

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.03.29

烟曲霉素在防治蜜蜂孢子虫病中的应用研究进展

陈秀贤, 蔺哲广, 胡福良, 宋伊雯, 郑火青*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要: 近年来, 全球性蜂群损失严重, 对蜜蜂授粉农业造成巨大冲击。东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*, *N. ceranae* 在成功实现由东方蜜蜂 *Apis cerana* Fabr. 向西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 的宿主转移后, 成为严重威胁西方蜜蜂健康的一种新的寄生虫病原, 并被认为是蜂群损失的一个重要原因。烟曲霉素是一种能够有效防治蜜蜂孢子虫病的药物, 但作为一种抗生素类药物, 其在蜂产品中的残留问题以及对蜂群和人类健康的影响也颇受关注。本文将围绕蜜蜂孢子虫病概况、烟曲霉素在治疗蜜蜂孢子虫病以及人类疾病中的应用及其潜在的问题等进行综述, 以期为我国养蜂生产中蜜蜂孢子虫病的防治以及烟曲霉素在相关领域中的应用提供参考。

关键词: 烟曲霉素; 蜜蜂孢子虫病; 东方蜜蜂微孢子虫; 抗生素

中图分类号: Q965.9; S895

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 03-0648-07

Research progress on the application of fumagillin to control *Nosema* diseases in honeybees

CHEN Xiu-Xian, LIN Zhe-Guang, HU Fu-Liang, SONG Yi-Wen, ZHENG Huo-Qing* (College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The serious losses of honeybee colonies are globally weakening bee-dependent pollination agriculture in recent years. After a successful host switch from Asian bees (*Apis cerana* Fabr.) to western bees (*Apis mellifera* L.), *Nosema ceranae* has become a new fatal parasite to western honeybees and is suspected as a major culprit for the colony losses. Fumagillin is an effective drug against *Nosema* diseases. As an antibiotic drug, however, the residual problem of fumagillin in bee products and its impact on the health of honeybees and human beings are highly considered. This review summaries a general introduction about *Nosema* diseases in bees, the use of fumagillin in treating diseases both in human and honeybees and its potential problems. The aim is to provide references for controlling honeybee microsporidian diseases as well as applying fumagillin in related fields in China.

Key words: Fumagillin; *Nosema* diseases; *Nosema ceranae*; antibiotic

养蜂业作为畜牧业的重要组成部分, 不仅为人类带来高营养价值的蜂产品, 蜜蜂高效的授粉特性在提高农作物产量、质量以及维护生态平衡等方面也发挥着重要的作用 (刘朋飞等, 2011; Meena *et al.*, 2015)。近年来, 世界养蜂业形势严峻, 尤其是欧美国家蜂群损失严重。以美国为例,

2006 至 2013 年期间越冬蜂群的死亡率平均在 30% 左右 (van Engelsdorp *et al.*, 2012; Spleen *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Steinhauer *et al.*, 2015), 给美国农业带来巨大的冲击。除气候和农药等因素外, 蜜蜂病原是制约全球养蜂业发展的重要因素 (Higes *et al.*, 2009)。蜜蜂微孢子虫作为其中

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究项目 (2014C32060)

作者简介: 陈秀贤, 女, 1990 年生, 福建漳州人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂科学, E-mail: shauyinchan@sina.com

* 通讯作者 Author of correspondence, E-mail: hqzheng@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-08-17; 接受日期 Accepted: 2015-11-17

主要的病原之一 (Paxton , 2010) , 对蜜蜂个体健康以及蜂群发展造成极大的威胁。尽管有研究报道了一些植物提取物对蜜蜂孢子虫病具有一定的防治效果 (Maistrello *et al.* , 2008; Costa *et al.* , 2010; Porrini *et al.* , 2011; Botías *et al.* , 2013) , 但在养蜂生产上, 烟曲霉素仍是防治蜜蜂孢子虫病的最佳选择。本文将从蜜蜂孢子虫病的概况以及烟曲霉素在治疗人类疾病以及蜜蜂孢子虫病的应用等方面进行综述。

1 蜜蜂孢子虫病概况

微孢子虫 (又称微粒子) , 是一类专营细胞内寄生的真菌性寄生虫, 主要有兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi*、家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis*、蝗虫微孢子虫 *Nosema locustae* 以及蜜蜂微孢子虫 *Nosema spp.* 等。蜜蜂微孢子虫主要包括 (西方) 蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis* 和东方蜜蜂微孢子虫 (王强等, 2009) 。其中, *N. apis* 于1909年在西方蜜蜂体内发现 (Zander , 1909) , *N. ceranae* 由 Fries 等于 1996 年在北京地区的中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 体内发现。蜜蜂微孢子虫主要在蜜蜂中肠上皮细胞寄生、增殖, 破坏蜜蜂肠道组织完整性, 吸取蜜蜂体内营养和能量 (Mayack *et al.* , 2009; Martín-Hernández *et al.* , 2011) , 抑制免疫反应 (Antúnez *et al.* , 2009; Chaimanee *et al.* , 2010; Antúnez *et al.* , 2013) , 削弱蜜蜂体质, 从而为其它病原提供入侵的机会, 最终导致蜜蜂个体寿命缩短, 甚至降低蜂王的生殖能力, 进而影响蜂群群势以及采集力 (Alaux *et al.* , 2011) 。

在相当长一段时间内, 人们认为 *N. apis* 只感染西方蜜蜂, 而 *N. ceranae* 只感染东方蜜蜂。直至 2006 和 2007 年, 来自西班牙和中国台湾的两个研究团队分别报道在西方蜜蜂体内发现了 *N. ceranae* (Higes *et al.* , 2006; Huang *et al.* , 2007) 。这一颠覆性的报道意味着 *N. ceranae* 已经发生寄主转移, 西方蜜蜂面临一种新病原的威胁。2006 年正值美国发现蜂群崩溃综合症 (Colony Collapse Disorder, CCD) 现象, 这一时间节点的不合不免使人们将 *N. ceranae* 作为 CCD 病因的首要怀疑对象。此后许多不同国家的研究同样指出大量的蜂群损失与蜜蜂孢子虫病关系密切 (Higes *et al.* , 2008 , 2009) 。尽管如此, 目前关于 *N. ceranae* 和 *N. apis* 致病性差异的研究结果并不一致。Huang 等

(2015) 和 Natsopoulou (2015) 等人研究发现, 在单一感染的情况下, 与 *N. apis* 相比, *N. ceranae* 对西方蜜蜂表现出较高但不显著的感染力和毒力。而先前的研究报道, *N. ceranae* 的致病性明显比 *N. apis* 高 (Paxton *et al.* 2007; Higes *et al.* 2007; Williams *et al.* 2014) 。其中, 造成 *N. ceranae* 和 *N. apis* 致病性差异的原因之一可能是蜜蜂微孢子虫的株系存在多样性, 另一方面也可能是西方蜜蜂的不同亚种对两种蜜蜂微孢子虫具有不同的抗性能力。

近年来, 浙江、江苏、安徽等地区都有蜂农反映在有效防治狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 的情况下蜂群损失依然严重, 尤其是有些蜂场蜂群越冬损失率达到 50% 以上, 有些甚至全场覆没。本研究团队自 2013 年底开始对浙江省金华、平湖、杭州等地的定地蜂场进行蜜蜂孢子虫病的感染情况调查, 发现蜂群感染 *N. ceranae* 的比例很高, 部分蜂群呈现严重感染 (郑火青等, 2014) 。

2 烟曲霉素的应用

2.1 烟曲霉素药效的发现

烟曲霉素 (Fumagillin) , 又称夫马吉林, 是由烟曲霉菌 *Aspergillus fumigatus* 代谢产生的抗生素, 最早在 1949 年由 Henson 和 Elbel 分离得到。1951 年 McCowen 等人证实烟曲霉素能够抗阿米巴虫病。1970 年以前, 烟曲霉素受到的关注度较低, 仅在人类兔脑炎微孢子虫病以及由葡萄球菌感染引起的疾病上使用。直到 1990 年, 美国科学家 Judah Folkman 的研究团队在一次实验中意外发现, 烟曲霉素能抑制血管生成和肿瘤的生长 (Ingber *et al.* , 1990) , 其才开始受到广泛关注。烟曲霉素对蜜蜂孢子虫病的防治效果最早在 1952 年于《Science》杂志刊文报道, 试验发现烟曲霉素对西方蜜蜂孢子虫病有预防作用 (Katznelson and Jamieson , 1952) 。基于此结果, 著名蜜蜂病理学家 Bailey (1953) 进一步研究证实烟曲霉素对 *N. apis* 的增殖确有抑制作用, 并将该成果发表于《Nature》杂志。此后关于烟曲霉素防治蜜蜂孢子虫病效果的研究层出不穷。

2.2 烟曲霉素防治蜜蜂孢子虫病的效果

鉴于烟曲霉素对人体健康可能产生的影响, 烟曲霉素仅在美国、加拿大以及阿根廷等少数国家被注册允许在蜂群中使用。当前北美等地区使

用的烟曲霉素主要由加拿大 Medivet 公司生产, 呈粉末状, 微溶于水, 有效物质为 21 mg/g。早期的烟曲霉素主要包括 Fumidil B 以及 Fumagillin B, 二者对蜜蜂孢子虫的抑制效果相似 (Randy, 2008)。但由于 Fumagillin B 更易溶于糖浆, 现在养蜂生产上主要使用 Fumagillin B, 推荐的用药剂量为 25 – 26 mg/L。根据 Medivet 公司产品的使用说明, 9.5 g 的烟曲霉素粉末溶解于 380 L 的糖浆后, 在春季可饲喂 (100 – 110) 群蜜蜂 (86 – 95 mg/群)、秋季可饲喂 50 群越冬蜂 (190.5 mg/群), 流蜜期以及流蜜期前不宜使用该药物。为达到较好的防治效果, 患病蜂群至少需要连续 4 周的用药治疗 (Randy, 2008)。

早期在防治由 *N. apis* 引起的蜜蜂孢子虫病中, 烟曲霉素在 10 – 50 mg/群的使用浓度范围内均表现出有效的治疗效果。该剂量范围的烟曲霉素不仅不会对蜂群带来负面影响, 且可增强越冬蜂的群势、并提高蜂蜜产量 (Woyke, 1984; Webster, 1994)。当烟曲霉素的浓度过低时, 其对 *N. apis* 的感染仅起到短暂的抑制作用 (Mlađan *et al.*, 2000); 当浓度过高时, 则易导致蜜蜂的死亡 (Rada *et al.*, 1997)。

此外, 熊蜂 *Bombus* spp. 体内存在与蜜蜂类似的熊蜂微孢子虫 *Nosema bombi*, 且就亲缘关系而言, *N. ceranae* 与 *N. bombi* 的关系较与 *N. apis* 更为接近 (Shafer *et al.*, 2000)。但有意思的是, 在 26 mg/L 和 52 mg/L 浓度下, 烟曲霉素对 *N. bombi* 并未表现出抑制作用 (Whittington and Winston, 2000)。因此, 在烟曲霉素应用初期, 人们对其抑制 *N. ceranae* 增殖的效果存在担忧。在西班牙, Higes 等 (2008) 以 120 mg/群的剂量对感染 *N. ceranae* 的蜂群进行为期 4 周的治疗, 发现烟曲霉素不仅能够长达 1 年的时间内有效控制 *N. ceranae* 的感染水平, 同时能明显改善患病蜂群群势。值得注意的是, 在 2011 年, Higes 等再次对烟曲霉素的作用效果进行研究, 发现同样以浓度为 120 mg/群的烟曲霉素饲喂患病蜂群, 4 个月后蜂群又恢复感染。此外, 在加拿大东部地区, 烟曲霉素在 190 mg/群的剂量下对 *N. ceranae* 的感染仅表现出短暂性的抑制效果 (Williams *et al.*, 2008, 2010)。以上研究表明, 烟曲霉素对不同地区 *N. ceranae* 感染的防治效果存在差异, 同时面临 *N. ceranae* 对其产生抗药性的可能。

2.3 烟曲霉素抑制蜜蜂微孢子虫增殖的机制

烟曲霉素及其衍生物 TNP-470 在抗肿瘤和血管生成以及抑制兔脑炎微孢子虫病等人类疾病上发挥着重要的作用, 它们在细胞内作用的分子靶点是蛋氨酸氨肽酶 2 (MetAP2) (Zhang *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2009; Daniel *et al.*, 2012)。MetAP2 是一种修饰酶, 在细胞的生长分裂、信号转导以及蛋白质的成熟等过程中发挥着重要作用。烟曲霉素及 TNP-470 通过不可逆地与细胞内的 MetAP2 结合, 抑制 MetAP2 的活性, 阻碍其正常功能。

目前关于烟曲霉素在抑制蜜蜂微孢子虫增殖的作用机制研究较少。早期研究认为, 烟曲霉素通过干扰蜜蜂微孢子 DNA 的复制 (Katznelson and Jamieson, 1952; Bailey, 1953; Hartwig and Przełęczka, 1971), 从而抑制蜜蜂微孢子虫的增殖。Huang 等研究不同浓度的烟曲霉素对 *N. ceranae* 增殖的抑制效果, 发现烟曲霉素处理后的 *N. ceranae* 细胞内 MetAP2 蛋白表达量明显下降 (Huang *et al.*, 2013)。但值得注意的是, 尽管 *N. bombi* 细胞内 MetAP2 结合位点的氨基酸序列与 *N. ceranae* 细胞内 MetAP2 的相似 (Huang *et al.*, 2013), 但烟曲霉素对 *N. bombi* 的增殖并无抑制作用 (Whittington and Winston, 2000), 这说明除了与蜜蜂微孢子虫细胞内的 MetAP2 结合外, 烟曲霉素还可能通过其他途径抑制 *N. ceranae* 的增殖。

2.4 烟曲霉素对蜜蜂健康的影响

烟曲霉素抑制蜜蜂微孢子虫的增殖, 有益于蜜蜂健康。但有研究表明, 烟曲霉素对蜜蜂健康还存在一定的负面效应。正常情况下, 健康工蜂的咽下腺细胞内分泌颗粒多、致密度高, 咽侧体中的线粒体大且多、细胞器膜完整、电子浓缩基质少。而在治疗由 *N. apis* 引起的蜜蜂孢子虫病的试验中发现, 使用烟曲霉素后, 患病工蜂咽下腺分泌的颗粒变大、电子致密度降低 (Liu, 1990a), 而咽侧体中的线粒体变小、致密度偏低、电子浓缩基质致密度极高 (Liu, 1990a, 1990b)。此外, 也有研究发现烟曲霉素不仅提高蜜蜂的死亡率, 还会改变蜜蜂肠道正常的菌落环境, 使患病蜜蜂肠道中的厌氧菌的数目明显比健康个体的低, 其需氧菌的数量反而比正常蜜蜂多 (Gilliam *et al.*, 1986; Mlađan *et al.*, 2000)。这一结果正与 Gilliam 等 (1991) 研究农药和营养不良等外界压力对蜜蜂肠道菌群结构影响的结果一致。Huang 等

(2013) 研究发现, 低浓度的烟曲霉素不仅失去抑制微孢子虫增殖的能力, 同时改变蜜蜂中肠中与结构、能量代谢等相关的蛋白含量, 尤其是 MetAP2, 这进一步验证了早期关于烟曲霉素对蜜蜂健康存在负面影响的报道。

3 烟曲霉素与人类健康

烟曲霉素在人类疾病的治疗上有较为广泛的应用。如在人类肠道阿米巴原虫病的治疗方面的应用已经有 60 多年的历史, 并在治疗肠道微孢子虫病以及艾滋病患者感染的新型腹泻原虫等疾病上也都表现出显著的效果 (Conteas *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2000, 2002)。自 2002 年以来, 欧洲药物管理局将烟曲霉素规定为治疗由孢子虫感染人类肠道而引起的腹泻疾病的罕见病药物 (EMA, 2000, 2003)。此外, 烟曲霉素能通过阻碍血管生成而实现抑制肿瘤发育, 已被应用于肿瘤疾病的治疗。

尽管如此, 烟曲霉素对人类健康也存在着一定的威胁, 这可能是因为商品化生产的烟曲霉素中含有二环己胺 (DCH) 盐类物质 (van den Heever *et al.*, 2014)。DCH 主要用于有机物的合成, 也用作杀虫剂和钢铁防锈剂, 具有高毒性、致癌性以及致突变性。有研究表明烟曲霉素中所含的 DCH 毒性至少是烟曲霉素自身的 5 倍 (van den Heever *et al.*, 2014), 但在烟曲霉素中添加 DCH 是否是因为其合成或生产的需要, 迄今为止没有相关报道。

有关烟曲霉素对人体危害的体内实验较少, 有研究称其在治疗人类疾病时会引起血小球以及血小板数量的减少 (Stanimirovic *et al.*, 2006a, 2008)。大量的体外实验表明, 烟曲霉素可能具有遗传毒性。通过小鼠实验发现, 25 $\mu\text{g/g}$ 、50 $\mu\text{g/g}$ 、75 $\mu\text{g/g}$ 3 个剂量的烟曲霉素均能显著降低小鼠细胞的有丝分裂活动 (Stevanovic *et al.*, 2008)。在 0.34–9.2 $\mu\text{g/mL}$ 剂量下, 烟曲霉素可引起染色体的致畸性, 提高姐妹染色单体的交换率, 而姐妹染色单体的交换会破坏 DNA 的复制过程 (Stevanovic *et al.*, 2006b, 2008)。值得注意的是, 大多数研究所用的烟曲霉素均含有 DCH, DCH 的存在将提高烟曲霉素的毒性。但这并不意味着在探讨烟曲霉素的危害时, 烟曲霉素本身对人体的毒性可以被忽略。相反地, 烟曲霉素能不

可逆地与机体细胞内的 MetAP2 结合, 这意味着其在治疗人类疾病中对人类健康可能会产生不良的影响。

4 烟曲霉素在蜂蜜中的残留及其稳定性

近年来, 考虑到抗生素残留对人类健康存在潜在的威胁, 欧盟地区基本上不在患病蜂群中使用烟曲霉素, 而烟曲霉素在蜂蜜中的残留量及其稳定性受到较多的关注。

由于用药方法和实验条件的差异, 不同研究对烟曲霉素在蜂蜜中残留量的报道有所差异。有报道称, 在流蜜期间, 不定期地使用烟曲霉素, 其在蜂蜜中的残留量在 8.5–12.3 mg/kg (Mladjan *et al.*, 2000)。而 Higes 等 (2011) 在实验室以及自然条件下分别研究烟曲霉素对 *N. ceranae* 增殖的抑制效果及其在蜂蜜中的残留量, 通过将烟曲霉素以与糖浆或者糖饼混合的不同给药方式饲喂染病蜂群, 检测烟曲霉素在蜂蜜中的残留量, 结果发现在 180 mg/群 的剂量下, 烟曲霉素在蜂蜜中的残留量范围在 0.066 mg/kg 至低于检出限 (0.001 mg/kg) 之间。

此外, 在不同的储存条件下, 烟曲霉素表现出不同的稳定性。其中, 紫外灯下的烟曲霉素稳定性最差, 仅在 24 h 内就能降解 80%, 而在密闭的条件下保存 70 d 后, 其降解率仅为 30%。当温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 时, 烟曲霉素迅速降解, 20 d 后几乎检测不到有效物质; 在 22 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 下烟曲霉素降解速度相当, 70 d 后的降解率为 65% (Higes *et al.*, 2011); 当与蜂蜜糖饼、糖浆或者花粉混合, 其在蜂蜜糖饼中表现出较高的稳定性, 而在 50% 糖浆中的稳定性最差。van den Heever 等最新研究发现, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下烟曲霉素与糖饼混合后的降解速度比与糖浆溶液混合的降解速度慢, 且糖饲料浓度越高, 降解速率越低 (van den Heever *et al.*, 2011)。这也是加拿大 Medivet 公司负责人 Willy 推荐将烟曲霉素与蜂蜜糖饼混合使用防治蜜蜂孢子虫病的原因, 即烟曲霉素在蜂蜜中的稳定性保证其对蜜蜂微孢子虫增殖的抑制效果。

目前关于烟曲霉素在蜂产品中的残留量以及稳定性的研究仅局限于蜂蜜, 研究烟曲霉素在其他蜂产品如蜂蜡、蜂王浆等中的残留情况十分必要。值得注意的是, 尽管商品化的烟曲霉素中含

有 DCH,但在药物残留研究时,往往仅着眼于烟曲霉素本身,DCH 的残留量常被忽略,而 DCH 在蜂蜜中的稳定性比烟曲霉素自身更高 (van den Heever *et al.*,2014)。因而在检测烟曲霉素药物残留时,DCH 也应作为一个重要的指标。

5 展望

蜜蜂健康直接关系农业的发展和生态的平衡。蜜蜂孢子虫病对养蜂业造成的影响已经不容忽视。仅从防治效果来看,烟曲霉素仍是最佳药物选择。但鉴于烟曲霉素及其衍生物中 DCH 在蜂产品中的残留以及这些残留对人类健康产生的可能危害,烟曲霉素在养蜂生产中的应用存在争议。

近年来,国内养蜂生产上蜜蜂孢子虫病严重。鉴于烟曲霉素的效果及在部分国家应用的经验,同时缺少替代药物,在我国应用烟曲霉素防治蜜蜂孢子虫病值得考虑。但在推广应用之前,仍需研究明确烟曲霉素对我国蜜蜂孢子虫病的防治效果及在我国的养蜂管理条件下的药物残留规律,同时结合防治效果和残留规律提出相应的用药方法。此外,国外生产的烟曲霉素商品价格较贵,如何实现国产化降低药物成本是另一个值得考虑的问题。

从养蜂业长远的需求来看,寻求安全、高效、低成本的防治蜜蜂孢子虫病的方法或替代药物仍是当务之急。

参考文献 (References)

- Alaux C, Folschweiller M, McDonnell C, *et al.* Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 106 (3): 380–385.
- Alvarado JJ, Nemkal A, Sauder JM, *et al.* Structure of a microsporidian methionine aminopeptidase type 2 complexed with fumagillin and TNP470 [J]. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2009, 168 (2): 158–167.
- Antúnez K, Martín – Hernández R, Prieto L, *et al.* Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia) [J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11 (9): 2284–2290.
- Antúnez K, Mendoza Y, Santos, *et al.* Differential expression of vitellogenin in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2013, 52 (5): 227–234.
- Bailey L. Effect of fumagillin upon *Nosema apis* (Zander) [J]. *Nature*, 1953, 171 (4344): 212–213.
- Botías C, Martín – Hernández R, Meana A, *et al.* Screening alternative therapies to control nosemosis type C in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies [J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95 (3): 1041–1045.
- Contreas CN, Berlin OG, Ash LR, *et al.* Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis [J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000, 63 (3): 121–127.
- Costa C, Lodesani M, Maistrello L, *et al.* Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions [J]. *Apidologie*, 2010, 41 (2): 141–150.
- Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, *et al.* Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58 (8): 1090–1095.
- Daniel JK, Eileen R, Rehan K, *et al.* Early treatment with fumagillin, an inhibitor of methionine aminopeptidase – 2, prevents pulmonary hypertension in monocrotaline – injured Rats [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (4): e35388.
- EMA, 2000. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Information Technology [R]. EMA/CVMP/411/00 – FINAL, Committee for Veterinary Medicinal Products. Update of the Position Paper on Availability of Veterinary Medicines, agreed on 21 June 2000.
- EMA, 2003. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Pre – authorisation Evaluation of Medicines for Human Use [R] London, 22 January 2003. EMA/COMP/82/02 Rev. 1. Committee for Orphan Medicinal Products. Public summary of positive opinion for orphan designation of fumagillin for the treatment of diarrhoea associated with intestinal microsporidial infection.
- Fries I, Feng F, da Silva A, *et al.* *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae) [J]. *European Journal of Protistology*, 1996, 32 (3): 356–365.
- Gilliam M. Infectivity and survival of the chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*, in colonies of honey bees, *Apis mellifera* [J]. *Apidologie*, 1986, 17: 93–100.
- Gilliam M, Taber S. Diseases, pests, and normal microflora of honeybees (*Apis mellifera*) from feral colonies [J]. *Journal of Invertebrate*, 1991, 58: 95–114.
- Hartwig A, Przełęczka A. Nucleic acids in intestine of *Apis mellifica* infected with *Nosema apis* and treated with fumagillin DCH: Cytochemical and autoradiographic studies [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1971, 18 (3): 331–336.
- Higes M, Martín R, Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2006, 92 (2): 93–95.
- Higes M, García – Palencia P, Martín – Hernández R, *et al.* Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*,

- 2007, 94 (3): 211–217.
- Higes M, Martín – Hernández R, Botías, *et al.* How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (10): 2659–2669.
- Higes M, Martín – Hernández R, Garrido – Bailón E. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009a, 1 (2): 110–113.
- Huang SK. Physiology Science of Honeybees [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010, 179. [黄少康. 蜜蜂生理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010, 179]
- Huang WF, Jiang JH, Chen YW, *et al.* A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Apidologie*, 2007, 38 (1): 30–37.
- Huang WF, Solter LF, Yau PM, *et al.* *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees [J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9 (3): e1003185.
- Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, *et al.* Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth [J]. *Nature*, 1990, 348 (6301): 555–557.
- Huang WF, Solter L, Aronstein K, *et al.* Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 124: 107–113.
- Katznelson H, Jamieson C. Control of *Nosema* disease of honeybees with fumagillin [J]. *Science*, 1952, 115 (2977): 70–71.
- Lee KV, Steinhauer N, Rennich K, *et al.* A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA [J]. *Apidologie*, 2015, 46 (3): 292–305.
- Liu PF, Wu J, Li HY, *et al.* Economic values of bee pollination to China's agriculture [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44 (24): 5117–5123. [刘朋飞, 吴杰, 李海燕, 等. 中国农业蜜蜂授粉的经济价值评估 [J]. 中国农业科学, 2011, 44 (24): 5117–5123]
- Liu TP. Ultrastructure of mitochondria in the corpora allata of honeybees infected by *Nosema apis* before and after treatment with anti-*Nosema* drugs [J]. *Tissue and Cell*, 1990a, 22 (4): 511–515.
- Liu TP. Ultrastructural changes in the secretion granules of the hypopharyngeal glands of the honeybee infected by *Nosema apis* and after treatment with fumagillin [J]. *Tissue and Cell*, 1990b, 22 (4): 523–531.
- Maistrello L, Lodesani M, Costa C, *et al.* Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*) [J]. *Apidologie*, 2008, 39 (4): 436–445.
- Martín – Hernández R, Botías C, Barrios L, *et al.* Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*) [J]. *Parasitology Research*, 2011, 109 (3): 605–612.
- Mayack C, Naug D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 100 (3): 185–188.
- McCowen MC, Callender ME, Lawlis JF. Fumagillin (H-3), a new antibiotic with amebicidal properties [J]. *Science*, 1951, 113 (2930): 202–203.
- Meena NK, Singh B, Kant K, *et al.* Role of insect pollinators in pollination of seed spices – A review [J]. *International Journal of Seed Spices*, 2015, 59 (1): 1–17.
- Mlađan V, Todorovic D, Lolin M. Therapeutic effects of fumagillin and first appearance of *Nosema apis* spores following infection [J]. *Acta Veterinaria Beograd*, 2000, 50 (4): 253–262.
- Mladjan V, Jovic M. Antibiotics in beekeeping. In: Proceedings of the 2nd Symposium in Animal Clinical Pathology and Therapy Clinica Veterinaria [C]. Budva, 2000.
- Molina JM, Goguel J, Sarfati C, *et al.* Trial of oral fumagillin for the treatment of intestinal microsporidiosis in patients with HIV infection [J]. *Aids*, 2000, 14 (10): 1341–1348.
- Molina JM, Tourneur M, Sarfati C, *et al.* Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis [J]. *New England Journal of Medicine*, 2002, 346 (25): 1963–1966.
- Natsopoulou ME, Doublet V, Paxton RJ. European isolates of the Microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* have similar virulence in laboratory tests on European worker honey bees [J]. *Apidologie*, 2015: 1–9.
- Paxton RJ. Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)? [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2010, 49 (1): 80–84.
- Paxton RJ, Klee J, Korpela S, *et al.* *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis* [J]. *Apidologie*, 2007, 38 (6): 558–565.
- Porrini MP, Fernández NJ, Garrido PM, *et al.* In vivo evaluation of antiparasitic activity of plant extracts on *Nosema ceranae* (Microsporidia) [J]. *Apidologie*, 2011, 42 (6): 700–707.
- Rada V, Machova M, Huk J, *et al.* Microflora in the honeybee digestive tract: Counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs [J]. *Apidologie*, 1997, 28 (6): 357–365.
- Randy O. The "Nosema Twins" – Part 4 Treatment. ABF/AHPA & American Bee Research Conference [C]. 2008, <http://scientificbeekeeping.com/the-Nosema-twins-part-4-treatment>.
- Shafer, Aaron BA, Williams GR, *et al.* Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) and bees (*Hymenoptera: Apidae*) suggests both cospeciation and a host-switch [J]. *Journal of Parasitology*, 2009, 95 (1): 198–203.
- Stanimirovic Z, Stevanovic J, Bajic V, *et al.* Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests *in vivo* [J]. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2006a, 628 (1): 1–10.
- Stanimirović Z, Stevanović J, Kulić M, *et al.* Frequency of chromosomal aberrations in the evaluation of genotoxic potential of dicyclohexylamine (fumagillin) *in vivo* [J]. *Acta Veterinaria*, 2006b, 56 (4): 353–366.
- Stevanovic J, Stanimirovic Z, Radakovic M, *et al.* In vitro evaluation of the clastogenicity of fumagillin [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2008, 49 (8): 594–601.
- Steinhauer NA, Rennich K, Wilson ME, *et al.* A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA:

- Results from the bee informed partnership [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2015, 53 (1): 1–18.
- Spleen AM, Lengerich EJ, Rennich K, et al. A national survey of managed honey bee 2011–12 winter colony losses in the United States: Results from the Bee Informed Partnership [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2013, 52 (2): 44–53.
- van Engelsdorp D, Caron D, Hayes J, et al. A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: Results from the bee informed partnership [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2012, 51 (1): 115–124.
- van den Heever JP, Thompson JP, Curtis TS, et al. Fumagillin: An overview of recent scientific advances and their significance for apiculture [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62 (13): 2728–2737.
- van den Heever JP, Thompson TS, Curtis JM, et al. Stability of dicyclohexylamine and fumagillin in honey [J]. *Food. Chem.*, 2015, 179: 152–158.
- Wang Q, Zhou T, Dai PL. Research progress on honeybee microsporidia [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2009, 27 (2): 171–174. [王强, 周婷, 代平礼. 蜜蜂微孢子虫研究进展 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2009, 27 (2): 171–174]
- Webster TC. Fumagillin affects *Nosema apis* and honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1994, 87 (3): 601–604.
- Whittington R, Winston ML. Effects of *Nosema bombi* and its treatment fumagillin on bumble bee (*Bombus occidentalis*) colonies [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2003, 84 (1): 54–58.
- Williams GR, Sampson MA, Shutler D, et al. Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 99 (3): 342–344.
- Williams GR, Shutler D, Little CM, et al. The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagilin-B, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength [J]. *Apidologie*, 2010.
- Williams GR, Shutler D, Burgher-MacLellan K L, et al. Infrapopulation and community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts [J]. *PLoS ONE*, 2014: e99465.
- Woyke. Increase in life-span, unit honey productivity and honey surplus with fumagillin treatment of honeybees [J]. *Journal of Apicultural Research*, 1984, 23 (4): 209–212.
- Zander E. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene, Münchener Bienenzeitung [J]. *The Text*, 1909, 31: 196–204.
- Zhang H, Huang H, Ann C, et al. Investigations into microsporidian methionine aminopeptidase type 2: A therapeutic target for microsporidiosis [J]. *Folia Parasitologica*, 2005, 52 (1–2): 182–192.
- Zheng HQ, Chen XX, Zhou T, et al. A silent and huge change and treatments of *Nosemosis* [J]. *Apiculture of China*, 2014, 65: 24–26. [郑火青, 陈秀贤, 周婷, 等. 一场悄无声息的巨变—蜜蜂孢子虫病的变迁与防治 [J]. *中国蜂业*, 2014, 65: 24–26]