыточная влажность воздуха, частые осадки, чередующиеся температурные перепады, бедная кормовая база, дефицит природных растительных белков в лесной зоне, чрезвычайно трудно защитить пчел от возникновения заболеваний без санитарно-дезинфекционных мероприятий и специфических лекарств.

Эта проблема является весьма актуальной, потому как до последнего времени лечебно-профилактических противовирусных средств для применения в пчеловодстве практически не было. Помимо этого, отсутствуют специфические методы диагностики для выявления вирусов пчел [9]. Данные затруднения в работе вирусологов приводят к несвоевременной диагностике заболеваний и, как следствие, большим потерям в хозяйствах.

Также проблема своевременной диагностики заключается в том, что в настоящее время метод культивирования клеток *in vitro* вирусов пчел недоступен, из-за чего ограничивается понимание биологических механизмов, лежащих в основе вирусных заболеваний медоносных пчел [17]. Именно поэтому очень важно развивать методы культивирования, которые разрешили бы исследование вирусов медоносной пчелы *in vitro*. Кроме того, выделение вирусной репликации — это важный шаг к пониманию патологического процесса вирусов в организме хозяина [15].

Разработка методов культивирования клеток *in vitro*, освоение этих методов специалистами биофабрик позволила решить многие вопросы реального производства вирус-вакцин и диагностикумов [6]. Биофабрики, фирмы, НИИ России выпускают большое количество биопрепаратов, используя первичные культуры клеток, субкультуры, диплоидные штаммы, постоянные линии клеток, гибридные и генетически трансформированные культуры клеток животных [5].

Культуры клеток животных стали неотъемлемой частью биотехнологии, они используются для решения научных проблем общей биологии, цитологии, генетики, вирусологии, иммунологии и инфекционной патологии.

В настоящее время существует очень мало сведений о культивировании вирусов пчел на гетерогенных клеточных культурах, дающих после пассажа патогена какие-либо дегенеративные изменения [14]. Впервые развитие вируса пчел на культуре клеток отмечал Ваго. Он проводил свои исследования на эксплантатах яичников нимф маток пчел, в результате чего ему удалось вырастить вирус мешотчатого расплода [20]. Последующие результаты работ различных ученых подтвердили, что вирус культивируется в культурах ткани медоносных пчел. Вначале отмечается усиление митотической активности клеток, а через 72 ч появляются первые признаки дегенерации. Цитоплазма клеток становится зернистой, появляются вакуоли, клетки округляются и отстают от стекла. Повторное пассажирование вируса в культуре клеток сокращает инкубационный период проявления цитопатогенного действия на 24 ч [4].

Культивирование вируса возможно также в первичнотрипсинизированных культурах куриных и мышинных фибробластов, почек обезьян, что наблюдается в работах ряда авторов. Так, например, Н.И. Смирнова свои исследования проводила в первичнотрипсинизированной культуре куриных фибробластов. В результате экспериментов было выявлено, что цитопатическое действие (4+) наблюдалось через 94 ч после внедрения вируса. Цитопатогенное действие (ЦПД) проявлялось в виде округления, скопления клеток и образования окон в клеточном монослое. Клетки, расположенные на границе окон, имели округлую форму или

были частично разрушены. Это явление наблюдалось в последующих трех пассажах вируса. Далее на культуре куриных фибробластов было проведено выделение и титрование вируса [19].

Позднее, в 1971 г., Н.И. Смирновой была получена первичнотрипсинизированная ткань пчелиных фибробластов из грудных мышц взрослой пчелы.

Клеточный монослой пчелиных фибробластов различался от куриных фибробластов слоистой формой, и на этой культуре наблюдался рост и размножение 4 штаммов вируса мешотчатого расплода. Интересно то, что патологические эффекты наблюдались при заражении.

Цитопатическое действие штаммов было одинаковым, дегенерация клеток наблюдалась через 73—96 ч. Проявление цитопатического эффекта четырех вирусов регистрировали после 3 последовательных пассажей. Заражающая доза была одинакова для обеих клеточных культур. Исследования других авторов показывают, что первичнотрипсинизированная культура почек обезьян также оказалась чувствительна к штаммам вируса мешотчатого расплода, но характер цитопатических изменений наступал значительно позже, через 140—156 ч. В клетках появлялась зернистость цитоплазмы. Часть клеток отставала от стекла, а часть оставалась в виде неизменных клеточных островков. Адаптация вируса к культуре тканей также происходила после 3-го пассажа. Результаты титрования штаммов вируса показывают, что культуры первичнотрипсинизированных куриных фибробластов более чувствительны, чем культура клеток почки обезьяны [13].

А.К. Керимбаев также использовал клеточные культуры пчел. В своих исследованиях он показал возможность использования клеток первичнотрипсинизированных культур тканей куриных фибробластов, культуры тканей из репродуктивных органов, мышц и яиц пчелы. Цитопатогенное действие вируса на этих культурах тканей начиналось через 18—20 ч в виде округления клеток, разрушения монослоя. К 30 ч все клетки отставали от стекла, превратившись в клеточный детрит. При дальнейшем пассировании вируса (было проведено 3 пассажа) цитопатогенное действие вируса стало отмечаться через 16—18 ч.

Культивирование вируса мешотчатого расплода проводилось одновременно на клеточных культурах HeLa, HEp-2, СОЦ, СПЭВ, Детройт-6, ВНК, на амниотических и С-18 клеточных культурах с последующим пятикратным пассированием на них штаммов вируса мешотчатого расплода. Однако признаков ЦПД в культурах не наблюдалось. Это была первая попытка культивирования вируса в гетерологических перевиваемых клеточных культурах [8].

В дальнейшем Xiaosui Xia с соавт. продолжили тему культивирования вируса мешотчатого расплода в культуре тканей пчел. Они культивировали вирус Китайского мешотчатого расплода в первичной культуре клеток, полученной от личинок рабочих пчел. Лизис клеток начался через 48 ч после инокуляции вируса. При исследовании конфокальной электронной микроскопией было обнаружено, что почти 100% клеток были инфицированы вирусом, который накапливался в цитоплазме зараженной клетки в виде волокнистых или везикулярных включений [21]. Chang-Hee Kweon с соавт. продолжили направление по поиску культур

клеток, способных культивировать вирус мешотчатого расплода. В качестве модели они применяли клеточные линии ПК-15, IBRS-2, Vero и *Spodoptera frugiperla* (Sf9). В опытных культурах было проведено культивирование вируса мешотчатого расплода до 9 пассажа. ЦПД не наблюдалось, однако методом ПЦР в реальном времени было выявлено присутствие вируса в культурах ПК-15, Vero, IBRS-2. Авторы делали заключение, что культуры клеток ПК-15, Vero, IBRS-2 поддерживают размножение вируса мешотчатого расплода, что нельзя сказать о культуре клеток Sf-9 [15].

Таким образом, результаты культивирования штаммов вируса мешотчатого расплода на культурах тканей позвоночных показали, что чувствительными к этому возбудителю являются первичнотрипсинизированные культуры ФЭК и ПО. В перевиваемых линиях клеток HELA, HEP-2, СОЦ, СПЭВ, Детройт-6, ВНК вирус не размножался [8].

Благодаря исследованиям многих специалистов было выяснено, что вирус культивируется в культурах ткани медоносных пчел, куриных и мышинных фибробластах, почек обезьян. Однако также существует мнение исследователей, что вирус мешотчатого расплода размножается только в ткани медоносных пчел [4]. Несмотря на подобные разногласия, была выявлена единая картина размножения вируса в культивируемых клетках: цитоплазма инфицированных клеток становится зернистой, проявляются вакуоли, клетки округляются и отстают от стекла. При повторном пассировании вируса сокращается инкубационный период и через 24 ч наблюдается цитопатогенное действие [1].

Заключение. В последние годы идет активный спор по культивированию вирусов пчел на клеточных культурах [18]. Для изучения вирусов пчел это особенно важно, поскольку они необходимы для изучения цитопатогенного механизма действия вирусов. Основная проблема культивирования вирусов пчел — малое количество данных о чувствительных клеточных культурах гетерологического типа. Однако исследования в данной области продолжаются, и ученые во всех странах мира пытаются решить серьезную задачу культивирования вирусов пчел.

© А.Г. Калинин, Т.В. Гальнбек, Е.В. Куликов, 2017

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алексеенко Ф.М., Ревенок В.А., Чепурко М.А. Справочник по болезням и вредителям пчел. К.: Урожай, 1991.
2. Вольхина В.Е. Вирус деформации крыла у *Apis mellifera* L. Распространение, морфология, патогенность // *Сельскохозяйственная биология*. 2015. № 4. С. 409—419.
3. Граблюк В.В. Вирусные болезни пчел // *Хозяин*. 2015. № 6. С. 37.
4. Гробов О.Ф., Смирнов А.М., Попов Е.Т. Болезни и вредители медоносных пчел: Справочник. М.: Агропромиздат, 1987.
5. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре. М.: Спутник, 2009.
6. Зюман Б.В. Культивирование тканей медоносной пчелы и использование их для изучения возбудителей вирусных и протозойных заболеваний пчел: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1971.

7. Калашников А.Е., Удина И.Г. Распространение РНК-содержащих вирусов у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на территории России // *Farm animals*. 2012. № 1. С. 72—76.
8. Керимбаев А.К. Изучение некоторых биологических свойств вируса мешотчатого расплода у личинок медоносной пчелы и усовершенствование методов лабораторной диагностики заболевания: дис. ... канд. биол. наук. М., 1972.
9. Противовирусное средство — лозеваль / В.Н. Мельник, Ф.Д. Онищук., Н.В. Мельник, А.И. Муравская // *Пчеловодство*. 2007. № 6. С. 28—29.
10. Показатели производства меда в РФ в 2010—2012 // Федеральная служба государственной статистики URL: http://www.gks.ru/bgd/regl/B14_14p/IssWWW.exe/Stg/d02/14-20.htm (дата обращения: 16.12.16).
11. Угрозы распространения вирусных инфекций у пчел (*Apis mellifera* L.) и роль клеща *Vargo destructor* в развитии патологий / А.В. Спрыгин, Ю.Ю. Бабин, Е.М. Ханбекова, Л.Е. Рубцова // *Сельскохозяйственная биология*. 2016. № 2. С. 156—171.
12. Экспорт и импорт меда в РФ в 2011—2013 // Федеральная таможенная служба. Таможенная статистика внешней торговли URL: <http://stat.customs.ru/apex/f?p=201:1:3379638437440207::NO> (дата обращения: 16.12.16).
13. Allen M., Ball B.V. The incidence and world distribution of the honey bee viruses // *Bee World*. 1996. No. 77. P. 141—162.
14. Bailey L., Ball B.V., Perry J.N. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee // *Ann. Appl. Biol.* 1983. No. 103. P. 13—20.
15. Chang-Hee Kweon, Mi-Sun Yoo, 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 honeybee // *Virus Research*. 2015. No. 198. P. 15—21.
16. Corbet S.A., Williams I.H., Osborne J.L. Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European Community // *Bee World*. 1991. No. 72. P. 47—59.
17. Giauffret A., Poutiers P., Rousseau M., Vago C. Infection in vitro de cultures cellulaires d, *Apis mellifera* par differents virus de cat hymenopteres // *Bull. Apic.* 1968. No. 11(1). P. 13—18.
18. Hunter Wayne B. Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: Hymenoptera Apidae. In Vitro Cell // *Dev. Biol. Animal*. 2010. No. 46. P. 83—86.
19. Smirnova N.I. Cultivation of sacbrood virus in cell culture of bee fibroblasts // *The XXIII international apicultural congress. Summaries of papers*. 1971. P. 93—94.
20. Vago C. Culture de tissue intervertebrae // *Atti simposio intern. Rbl speriment Pavis. msi*. 1959. P. 9—11.
21. Xiaocui Xia, Qianzhou Mao, Haitao Wang, Bingfeng Zhou, Taiyun Wey. Replication of Chinese sacbrood virus in primary cell cultures of Asian honeybee (*Apis cerana*) // *Arch Virol*. 2014. No. 159. P. 3435—3438.

Сведения об авторах:

Калинин Андрей Геннадьевич — аспирант департамента ветеринарной медицины Аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов; e-mail: kalinin.andrew2010@yandex.ru

Гальнбек Татьяна Валерьевна — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией клеточной биотехнологии и питательных сред со специализированной коллекцией клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко»; e-mail: admin@viev.ru

Куликов Евгений Владимирович — кандидат биологических наук, доцент департамента ветеринарной медицины Аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов; e-mail: kulikov_ev@rudn.university

SELECTION OF THE CELL CULTURE TO ACCUMULATE IN VITRO THE SACBROOD VIRUS OF BEES

A.G. Kalinin^{1,2}, T.V. Galnbek², E.V. Kulikov¹

¹Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)
Miklukho-Maklay str., 8/9, Moscow, Russia, 117198

²FGBNU All-Russian Research Institute
of Experimental Veterinary Medicine. YR Kovalenko
Ryazan prosp., 24-1, Moscow, Russia, 109428

Abstract. Bees, like other living organisms are exposed to various pathogenic microorganisms, such as bacteria, fungi, protozoans, parasites and viruses. Viruses are of particular threat to beekeeping. Some diseases caused by viruses that lead to the collapse of the bee colonies, which leads to loss of a huge number of bees and it causes a recession in the industry. One of the major bees diseases caused by viruses is a sacculated brood. This pathology causes significant damage to beekeeping, because sick families without assistance does not give the commodity honey and not able to provide themselves food, then farms lose the opportunity to sell queens and bee packages. Problem of prompt diagnosis is inaccessibility of bees culturing cells method in vitro virus, which is why understanding of the biological mechanisms underlying viral diseases is limited. These difficulties in the virologists works leads to late diagnosis of disease and as a result, there are large losses in farms. Currently, there is very little information about the cultivation of viruses bees on heterogeneous cell cultures, which give after passage of the pathogen any degenerative changes. However, in last few years there is an active debate on the cultivation of bees viruses in cell cultures. It is known that the highest sensitivity to the saccular brood virus are explants of ovarian nymphs queens bees, chick fibroblast culture, bee fibroblasts tissue of the pectoral muscles of adult bees, culture of the tissue reproductive organs, muscle and egg bee primary trypsinized culture of monkey kidney, primary cell culture, obtained from the larvae of worker bees, culture PC-15, IBRS-2. The major problem of cultivation of bees viruses — a small amount of data on heterologous type of sensitive cell cultures. However, research in this area continues, and scientists around the world are trying to solve a serious problem of cultivation of bee viruses.

Key words: bees, sacbrood virus, cell culture, cultivation of beeviruses to the cell cultures

REFERENCES

1. Alekseenko, F.M., Revenok V.A., CHepurko M.A. Spravochnik po boleznyam i vreditelyam pchel. K.: Urozhaj, 1991.
2. Volyhina, V.E. Virus deformacii kryla u *Apis mellifera* L. Rasprostranenie, morfologiya, patogennost'. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*. 2015. No. 4. S. 409—419.
3. Grablyuk, V.V. Virusnye bolezni pchel. *Hozyain*. 2015. No. 6. S. 37.
4. Grobov, O.F., Smirnov A.M., Popov E.T. Bolezni i vrediteli medonosnyh pchel: Spravochnik. Moscow: Agropromizdat: 1987. 6 c.
5. D'yakonov, L.P. ZHivotnaya kletka v kul'ture. Moscow: Sputnik, 2009. 7 s.
6. Zyuman, B.V. Kul'tivirovanie tkanej medonosnoj pchely i ispol'zovanie ih dlya izucheniya vzbuditelej virusnyh i protozojnyh zabolevanij pchel: avtoreferat dis. kand. biol. nauk. Moscow, 1971.
7. Kalashnikov, A.E., Udina I.G. Rasprostranenie RNK-soderzhashchih virusov u medonosnoj pchely *Apis mellifera* L. na territorii Rossii. *Farm animals*. 2012. No. 1. S. 72—76.
8. Kerimbaev, A.K. Izuchenie nekotoryh biologicheskikh svojstv virusa meshotchatogo rasploda u lichinok medonosnoj pchely i usovershenstvovanie metodov laboratornoj diagnostiki zabolevaniya: dis. kand. biol. nauk. Moscow, 1972.

9. Mel'nik, V.N., Onishchuk, F.D., Mel'nik, N.V., Muravskaya A.I. Protivovirusnoe sredstvo — lozeval'. *Pchelovodstvo*. 2007. No. 6. S. 28—29.
10. Pokazateli proizvodstva meda v RF v 2010—2012. *Federal'naya sluzhba gosudarstvennoj statistiki* URL: http://www.gks.ru/bgd/regl/B14_14p/IssWWW.exe/Stg/d02/14-20.htm (data obrashcheniya: 16.12.16).
11. Sprygin, A.V., Babin YU.YU., Hanbekova E.M., Rubcova L.E. Ugrozy rasprostraneniya virusnyh infekcij u pchel (*Apis mellifera* L.) i rol' kleshcha *Varroa destructor* v razvitii patologij. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*. 2016. No. 2. S. 156—171.
12. EHksport i import meda v RF v 2011—2013. *Federal'naya tamozhennaya sluzhba. Tamozhennaya statistika vneshnej torgovli* URL: <http://stat.customs.ru/apex/f?p=201:1:3379638437440207::NO> (data obrashcheniya: 16.12.16).
13. Allen, M., Ball, B.V. The incidence and world distribution of the honey bee viruses. *Bee World*. 1996. No. 77. P. 141—162.
14. Bailey, L., Ball, B.V., Perry, J.N. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* 1983. No. 103. P. 13—20.
15. Chang-Hee Kweon, Mi-Sun Yoo, 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 honeybee. *Virus Research*. 2015. No. 198. P. 15—21.
16. Corbet, S.A., Williams, I.H., & Osborne, J.L. Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European Community. *Bee World*. 1991. No. 72. P. 47—59.
17. Giauffret, A., Poutiers, P., Rousseau, M., Vago, C. Infection in vitro de cultures cellulaires d, *Apis mellifera* par differents virus de cat hymenopters. *Bull. Apic.* 1968. No. 11(1). P. 13—18.
18. Hunter Wayne B. Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: Hymenoptera Apidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*. 2010. No. 46. P. 83—86.
19. Smirnova, N.I. Cultivation of sacbrood virus in cell culture of bee fibroblasts. *The XXIII international apicultural congress. Summaries of papers*. 1971. P. 93—94.
20. Vago, C. Culture de tissue intervertebrae. *Atti simposio intern. Rbl speriment Pavis. msi*. 1959. P. 9—11.
21. Xiaocui Xia, Qianzhou Mao, Haitao Wang, Bingfeng Zhou, Taiyun Wey. Replication of Chinese sacbrood virus in primary cell cultures of Asian honeybee (*Apis cerana*). *Arch Virol*. 2014. No. 159. P. 3435—3438.