



Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol
252 66 Libčice nad Vltavou

Tel: 220 940 480

Fax: 220 941 252

e-mail: beedol@beedol.cz

Závěrečná zpráva **za rok 2011**

o plnění úkolů

vyplývajících ze Smlouvy o dílo č. 227 – 2011 - 16232

uzavřené mezi MZe a VUVč Dol

**Rozšíření, patogeneze a návrh opatření v chovech včel
ohrožených mikrosporidií *Nosema ceranae***

Dol, listopad 2011

Objednatel Česká republika – Ministerstvo zemědělství
Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství - 16230
Sídlo: Těšnov 17, 117 05 Praha 1
IČ: 00020478
Zastoupený Ing. Jiří Pondělíček, Ph.D.
Pověřená pracovnice Ing. Magdalena Pospíšilová
Telefon 221 812 711
E-mail: Magdalena.Pospisilova@mze.cz

Zhotovitel Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.
Sídlo Máslovice – Dol 94; 252 66 Libčice nad Vltavou
IČ: 62968335
Zastoupený Dr.Ing. František Kamler
Pověřený pracovník Ing. Dalibor Titěra, CSc.
Telefon 220 940 480
E-mail: beedol@beedol.cz

Anotace

Nosema ceranae je mikrosporidie napadající včelu medonosnou. V Evropě je známá teprve od roku 2005 a ukazuje se, že v některých zemích je významným faktorem vedoucím ke kolapsu včelstev. V České republice je až doposud otázka výskytu a významnosti tohoto parazita prakticky neznámá. Dlouhodobě se u nás v rámci prevence sleduje a kontroluje výskyt nose mózy u chovatelů s komerční produkcí matek, a proto bylo sledování *N. ceranae* zaměřeno na tyto chovy. Bylo vyšetřeno 4010 včelstev ze 113 lokalit. Prevalence *Nosema* spp. dosahuje 54 % (2167 včelstev), z toho je samostatná infekce *N. ceranae* v 52,3 % případů (1134 včelstev) a smíšená infekce v 16,4 % případů (356 včelstev). Doposud jsme neshledali *N. ceranae* primárním patogenem, který vede ke kolapsu včelstev v ČR. Z předběžných výsledků však vyplývá, že výskyt *N. ceranae* v ČR narůstá a nadále je třeba věnovat pozornost výskytu *N. ceranae* a její rozlišení od *N. apis* ve všech včelstvech.

Závěrečná zpráva
o plnění díla za rok 2011
Rozšíření, patogeneze a návrh opatření v chovech včel ohrožených mikrosporidii
Nosema ceranae

Obsah	strana
1. Úvod do problematiky nose mózy včel	4
1.1 <i>Nosema apis</i> versus <i>Nosema ceranae</i>	4
2. Metodika	6
3. Výsledky	9
3.1 Prevalence a rozšíření <i>Nosema ceranae</i>	9
3.2 Patogenita <i>Nosema ceranae</i>	11
3.3 Inhibice a desinfekce proliferace <i>Nosema ceranae</i>	12
4. Diskuse a závěr	13
5. Předání výsledků do praxe	14
6. Návrh dalšího monitoringu <i>Nosema</i> spp. v ČR	15
7. Přílohy	16
7.1 Základní prezentace o nose móze včel	16
7.2 Manuskript původní vědecké práce	20

V Dole, 14.11.2011

Dr. Ing. František Kamler
ředitel VÚVč Dol

Ing. Dalibor Titěra CSc
vedoucí oddělení výzkumu

MVDr. Martin Kamler
parazitologická laboratoř

1. Úvod do problematiky noseμόzy včel

Nosemóza včel byla rozpoznána již před více než 100 lety jako vážné onemocnění, které včelstva oslabuje a za určitých okolností vede k jejich kolapsu. V roce 1909 byl popsán původce noseμόzy včel, kterým je jednobuněčný zástupce mikrosporidie *Nosema apis*. Díky vědeckým postupům se pak podařilo zjistit detailní patogenezi a prevenci v chovech včel vůči této nosemóze. Po introdukci roztoče *Varroa destructor* do Evropy ustoupilo sledování noseμόzy včel do pozadí. Počátek 3. tisíciletí je ve včelařském odvětví spojen s vážnými problémy. Celosvětově se vyskytují masivní úhyny včelstev a v případě noseμόzy včel se objevuje zásadní milník – ve Španělsku a na Taiwanu je prokázán nový druh *Nosema ceranae* u včely medonosné *Apis mellifera*. Stejně jako v případě rozšíření roztoče *Varroa destructor* se objevuje stejný scénář – mikrosporidie *Nosema ceranae* je původně popsána u včely východní *Apis cerana*, avšak díky rozšíření včelařství s člověkem do všech koutů světa *Nosema ceranae* „přeskakuje“ na nového hostitele – včelu medonosnou.

V České republice se nosemóze včel věnuje laboratoř VUVč dlouhodoběji a doposud jako jediná v ČR je schopna provádět jednoduchou diferenciální diagnostiku *N. apis* a *N. ceranae* bez použití nákladných molekulárních metod. Metodika se zde opírá o studii, která je v oponentském řízení ve vědeckém časopise Research in Veterinary Science (Kamler M, Tyl J, Ryba S, Titera D, 2011. *A scientific note on the microscopical discrimination of Nosema apis and Nosema ceranae spores: a rapid screening method for nosemosis type C*). Manuskript tohoto článku je součástí této zprávy v příloze.

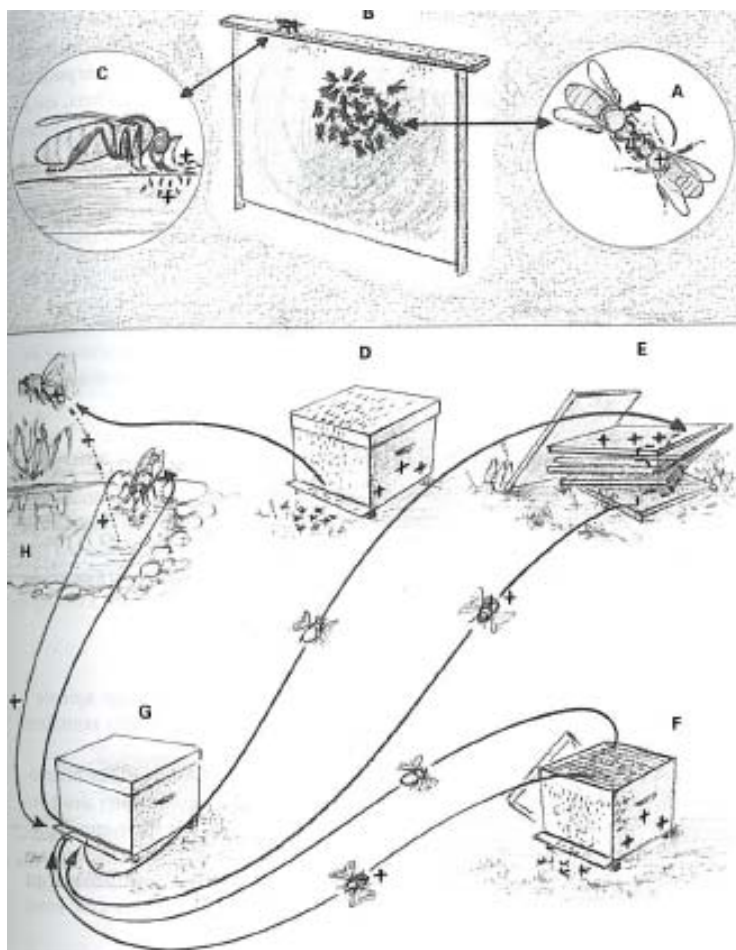
1.1 *Nosema apis* versus *Nosema ceranae*

Nosemózu včel způsobují zástupci dvou druhů mikrosporidií. *N. ceranae* má zcela rozdílnou epidemiologii, vyskytuje se ve včelstvech stabilně po celý rok. Naproti tomu má *N. apis* sezónní charakter s typickým vrcholem výskytu i dopadu na včelstva v zimním období. *N. ceranae* má zpravidla bezsymptomatický průběh, kdežto *N. apis* ve své typické podobě způsobuje úplavici a její přítomnost se viditelně projevuje pokálenými rámkami, plásty, česnem i vnějšími stěnami úlu.

V Evropě byla *N. ceranae* poprvé prokázána ve Španělsku v roce 2005, i když se zde patrně vyskytuje již delší dobu. Ve Středomoří se však v současné době nachází pouze *N. ceranae*, *N. apis* již nebyla delší dobu diagnostikována. Mechanismy, díky kterým byla původní *N.*

apis zcela vytlačena, však nejsou známy. Infekce se vyskytují jak samostatně, tedy *N. apis* nebo *N. ceranae*, nebo jako smíšené infekce společně oběma druhy *Nosema* spp.

V přenosu *N. apis* i *N. ceranae* se uplatňují stejné mechanismy, viz obrázek 1.



Obr. 1: Přenos *Nosema* spp. Zřejmě nejvýznamnější přenos ve včelstvu je trofalaxí včel (A). *Nosema* spp. napadá a ničí buňky žaludeční sliznice, včely mají špatné trávení a dochází ke kálení uvnitř úlu. Tyto výkaly jsou sladké a včelami čističkami jsou rychle odklizeny, přitom se však nakazí i další včely (B, C). Včely – létavky – pak ve vnějším prostředí kontaminují zdroje potravy – vodu i pyl (D, H). Tím se infekce šíří dále, k čemuž napomáhá i zalétávání včel (G, H). Nedostatečná obměna díla, kontaminované rámy a plásky jsou dalším zdrojem spor *Nosema* spp., stejně tak i loupeže v silně infikovaných včelstvech zejména v podletí. (E, F). Podle Fernandez a Coineau 2007.

2. Metodika

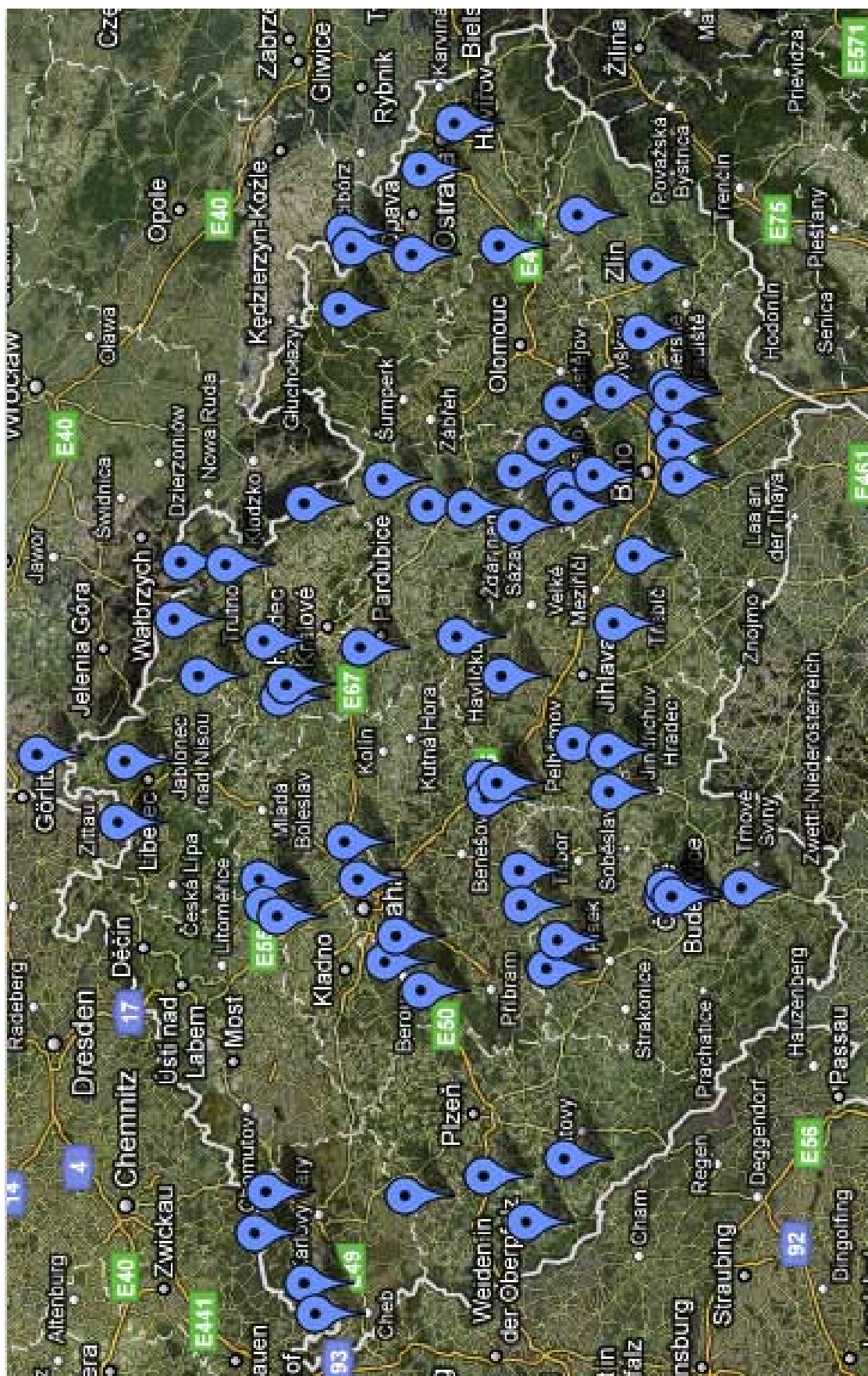
1. V České republice je nose móza včel monitorována u komerčních chovatelů včelích matek. Protože je řada těchto vyšetření prováděna i v laboratoři Výzkumného ústavu včelařského, primárně jsme se zaměřili na vyhodnocení aktuální situace rozšíření *N. ceranae* právě u těchto chovatelů. Lokality jsou znázorněny na obrázku č. 2.

Nosema spp. se diagnostikuje u dospělých, co nejstarších včel. Za tímto účelem se odebírají v zimním období mrtvolky dělnic z úlového dna, nebo během sezóny a letové aktivity včel létavky. Létavky byly odchyceny pomocí průhledných PE pytlíků (40 x 28 cm) přiložením otevřeného pytlíku před česno během slunečného dne. K průkazu včelstva napadeného nose mou je nutno odebrat minimálně 30 létavek. Odchycené živé včely se musí před vyšetřením usmrtit a uchovat v mrazáku, stejně tak i mrtvolky z podmetu.

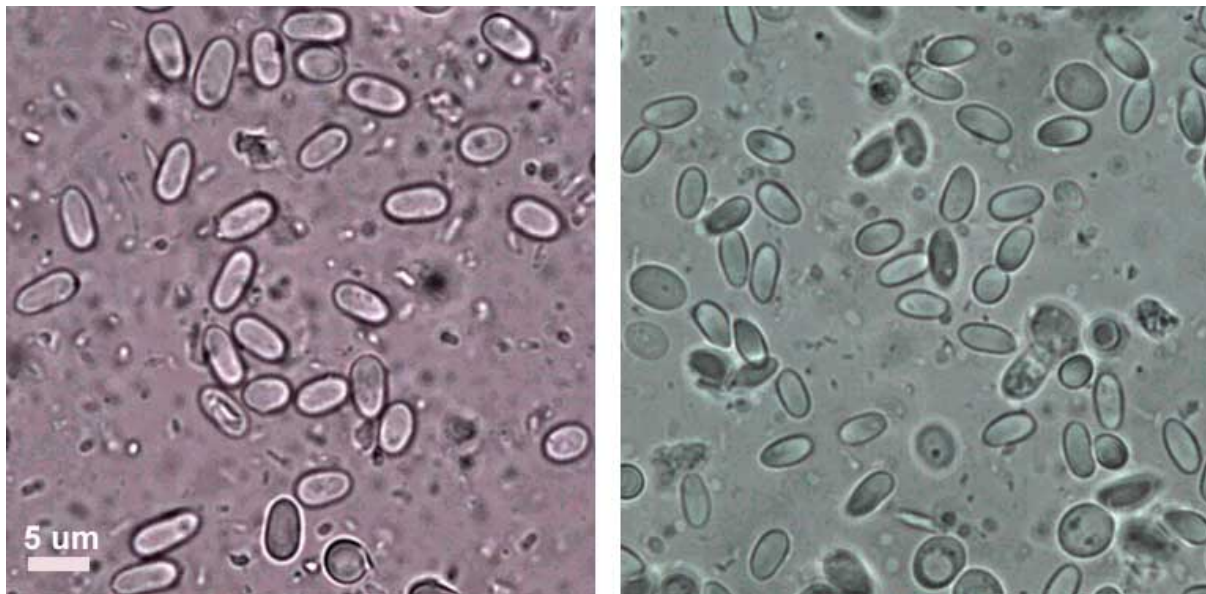
V laboratoři se včely vloží do PE pytlíků a ke vzorku se přidá voda (v množství 0,5 ml na 1 včelu). Takto připravený vzorek včel se homogenizuje ve stomacheru, aby došlo k rozbití žaludeční stěny a vyplavení spor mikrosporidií, které prodělávají vývoj intracelulárně. Ze vzniklé suspenze se odebere kapka k mikroskopickému vyšetření. V předchozích pracech jsme zjistili, že mikroskopický rozdíl *N. apis* a *N. ceranae* je významný (viz. obr. 3) a dostačující ke screeningu výskytu *Nosema* spp. v chovech včel (Kamler et al., 2011, submitted in Research in Veterinary Science).

2. Patogenita *N. ceranae* v chovech byla posuzována návštěvou a kontrolou nebo osobním sdělením a pozorováním rozvoje a chování jednotlivých včelstev v průběhu roku chovateli.

3. Pro možnost inhibice či dezinfekce spor *N. ceranae* byl také proveden pilotní pokus jak s komerčně dostupnými preparáty k tlumení nose mózy, tak s preparáty ve fázi vývoje (spolupráce s National University Galway a Advance Science Teoranta v Irsku). Při této práci byla sledována a vybrána včelstva s přirozenou infekcí *N. ceranae*. Byl vyzkoušen komerční preparát Nozevit a přípravek ve vývoji „new“ (pracovní označení preparátu). Oba dva preparáty jsou na bázi rostlinných extraktů a opakovaně se aplikovaly formou postřiků na jednotlivé rámy dle doporučení a dávkování výrobce smícháním s cukerným roztokem (obr. 4). Každým preparátem bylo ošetřeno 6 včelstev, dalších 6 včelstev sloužilo jako kontrolní skupina. U těchto včelstev bylo před i po aplikaci přípravků zjišťováno množství spor *N. ceranae* kvantifikací v Bürkerově komůrce.



Obr. 2: Přehled lokalit, z kterých pocházely vyšetřovaná včelstva. Mapa: <http://maps.google.cz>



Obr. 3: Spory *Nosema apis* (vlevo) a *Nosema ceranae* (vpravo) ve světelném mikroskopu. I při mikroskopickém rozlišení je patrný rozdíl těchto dvou druhů mikrosporidií. Spory *N. apis* jsou větší (průměrná velikost je 5,8 x 3,3 µm a jsou oválného tvaru) oproti sporám *N. ceranae*, které jsou menší (průměrná velikost 4,6 x 2,5 µm a jsou spíše cylindrického tvaru) (Kamler et al., 2011). Spory *N. apis* i *N. ceranae* fotografovány při stejném zvětšení (1000x).



Obr. 4: Aplikace fytoterapeutik formou postřiku s cukerným roztokem na jednotlivé rámků.

3. Výsledky

3.1 Prevalence a rozšíření *Nosema ceranae*

Celkově bylo vyšetřeno 4010 včelstev ze všech krajů České republiky od 113 chovatelů (resp. lokalit) Celkový výskyt a prevalence *Nosema* spp. je následující:

	<i>Nosema</i> spp.	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
N = 4010	2167	678	1134	356
prevalence	54,0%	31,3%	52,3%	16,4%

Výsledky vyšetření – jednotlivé chovy:

U 8 chovatelů byla zjištěna infekce ve všech včelstvech a naopak u 1 chovatele nebyla přítomna *Nosema* spp. ani v jednom včelstvu.

chovatel	počet vyšetřených včelstev	počet nosema pozitivních včelstev			
		<i>Nosema</i> spp.	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i> + <i>N. ceranae</i>
1	39	1	1	0	0
2	40	17	0	15	2
3	20	20	19	0	1
4	20	20	15	0	5
5	40	9	0	9	0
6	40	20	11	6	3
7	30	20	20	0	0
8	27	1	0	1	0
9	20	5	1	3	1
10	188	141	0	134	7
11	20	6	5	1	0
12	20	4	4	0	0
13	30	3	3	0	0
14	20	6	6	0	0
15	20	14	10	0	4
16	40	1	1	0	0
17	40	7	1	6	0
18	10	3	2	1	0
19	39	33	19	3	11
20	40	3	2	1	0
21	20	5	1	3	1
22	31	13	13	0	0
23	33	24	23	1	0
24	40	17	16	1	0
25	20	3	2	0	1

26	61	60	1	29	30
27	40	9	4	5	0
28	47	26	2	16	8
29	106	92	1	90	1
30	40	30	9	7	14
31	25	14	9	0	5
32	40	35	0	35	0
33	20	7	3	1	3
34	103	59	1	58	0
35	30	4	2	1	1
36	40	23	2	19	2
37	40	13	13	0	0
38	40	11	6	3	2
39	40	34	24	0	10
40	26	14	10	1	3
41	20	19	2	6	11
42	26	24	0	14	10
43	80	67	0	63	4
44	55	16	9	5	2
45	43	13	7	1	5
46	83	44	0	44	0
47	40	1	0	1	0
48	10	1	0	1	0
49	21	1	0	1	0
50	40	7	7	0	0
51	20	15	7	5	3
52	25	0	1	0	0
53	20	9	0	9	0
54	103	63	25	22	16
55	40	12	11	0	1
56	22	18	0	12	6
57	22	15	15	0	0
58	30	3	0	3	0
59	20	7	0	7	0
60	23	12	10	2	0
61	25	23	0	23	0
62	39	30	12	4	14
63	20	6	6	0	0
64	148	132	22	57	53
65	7	2	1	1	0
66	20	3	1	2	0
67	40	12	0	12	0
68	40	10	8	2	0
69	55	20	17	1	2
70	125	81	65	4	12
71	40	15	8	5	2

72	10	5	3	1	1
73	24	14	10	3	1
74	94	82	1	74	7
75	88	58	4	34	19
76	21	14	6	2	6
77	20	20	0	20	0
78	20	10	0	10	0
79	25	20	2	15	3
80	40	8	8	0	0
81	25	3	3	0	0
82	20	10	10	0	0
83	20	7	0	7	0
84	21	11	0	8	3
85	20	8	0	8	0
86	44	32	0	32	0
87	20	2	0	2	0
88	20	7	2	4	1
89	20	1	1	0	0
90	20	20	0	20	0
91	20	0	0	0	0
92	19	19	0	19	0
93	30	11	11	0	0
94	42	29	24	3	3
95	40	3	3	0	0
96	22	5	0	5	0
97	40	40	1	5	34
98	25	22	0	21	1
99	40	23	9	7	7
100	21	15	15	0	0
101	25	23	23	0	0
102	20	15	15	0	0
103	40	20	9	9	2
104	2	2	1	0	1
105	2	1	0	0	1
106	40	7	2	1	4
107	10	8	0	8	0
108	10	10	0	10	0
109	19	6	6	0	0
110	22	22	0	22	0
111	20	8	0	8	0
112	22	19	13	0	6
113	20	19	0	19	0

3.2 Patogenita *N. ceranae*

Pouze u jednoho chovatele byly pozorovány příznaky nose mózy včel (chovatel č. 77). V tomto případě se jednalo o 20 vyšetřených včelstev a ve všech případech infekce *N. ceranae*. Dle chovatele se jednalo o silná včelstva.

3.3 Inhibice a desinfekce *N. ceranae*

Počty spor *N. ceranae* během pilotního pokusu s inhibičními a dezinfekčními preparáty proti sporám *Nosema* spp.:

„new“	kontrola	Nozevit
-------	----------	---------

úl č.	počet spor v milionech/1 ml	
	před aplikací	40 dní po aplikaci
205	254	0,4
204	21,2	32,34
202	130	0
201	5,38	98
199	31,6	0
197	188	1,694
196	14	380
195	48,4	13,2
193	34,4	1,8
192	30,4	6,4
191	4,4	0,488
189	7,688	0,4
188	9,6	0
187	10	0
185	20,4	0
184	6	0
183	23,2	1,6
181	17,8	0

4. Diskuze a závěr

Je patrné, že rozdíly ve výskytu *N. ceranae* jsou značné i mezi jednotlivými chovy v ČR. Prevalence v jednotlivých chovech se pohybuje od 0 do 100 %. Pouze u jediného chovatele byly pozorovány klinické příznaky noseμόzy, které však jsou typickými příznaky infekce *N. apis*, nikoli *N. ceranae*, která byla v tomto případě diagnostikována. Tento efekt doposud nebyl popsán ani ve vědecké a odborné literatuře zabývající se noseμόzou včel. Hodnocení síly včelstva je velmi subjektivní vyjádření každého včelaře. Tento ukazatel musí být hodnocen zkušeným a dlouholetým včelařem.

Výsledky ukazují, že i v podmínkách České republiky se *Nosema ceranae* stává dominujícím druhem mikrosporidií u včel a původní *Nosema apis* je na ústupu.

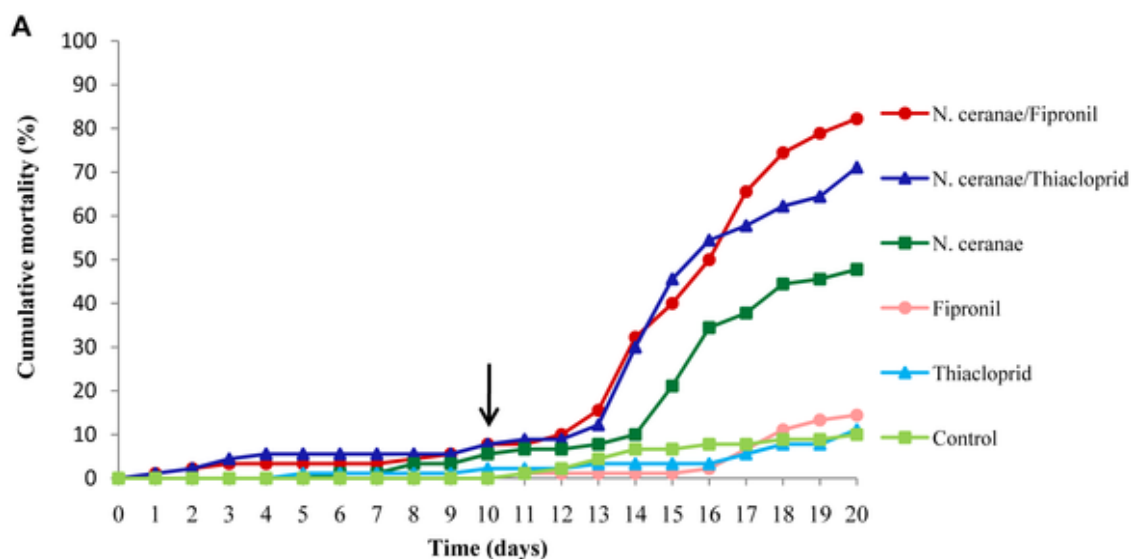
Při ošetření včelstev fytotherapeutiky s přirozenou nákazou *N. ceranae* jsme zjistili velmi dubiózní výsledky 40 dní po aplikaci, i když se jednalo pouze o malou experimentální skupinu včelstev. V eliminaci či inhibici proliferace *N. ceranae* se pravděpodobně velmi vysokou mírou uplatňují imunitní schopnosti jednotlivých včelstev a jejich interakce s vnějšími podmínkami, protože u 2 z 6 včelstev v kontrolní skupině, která nebyla nijak ošetřena, došlo k spontánnímu „samouzdravení“ – spory *N. ceranae* nebyly detekovány a u dalších 3 včelstev v této skupině došlo k snížení množství infekčních spor ve vyšetřovaných včelách. U ošetřených včelstev byl pozorován velmi podobný efekt. K jednoznačnému výsledku a možnosti většího využití různých rostlinných extraktů k tlumení noseμόzy ve včelařské praxi je nezbytné pokračovat ve výzkumu a vývoji.

Zatím jediným a doporučovaným postupem k tlumení a prevenci infekce *N. ceranae* tedy zůstává důsledná obměna díla a dodržování běžných dezinfekčních postupů.

Dlouhodobým monitoringem jiných včelstev s přirozenou infekcí *N. ceranae* zatím můžeme vyloučit, že by *N. ceranae* byla primárním patogenem, který způsobuje kolaps včelstva. Z předběžných výsledků vyšetření uhynulých včelstev (jiných než v rámci tohoto funkčního úkolu) však můžeme říci, že společným faktorem vedoucím ke kolapsu včelstva jsou roztoči *Varroa destructor*, viry DWV a ABPV a také *N. ceranae* (vlastní pozorování, doposud nepublikované údaje VUVč).

V současnosti se také stále více projevuje synergický efekt infekce *N. ceranae* a exponace včel pesticidům používaných v zemědělství. Zásadní práce byla publikována kolektivem Vidou

et al. (2011), který exaktně ověřil, že synergický efekt infekce včel parazitem *N. ceranae* výrazně snižuje LD50 řady přípravků pro ochranu rostlin, zejména neonikotinoidů.



I z tohoto důvodu by se rozlišení a diagnostika *N. apis* a *N. ceranae* měla stát běžnou součástí jakékoli činnosti a programu ve včelařství k rozvoji znalostí při řešení zdravotní problematiky včel a hlavně k udržení a zlepšení vitality včely medonosné v podmínkách ČR.

5. Předání výsledků do praxe

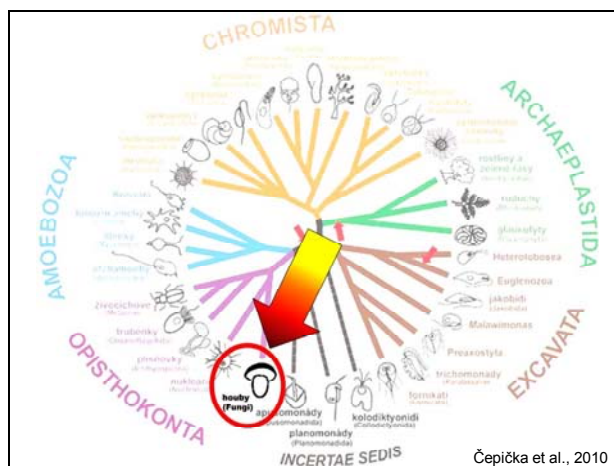
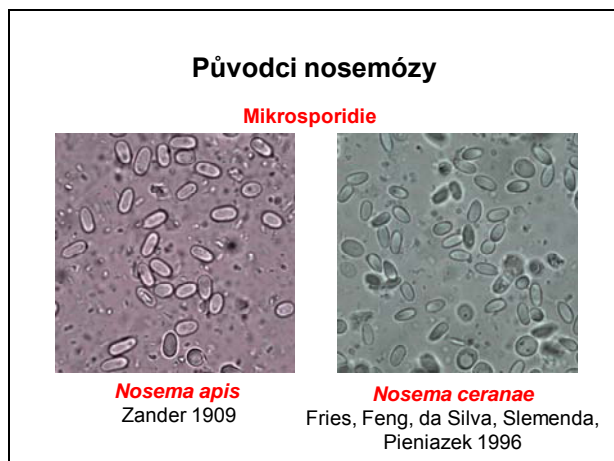
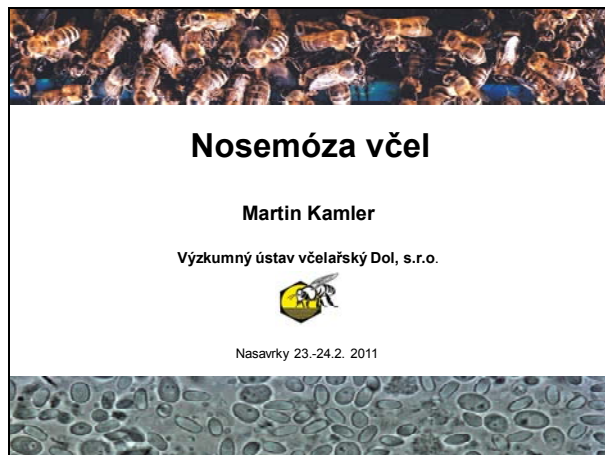
V průběhu roku jsme začali spolupracovat s dalšími chovateli, kteří provozují včelařství primárně pro produkci medu. Dále byla prezentována řada přednášek pro chovatele včel, učitele včelařství, přednášející odborníky ve včelařství a praktické i úřední veterinární lékaře SVS, kteří byli seznámeni s aktuálními poznatky *N. ceranae* a právě probíhajícím výzkumem. Pro SVS byla předložena prezentace s popisem mikroskopické diferenciální diagnostiky. V následujícím období chceme tuto metodu uplatnit v rámci certifikovaných metodik pro laboratoře, které se zabývají diagnostikou nosemózy. Domníváme se, že tato jednoduchá, avšak levná a nenáročná metoda, najde širší uplatnění mezi odborníky a včelaři s hlubším zájmem o znalosti. Vědecké komunitě byl sepsán článek ve formě Short communication, který prochází oponentským řízením v Research in Veterinary Science. Získané výsledky budou uplatňovány v nadcházejícím období pro šíření správné včelařské praxe.

6. Návrh dalšího monitoringu *Nosema* spp. v ČR

- Pokračovat v zavedené praxi každoročního vyšetřování komerčních chovů včelích matek. V případech opakovaného výskytu pozitivních nálezů nad 50 % včelstev na stanovišti, kdy invazním druhem je *Nosema ceranae*, se laboratorní vyšetření doplní klinickou prohlídkou a pak se rozhodne o udělení nebo neudělení atestu pro chov matek. Chovatel ve více zatížených chovech ale musí zajistit koprologickou kontrolu matek a kontrolu doprovodných včel do zasílacích klícek.
- Zacílit vyšetření nose mózy i na další chovatele včel. Až dosud byli vyšetřováni obligátně jen chovatelé matek a fakultativně chovatelé, kteří hlásili nějaké problémy (otravy, jiné úhyny). Skupina, která by neměla zůstat nevyšetřovaná, jsou producenti oddělků.
- Vzhledem k nejasné patogenitě *N.ceranae* je nezbytné získat údaje o výskytu původce a případných klinických příznaků v různých pastevních, klimatických a chovatelských podmínkách. Navrhujeme jako první krok vytvoření sítě dobrovolných spolupracovníků, rekrutovaných z amatérských i profesionálních chovatelů, kteří mají aktivní zájem o kvalitní chov a produkci. Jmenovitě jde o včelaře, kteří zasílají med do soutěží a dalších laboratorních kontrol. Tito chovatelé skýtají velkou pravděpodobnost úspěšné spolupráce.
- Po získání zkušeností bude třeba obrátit pozornost na další segment méně komunikovatelných chovatelů včel, kde úroveň zdravotního stavu, hygieny chovu a dalších parametrů je podprůměrná. Jde o podchycení potenciálních zdrojů všech nálezů, nose mózu nevyjímaje.

7. Přílohy

7.1 Základní prezentace o nosemóze včel používaná v různých obměnách na přednáškách a seminářích pro včelaře.



Nosemóza

rozdílná epidemiologie a průběh

N. apis - nosemóza typ A

X

N. ceranae – nosemóza typ C

Nosemóza

zkrácení života včel, nižší výnosy medu,...

nosemóza typ A

sezónní výskyt – podzim, zima, jaro
dysenterie

nosemóza typ C

celoroční výskyt
rychlejší vývoj
bez symptomů
imunosuprese

synergický efekt společně s neonicotinoidy (imidacloprid)
Španělsko – kolapsy včelstev po 18 měsících

Vyšetření

Metodika kontroly zdraví zvířat pro rok 2011

- u chovů s komerční produkcí matek

Proč?

Nešířit prodejem matek **a oddělků??**

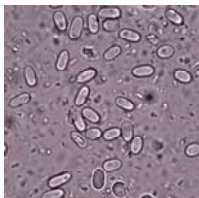
šíření na velké vzdálenosti

infekce matek - úhyny nebo tichá výměna

- ekonomický dopad

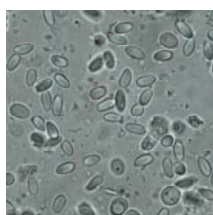
(př. Austrálie – 4 mil. AU \$ v r. 2006 exporty včel)

Diagnostika



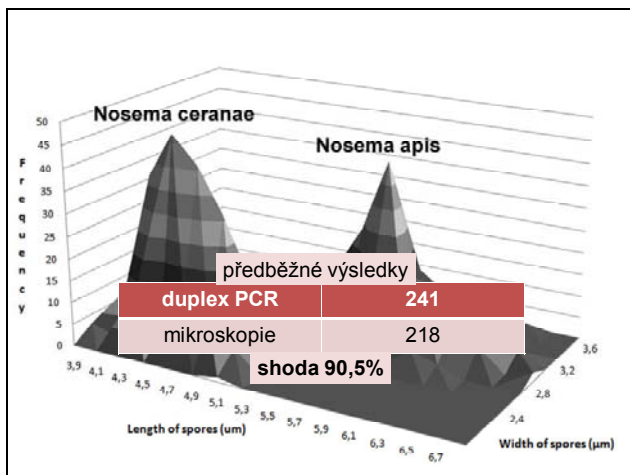
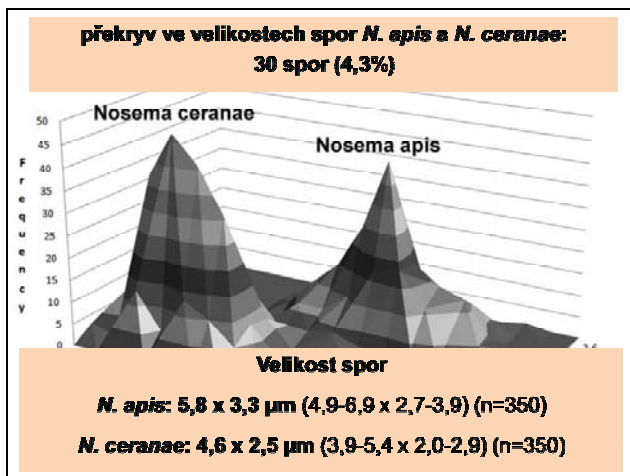
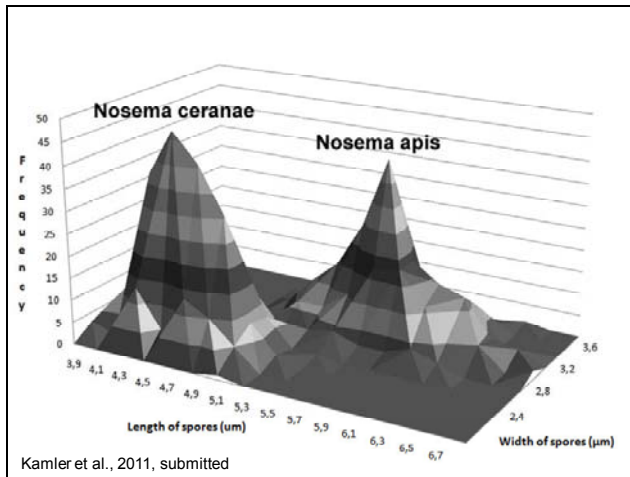
mikroskopicky

30 včel



ALE *N. apis* nebo *N. ceranae* ??

PCR x mikroskopie



Dynamika nosemy v ČR

	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	N. a. + N. c.
2008/09	91,3%	7,6%	1,1%
2009/10	68,5%	21,9%	9,6%
2010/11*	28,4%	54,1%	17,1%

*předběžné výsledky

Prevence a „terapie“

potlačení infekčního tlaku

Léčba

fumagillin – EU registrace a rezidua?
fytoterapeutika

Dezinfekce

chlorem, kys. mravenčí, ...
teplota

50 – 52 °C 24 hod – *N. apis*
??? *N. ceranae*

Nejlepší „lék“ – mezistěna (výměna plástů a čistota)

7.2 Manuskript původní vědecké práce:

A scientific note on the microscopical discrimination of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores: a rapid screening method for nosemosis type C.

Martin KAMLER^{1*}, Jan TYL¹, Stepan RYBA^{1,2} and Dalibor TITERA^{1,3}

¹Bee Research Institute at Dol, Dol 94, 252 66 Libčice nad Vltavou, Czech Republic

²Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Vinicna 7, 128 44 Prague, Czech Republic

³Department of Zoology and Fisheries, Czech University of Life Science, Kamycka 129, 165 21 Prague, Czech Republic

*Corresponding author: Martin Kamler, beedol@beedol.cz, phone: +420 220 940 480, fax: +420 220 941 252

Keywords: honeybee; nosemosis; microscopy; *Nosema apis*; *Nosema ceranae*

Abstract

The honeybee *Apis mellifera* is host of two microsporidian parasites: *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Exact and sensitive molecular techniques for their recognition are used in scientific laboratories. In this study we evaluate morphological discrimination of *N. apis* and *N. ceranae* spores using light microscopy only. Our results determined clear morphometric difference of both species. Spores of *N. apis* are oval- to barrel-shaped 4.9-6.9 μm in length and 2.7-3.9 μm in width (n = 350), whereas *N. ceranae* has spores smaller and almost cylindrical to rod-shaped in appearance with both ends pointed. Size range of *N. ceranae* spores is 3.9-5.4 μm in length and 2.0-2.9 μm in width (n= 350). Totally, only 30 spores (4.3%) were intermediate in size of both species. Our results support the evidence of morphological discrimination of spores, which could be used in common diagnostic laboratories and field studies.

Nosemosis is a parasitic disease afflicting honey bees worldwide. There are two species of microsporidian intracellular parasites that cause this disease: (i) *Nosema apis* Zander, 1909 has been a long-term problem for beekeeping involving *Apis mellifera* (Fries 1993) and (ii) *Nosema ceranae* Fries, Feng, da Silva, Slemenda and Pieniasek, 1996, originally described from *A. cerana*, which has recently been introduced and has infected *A. mellifera* (Chen and Huang 2010; Fries et al. 1996; Higes et al. 2010b; Klee et al. 2007). Both *Nosema* species have different pathologies in individual honey bees and their colonies (Higes et al. 2010b). The differences in the clinical patterns led to their designation as nosemosis type A caused by *N. apis* and nosemosis type C caused by *N. ceranae* at an international meeting in 2009 (COLOSS 2009; Higes et al. 2010b). In some countries, nosemosis type C is very pathogenic for honey bees and has resulted in considerable losses of colonies (Higes et al. 2010a).

Both *Nosema* species complete their development in the ventriculus of adult honey bees and new spores pass into the environment in the bee's faeces. Usually, descriptive studies indicate that the spores of *N. ceranae* are slightly smaller than those of *N. apis* (Fries et al. 1996; Huang et al. 2006; Chen et al. 2009; OIE 2008), however there are very few measurements. Diagnosis of nosemosis is based on the microscopical detection of *Nosema* spp. spores in honey bee samples and/or the parasite's DNA using molecular techniques (OIE 2008; Higes et al. 2010b). Although several molecular techniques for detecting and discriminating between the *Nosema* species infecting honey bees have proved to be very sensitive and species specific (i.e. PCR, PCR-RFLP, multiplex PCR, real-time PCR) (Huang et al., 2007; Klee et al., 2007; Martín-Hernández et al. 2007; Bourgeois et al. 2010), they are not in common use in laboratories and currently impossible to use in apiaries. To our knowledge, most diagnostic laboratories in Europe use microscopic detection of *Nosema* spores. If the sizes of the spores of *N. apis* and *N. ceranae* differ appreciable then light microscopy could be a useful means of screening for both nosemosis. This was tested in the study described here.

For comparing the spores of *N. apis* and *N. ceranae*, samples microscopically positive for *Nosema* spp. spores were randomly chosen. Samples were collected during the winter 2009/2010 in apiaries of commercial honey bee queen breeders in different regions of the Czech Republic. Dead honey bees were collected from the bottom hives. Samples were processed according to the OIE protocol (OIE 2008). We divided the samples into two groups (type A or type C) according spore appearance. These two groups were analyzed in detail: drops of suspension were examined under an Olympus BX 41 microscope equipped with μ Eye UI camera and a series of pictures were taken at a 1000x magnification. Spores in the pictures were analyzed using the calibrated QuickPHOTO CAMERA 2.2 program and the length and width of 700 spores was documented. Each sample was checked by PCR for species determination. The suspension was used for isolating DNA using a genomic DNA

isolation kit (Macherey-Nagel, Germany). All PCR reactions were performed as described previously (Martín-Hernández et al. 2007).

The microsporidian spores obviously differed. The fresh spores in the sample of bigger spores (type A group) were oval- to barrel-shaped in appearance, which varied in size between 4.9-6.9 μm in length and 2.7-3.9 μm in width (n = 350). *Nosema* spp. spores of this size in honeybees are those of *N. apis*, which was confirmed using PCR.

Spores in the sample of smaller spores (type C group) were almost cylindrical to rod-shape in appearance, with both ends of the spores pointed and between 3.9-5.4 μm in length and 2.0-2.9 μm in width (n= 350). PCR detection confirmed the species to be *N. ceranae*.

Discrimination between the spores of *N. apis* and *N. ceranae* based on the sizes of their spores is summarized in Table 1. A total of 700 spores was measured. A graphical projection of the spores of these microsporidian species infecting honeybees indicates they clearly differ. Of this number of spores, only 30 (4.3%) were intermediate in size between those typical for *N. apis* and *N. ceranae* , respectively.

In the literature there are records indicating that the spores of *N. apis* and *N. ceranae* differ in size and that this difference can be used for laboratory diagnosis (Fries et al. 1996; Huang et al. 2007; Chen et al. 2009). The sizes of the spores of both *Nosema* spp. reported here indicate that both species can be clearly distinguished on the basis of the size of their spores (Fig.1). It is suggested that a microscopic investigation that focuses on evaluating the size of the spores should easily answer whether honeybees are infected with *N. apis* or *N.ceranae*. Undoubtedly the sensitivity of a microscopical examination is not high as detection using DNA, which is capable of detecting hundreds *Nosema* spp. spores in honey bee macerates (Martín-Hernández et al. 2007) or even 1 spore per bee (Bourgeois et al. 2010).

After varroosis, caused by the mite *Varroa destructor*, nosemosis is the second most damaging pathogen afflicting honeybees and its incidence should be monitored at least until there is a better understanding of this pathogen.

A microscopical evaluation can be used to discriminate between *N.apis* and *N. ceranae*. This method is fast, cheap, quantitative and can be applied in the field. These data should be helpful in screening for both nosemosis in diagnostic laboratories and by veterinary services.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the grant No. NAZV QH72144 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

REFERENCES

- Bourgeois, A.L., Rinderer, T.E., Beaman, L.D., Danka, R.G.: Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee, *J. Invertebr. Pathol.* 103, 53-58 (2010)
- Chen, Y.P., Evans, J.D, Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D., Pettis, J.F.: Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*, *J. Eukaryot. Microbiol.* 56, 142-147 (2009)
- Chen, Y.P., Huang, Z.Y.: *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia, *Apidologie* 41, 364-374 (2010)
- COLOSS Workshop: Nosema disease: lack of knowledge and work standardization (COST Action FA0803). <http://www.coloss.org/publications/Nosema-Workshop-Proceedings.pdf> (2009) Accessed 20 October 2010
- Fries, I.: *Nosema apis* – a parasite in the honey bee colony, *Bee World* 74, 5-19 (1993)
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S.B., Pieniasek, N.J.: *Nosema ceranae* n.sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a

- microsporidian parasite of the asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae),
Europ. J. Protist. 32, 356-365 (1996)
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., Gonzáles-Porto, A.V., Meana, A., Bernal, J.L., Nozal, M.J., Bernal, J.: A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain, Environ. Microbiol. Reports 2, 243-250 (2010a)
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A.: *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis, Apidologie 41, 375-392 (2010b)
- Huang, W.F., Jiang, J.H., Chen, Y.-W., Wang, C.-H.: A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*, Apidologie 38, 30-37 (2007)
- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R.J.: Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*, J. Invertebr. Pathol. 96, 1-10 (2007)
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., Higes, M.: Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*, Appl. Environ. Microbiol. 73, 6331-6338 (2007)
- OIE: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals: Chapter 2.2.4. Nosemosis of honey bees.
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf (2008).
Accessed 20 October 2010