

Raširenost *Nosema ceranae* na pčelinjacima u Koprivničko-križevačkoj županiji



Ivana Tlak Gajger, Danijela Grilec i Zdravko Petrincec

Uvod

Prema načinu života europske medonosne pčele (*Apis mellifera*) svrstavamo u skupinu socijalnih kukaca koji su se tijekom evolucije razvili i organizirali u društvenu pčelinju zajednicu u kojoj postoji skladna podjela poslova. Pčele su jedan od najvažnijih oprašivača medonosnih biljaka te predstavljaju neizostavni dio hranidbenog lanca (biljka→životinja→čovjek). Istodobno su iznimno važan dio prirodnog ekosustava jer potiču razvoj bioraznolikosti oprašivanjem uzgajanih i samoniklih biljaka. Taj ekološki proces se zasniva na principu međusobne interakcije oprašene biljke i oprašivača, pa stoga pčele zauzimaju važno mjesto u poljoprivrednoj proizvodnji (Delaplane i Mayer, 2000., Pham-Deleque i sur., 2002.).

Nozemoza je nametnička bolest odraslih pčela uzrokovana mikrosporidijama *Nosema apis* (Zander, 1909.) i *Nosema ceranae* (Fries i sur., 1996.). S taksonomskoga gledišta donedavno se pripadnike roda *Nosema* svrstavalo u skupinu praživotinja (Protozoa), ali razvojem novih molekularnih dijagnostičkih metoda utvrđeno je da pokazuju više sličnosti s gljivicama te ih se prema novoj klasifikaciji svrstava u visoko specijalizirane nametničke gljivice (Sina i sur., 2005.). *Nosema* sp. parazitiraju primarno u stanicama srednjeg crijeva medonosne pčele (Fries, 1997.). *N. ceranae* u usporedbi s *N. apis* predstavlja velik

zdravstveni problem u pojedinim pčela, kao i cijeloj pčelinjoj zajednici (Higes i sur., 2010.). Invazija s *N. apis* većinom se javlja u rano proljeće ili kasnu jesen (Doull i Eckert, 1962., Dyes i Wilson, 1978.), odnosno sezonski, a uzročnika se smatra blago virulentnim. Invazija s *N. ceranae* može se javiti tijekom cijele godine (Higes i sur., 2010.), tijekom bolesti je kroničan i asimptomatski, a uzročnika se smatra jako patogenim za invadiranu pčelinju zajednicu (Cornman i sur., 2009.). Bolest je raširena posvuda u svijetu (Klee i sur., 2007., Giersch i sur., 2009.), pa i u Hrvatskoj, a pčelarstvu kao i gospodarstvu nanosi značajne ekonomske štete. Gubitci se u konačnici očituju smanjenim prinomom meda i ostalih pčelinjih proizvoda (Anderson i Giacomini, 1992.), a u voćarstvu i povrtlarstvu smanjenim prinomama lošije kvalitete (Goodwin i sur., 1990.). Bolesne pčele preuranjeno postanu skupljačice (Fries, 1995.). Zbog patoloških promjena u epitelnim stanicama srednjeg crijeva poremećene probave i metabolizma (Hassanein, 1951.) dolazi do neishranjenosti zaraženih pčela (Muresan i sur., 1975.), preranog uginuća pčela skupljačica i smanjenja broja pčela u pojedinoj zajednici (Malone i sur., 1995.) što rezultira konačnim propadanjem zajednice (Morse i Shimanuki, 1990.). Bolesne pčele obično ugibaju izvan košnice od iznemoglosti, a zbog nedostatka vidljivih simptoma bolest je teško zamjetljiva pa se stoga naziva „tih

Dr. sc. Ivana TLAK GAJGER, dr. med. vet., docentica, Danijela GRILEC, dr. med. vet., Veterinarski fakultet, Zagreb; dr. sc. Zdravko PETRINEC, redoviti profesor u mirovini

ubojica" (Hornitzky, 2005.). Spore uzročnika nozemoze u probavni sustav pčela dopiju onečišćenom hranom, vodom ili medom prilikom socijalne izmjene hrane „s rilca na rilce" (Fries i sur., 1996.). Pogodovni čimbenici za prijenos bolesti su grabež, loša pčelarska praksa, nagle promjene temperature, slaba paša, često otvaranje košnica i učestala seoba pčelinjih zajednica (Sulimanović i sur., 1995.).

Donedavno, nozemozu europske medonosne pčele pripisivalo se samo invaziji *N. apis* (Ellis i Munn, 2005.), a nozemozu azijske medonosne pčele (*Apis cerana*) invaziji *N. ceranae*. Usporedni prikaz osobitosti spora *N. apis* i *N. ceranae* prikazali smo u tablici 1. Utvrđivanjem *N. ceranae* u uzorcima europske medonosne pčele počela su opsežna epizootiološka istraživanja o njenoj prisutnosti i raširenosti (Klee i sur., 2007.). Utvrđeno je da *N. ceranae* kao novi nametnik parazitira u europskoj medonosnoj pčeli i širi se na nova zemljopisna područja te vjerojatno zbog visoke infekcijske zamjenjuje *N. apis*. Retrogradnim istraživanjem pohranjenih uzoraka pčela Chen i sur. (2008.) su zaključili da je novoutvrđeni nametnik europske medonosne pčele *N. ceranae* prisutan na području Europe otprilike jedno desetljeće. Posljednjih nekoliko godina utvrđen je veći broj uzoraka pčela invadiranih s *Nosema* sp. (Faucon, 2005.), a što je izravno povezivano s gubitkom pčelinjih zajednica i smanjenom proizvodnjom pčelinjih proizvoda. Rutinskom dijagnostikom pomoću svjetlosnog mikroskopa može se utvrditi invaziju objema vrstama nametnika *Nosema* sp. No, zbog slabo izraženih morfoloških razlika za diferencijalnu dijagnostiku pojedine vrste nužno je rabiti molekularne dijagnostičke metode (Fries i sur., 2006., Higes i sur., 2006.).

Obzirom na vrlo brzu prilagodbu i zamjenu *N. apis* s *N. ceranae* smatra se da je *N. ceranae* puno virulentnija za europsku medonosnu pčelu (Higes i sur., 2007., Paxton i sur., 2007.). U sjevernoj Americi (Williams i sur., 2008.), kao i u Europi (Martin-Hernandez i sur.,

2007., Fries i Forsgren, 2008.) pojava bolesti uzrokovana s *N. ceranae* je češća u toplijim, dok se bolest uzrokovana *N. apis* učestalije javlja u hladnijim klimatskim područjima. Osim što je *N. ceranae* praktički preskočila zapreku domaćina te s azijske medonosne pčele prešla i prilagodila se na europsku medonosnu pčelu, utvrđeno je da je vjerojatno došlo i do promjene tropizma uzročnika u odnosu na *N. apis*. Prema podacima Polteva i Nešataeva (1984.) *N. apis* ponekad zahvaća Malphigijeve cjevčice, žljezdu slinovnicu i hemolimfu, no budući tada *N. ceranae* još nije bila otkrivena i podatak potječe s azijskog područja, vjerojatno je opisan slučaj invazije *N. ceranae*. *N. ceranae* se ne zadržava samo na epitelnim stanicama srednjeg crijeva, već je redovito utvrđena i u drugim organima i tkivima pčele, poput Malphigijevih cjevčica, masnog tkiva i žljezdanog tkiva (Chen i sur., 2009.). Takav izmijenjeni tropizam svakako može uzrokovati puno različite patološke promjene, a time i težu kliničku sliku pri kojoj vrlo često ne postoje ili nisu vidljivi znakovi bolesti karakteristični za klasičnu nozemozu. U većini slučajeva nema proljeva (Faucon, 2005., Higes i sur., 2008.). Zasad poznati degenerativni patološki procesi su upala crijevne stijenke zbog koje dolazi do smanjene resorpcije hranjivih tvari te posljedično smanjene iskoristivosti unesene hrane. Invadirane epitelne stanice propadaju, a čime se smanjuje i funkcija izlučivanja probavnih enzima. U takvim slučajevima pčele gladuju, smanjuju se rezerve bjelančevina i masnog tkiva te koncentracija masnih kiselina u hemolimfi. Također, dolazi do poremećaja u razvoju mliječnih žlijezda mladih pčela koje zbog nedostatka bjelančevina, odnosno resorbiranih aminokiselina, ne mogu proizvesti dovoljno matične mliječi koja predstavlja osnovnu hranu za leglo i maticu. To za posljedicu ima manje otvorenog legla i pojavu kanibalizma.

Cilj ovog rada bio je utvrditi nametnike *Nosema* sp. i jačinu invazije pčelinjih zajednica pomoću svjetlosnog mikroskopa, te provesti diferencijalnu dijagnostiku

pomoću višestrukog PCR-a. Krajnji cilj bio je utvrditi raširenost novoutvrđenog nametnika *N. ceranae* na pčelinjacima u Koprivničko-križevačkoj županiji.

Materijali i metode

Uzorkovanje

Prisutnost nametnika *Nosema* sp. istraživana je na 10 skupnih uzoraka zimskih gubitaka pčela, koje su na zahtjev, s različitih područja Koprivničko-križevačke županije poslali pčelari (Slika 1.). Uzorci su sakupljeni tijekom kliničkih pregleda s podnica košnica, a tijekom veljače i ožujka 2009. godine. Jedan skupni uzorak sadržavao je otprilike 100 uginulih pčela iz više košnica smještenih na jednom pčelinjaku.

Izdvajanje spora

Uzorke smo nakon dopremanja u laboratorij pohranili na – 20 °C do daljnje obrade. Nasumičnim odabirom 60 pčela iz svakog od deset skupnih uzoraka pripremili smo uzorke za ovo istraživanje. Na pčele svakog pojedinačnog uzorka dodali smo 20

mL destilirane vode te ih zgnječili pomoću tučka. Nakon toga, suspenziju smo filtrirali preko filter papira da bi uklonili grube dijelove pčela, te centrifugirali svaki uzorak na 1000 g tijekom 20 minuta i pipetom odvojili nadtalog. Dobiveni sediment u kojem su bile istaložene spore smo raspršili u 1,5 mL destilirane vode i prelili u novu Ependorf tubicu. Do daljnje obrade uzorke smo pohranili na temperaturi 4 °C.

Pretraga svjetlosnim mikroskopom

Svježe pripravljene nativne uzorke izgnječenih pčela pregledali smo pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 400x na prisutnost spora *Nosema* sp.

Izdvajanje genomske DNK

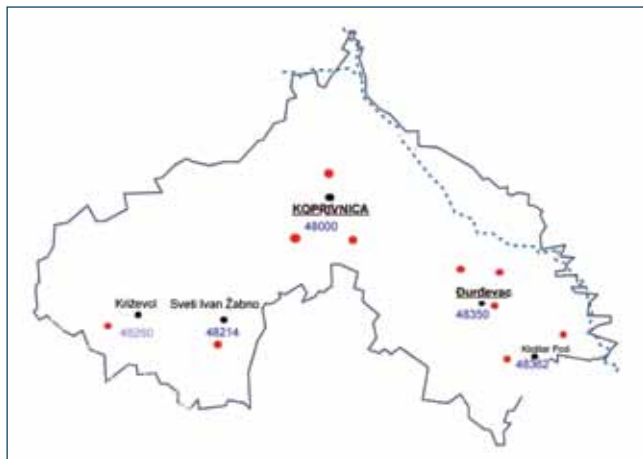
Da bismo izazvali mehaničko pucanje spora *Nosema* sp. od svake suspenzije pojedinog uzorka 50 µL prelili smo u novu Ependorf tubicu koju smo zagrijavali u termobloku na 100 °C tijekom 30 minuta. Genomsku DNK izdvojili smo centrifugiranjem prokuhanih uzoraka spora na 14000 g tijekom deset minuta.

Tablica 1. Usporedni prikaz osobitosti spora *N. apis* i *N. ceranae* (Paxton i sur., 2007., Karthofer, 2008., Fries i Forsgren, 2008.).

Osobitost	<i>Nosema apis</i>	<i>Nosema ceranae</i>
Pojavnost	krajem zime-početak proljeća	tijekom cijele godine
Oblik spore	ovalna – „oblik zrna riže“	ovalna, ponekad blago svinuta – „oblik graha“
Veličina spore	6x3 µm	4,7x2,7 µm
Broj zavoja filamentoznog biča	26-32	20-23
Broj spora	1-34x10 ⁶ spora/pčela	1-158x10 ⁶ spora/pčela

Tablica 2. Početnice rabljene za specifično umnažanje DNK *N. apis* i *N. ceranae* (Anonymus, 2008.).

Nametnik	Početnice za PCR	Očekivana veličina umnoženog PCR proizvoda
<i>Nosema apis</i>	321APIS-FOR[5'GGGGGCATGTCTTTGACGTAATGTA-3']	321 parova baza
	321APIS-REV[5'GGGGGCGTTTAAATGTGAAACAACACTATG-3']	
<i>Nosema ceranae</i>	218MITOC-FOR[5'CGGCGACGATGTGATATGAAA-ATATTAA-3']	218-219 parova baza
	218MITOC-REV[5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAA-AACCG-3']	



Slika 1. Prikaz mjesta uzorkovanja u Koprivničko-križevačkoj županiji (●).

Zatim smo 30 μL nadtaloga odvojili i nadopunili s 10x TE pufera do konačne koncentracije od 10 mM i 5 mM EDTA, pri pH 8. Navedeni nadtalog služio je kao izvor DNK za daljnje analize. Uzorke smo pohranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili smo ih izravno rabili za višestruki PCR. Odabiranjem početnica uzeto je u obzir da je slijed nukleotida u sekvenci specifičan za svaku proučavanu vrstu (tablica 2), i obje se mogu istovremeno umnažati i odvojiti na agarozu gelu, čime je omogućena vizualizacija rezultata.

Višestruki PCR

PCR reakcija početa je denaturacijom tijekom dvije minute na $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, slijedila je

denaturacija u 10 ciklusa po 10 sekundi na $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 sekundi na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 30 sekundi na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ te 25 ciklusa po 10 sekundi na $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 sekundi na $62\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 sekundi na $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ plus dvije sekunde elongacije lanca za svaki ciklus i završila konačnom elongacijom pri $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 7 minuta. PCR postupak izveden je prema uputama proizvođača Taq polimeraze (Sigma, USA). Smjesa za PCR reakciju sadržavala je koncentraciju od $200\text{ }\mu\text{M}$ za svaki dNTP, 3 mM MgCl_2 , $0,5\text{ }\mu\text{M}$ prednje i stražnje početnice i 1 jedinicu Taq DNK

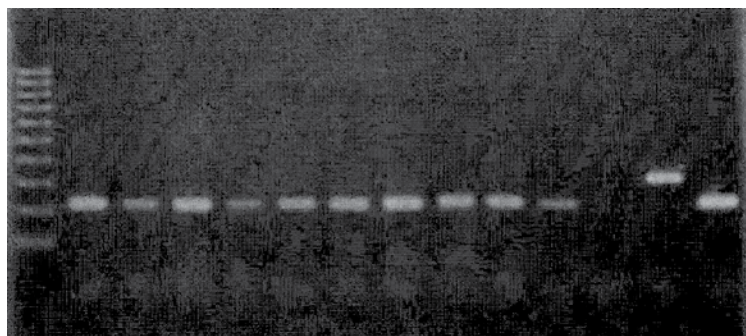
polimeraze. Navedenoj smjesi je za PCR reakciju dodano po $4\text{ }\mu\text{L}$ izdvojenog DNK uzorka.

Elektroforeza u gelu

Molekularnu veličinu PCR proizvoda odredili smo elektroforezom u 2% - tnom agarozu TAE (tris-acetat-etilen diamin tetra octena kiselina) gelu sa standardnim TAE puferom obojenim SYBR zelenom bojom. U svrhu vizualizacije koristili smo UviTec gel dokumentacijski sustav. Sekvencu nukleinske kiseline PCR proizvoda odredili smo i usporedili sa sekvencama nukleotida pohranjenim u banci gena pomoću pretraživača BLAST

Tablica 3. Nalazi pretraga uzoraka zimskih gubitaka pčela uporabom svjetlosnog mikroskopa i višestrukog PCR – a.

	Poštanski broj	Svjetlosni mikroskop		
		<i>Nosema sp.</i>	<i>Nosema apis</i>	<i>Nosema ceranae</i>
1.	48362	+++	negativan	pozitivan
2.	48000	++	negativan	pozitivan
3.	48350	+++	negativan	pozitivan
4.	48350	–	negativan	pozitivan
5.	48000	++	negativan	pozitivan
6.	48214	+++	negativan	pozitivan
7.	48000	++	negativan	pozitivan
8.	48260	++	negativan	pozitivan
9.	48350	+++	negativan	pozitivan
10.	48362	–	negativan	pozitivan



→ *N. apis* (321 pb)
→ *N. ceranae* (218 pb)

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14.

Kolona 1. – standardni marker veličine 1000 parova baza

Kolona 2. – 11. – PCR proizvodi pretraženih uzoraka zimskih gubitaka pčela

Kolona 12. – negativna kontrola

Kolona 13. – pozitivna kontrola za nametnika *N. apis*

Kolona 14. – pozitivna kontrola za nametnika *N. ceranae*

Slika 2. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda za pretražene uzorake zimskih gubitaka pčela.

(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Kao pozitivna kontrola poslužila nam je DNK izdvojena iz nozemozom invadiranih pčela koju smo dobili ljubaznošću dr. sc. Aleša Gregorca s Poljoprivrednog instituta u Sloveniji. Za negativnu kontrolu destiliranu vodu stavljali smo umjesto uzorka DNK. Kontrolne reakcije su bile uključene u svaki ciklus PCR umnažanja kako bi isključili moguće DNK onečišćenje.

Sekvenciranje PCR proizvoda

Za određivanje slijeda nukleotida DNK ili sekvenciranje koristili smo 'BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit' (Applied-Biosystems, Foster City, CA, SAD) sukladno uputama proizvođača i specifične oligonukleotide. Elektroforezu i vizualizaciju kromatograma smo radili na "ABI PRISM DNA sequencer" aparaturi (Applied Biosystems Foster City, CA, SAD), a analiziranje kromatograma računalnim programom BigDye verzija 1.1. (Applied Biosystems, SAD).

Rezultati

Svjetlosnim mikroskopom su u osam od deset pregledanih uzoraka utvrđene spore *Nosema* sp. Jačina invazije sporama nametnika u pojedinom uzorku prikazana je u tablici 3. Nakon pretrage svjetlosnim mikroskopom svih deset uzoraka (osam

pozitivnih i dva negativna) podvrgnuti su daljnjim analizama molekularnom metodom višestrukog PCR – a. Rezultati su pokazali da je *N. ceranae* jedina vrsta nametnika iz roda *Nosema* utvrđena u invadiranih medonosnih pčela raširena na području Koprivničko-križevačke županije, što smo također prikazali u tablici 3. i na slici 2.

Rezultati PCR umnažanja uporabom generičkih parova početnica savršeno su se uskladili s rezultatima umnažanja *N. ceranae* sa specifičnim parom početnica. Također, rezultati pokazuju da su nakon umnažanja sa specifičnim parom početnica svi pretraženi uzorci pčela bili negativni na prisustvo nametnika *N. apis*. Sekvence nukleotida umnoženih proizvoda iz svih uzoraka su 100% identične s *N. ceranae* sekvencama pohranjenim u bazama podataka DSMZ („Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“) banke gena.

Rasprava

Nametnika *N. apis* je godine 1909. opisao Zander, a bolest je nazvao nozemoza. Do 2006. godine smatralo se da je prirodni domaćin za *N. apis* samo europska medonosna pčela te da su invazije nametnikom *N. ceranae* ograničene samo na azijsku medonosnu pčelu (Huang i sur., 2007.). Higes i

suradnici su prvi put 2006. godine u Španjolskoj, a Huang i sur. 2007. godine na Tajvanu utvrdili prirodnu invaziju europske medonosne pčele sporama *N. ceranae*. Martin-Hernandez i suradnici (2009.) uspoređivali su porast broja spora u srednjem crijevu pčela u intervalima različitog trajanja i različitih temperatura tijekom invazije i uočili porast broja spora *N. ceranae* u širem temperaturnom rasponu u usporedbi sa sporama *N. apis*.

Podatci iz literature pokazuju da je *N. ceranae* utvrđena u nekim europskim državama (Paxton i sur., 2007.) kao i u SAD (Chen i sur., 2008.) već cijelo desetljeće. Pretpostavlja se da *N. ceranae* nije novo pristigli nametnik europske medonosne pčele te da je prešao s izvornog domaćina azijske pčele (*A. cerana*) na europsku medonosnu pčelu (*A. mellifera*) (Klee i sur., 2007.) mnogo ranije nego li je to utvrđeno. Točno vrijeme kada je *N. ceranae* stigla i počela parazitirati na pčelinjim zajednicama u Hrvatskoj je nepoznato i nemoguće je istražiti povijesnu rasprostranjenost jer nemamo pohranjenih starijih uzoraka pčela. Naši rezultati pokazuju da je *N. ceranae*, ali ne i *N. apis*, utvrđena u invadiranih pčelinjih zajednica na području Koprivničko-križevačke županije. Takvi podatci daju naslutiti jaku potrebu za epidemiološkim i patogenetskim istraživanjima da bi se prepoznalo uvjete koji su rezultirali zamjenom *N. apis* s *N. ceranae* u Hrvatskoj.

Martin-Hernandez i sur. (2007.) su prikazali nedostatak sezonalnosti i naznačili promjenu kliničkih i epidemioloških osobitosti „nove“ nozemoze. Također, malo se zna o patogenosti *N. ceranae* (Oldroyd, 2007.), a postoji mogućnost i da je ključni čimbenik visokog mortaliteta pčelinjih zajednica (Cornman i sur., 2009.). Rezultati istraživanja Higesu i sur. (2006., 2007.) ukazuju da je *N. ceranae* ozbiljna prijetnja pčelarskoj proizvodnji i prirodnoj bioraznolikosti.

Naši rezultati pokazuju da su dva od deset mikroskopski pretraženih negativnih uzoraka s višestrukim PCR - om pozitivni, što potvrđuje prednost

dijagnostike molekularnim metodama. Prikadnost molekularnih metoda uključuje veću osjetljivost, specifičnost, te sposobnost utvrđivanja svih razvojnih oblika istraživanih nametnika. Liječenje nozemoze uzrokovane nametnikom *N. ceranae* zbog njezina asimptomatskog tijeka (Martin-Hernandez i sur., 2007.) predstavlja ozbiljan problem. Pčelari posvećuju nedovoljno pažnje, a često i zanemaruju nozemozu zbog nevidljivih znakova bolesti. Sanacija bolesti može se provesti prevješavanjem okvira s leglom u dezinficiranu košnicu i redovitom zamjenom starog saća (Sulimanović i sur., 1995.). Normativni akti u EU i Hrvatskoj zabranjuju uporabu antibiotika i fumagilina u liječenju nozemoze i drugih pčelinjih bolesti zbog pojave ostataka štetnih tvari u pčelinjim proizvodima. Trenutno, pčelari u drugim dijelovima svijeta rabe fumagilin, koji je učinkovit za liječenje nozemoze. No, ipak učinak fumagilina na *N. ceranae* se još uvijek istražuje (Williams i sur., 2008.). Loši rezultati testiranja fumagilina za liječenje bumbara invadiranih srodnim nametnikom *Nosema bombi* (Whittington i Winston, 2003.) upućuju na mogućnost da neće biti uporabljiv za kontinuirano liječenje nozemoze pčela uzrokovane nametnikom *N. ceranae*. Liječenje nozemoze uporabom biljnih proizvoda mora se još dodatno istraživati, no rezultati testiranja s Nozevitom pokazali su visoku učinkovitost tog preparata kao preventivne i kurativne mjere u suzbijanju nozemoznih pčela invadiranih s *N. ceranae* (Tlak Gajger i sur., 2009.a, 2009.b).

Zaključci

Istražujući prisutnost i raširenost nametnika *N. ceranae* na pčelinjacima u Koprivničko-križevačkoj županiji utvrdili smo:

- od deset skupnih uzoraka zimskih gubitaka pčela sakupljenih na različitim lokacijama i pretraženih svjetlosnim mikroskopom u osam uzoraka utvrdili smo spore *Nosema sp.*
- metodom višestrukog PCR-a utvrdili smo nametnika *N. ceranae* u svih deset pretraženih uzoraka.

- metodom višestrukog PCR-a nismo utvrdili nametnika *N. apis*.
- nismo utvrdili miješane invazije nametnicima *N. ceranae* i *N. apis*.
- da je molekularna metoda višestrukog PCR – a osjetljivija i specifičnija za diferencijalnu dijagnostiku pojedinih vrsta *Nosema sp.*
- da je jedini nametnik iz roda *Nosema* na području Koprivničko-križevačke županije *N. ceranae*.

Sažetak

Nozemoza je nametnička bolest odraslih pčela uzrokovana mikrosporidijama *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Bolest se javlja širom svijeta, uključujući i Hrvatsku. Pčelarstvu, kao i gospodarstvu nanosi velike ekonomske gubitke koji se očituju umanjenom proizvodnjom meda i ostalih pčelinjih proizvoda, a u poljoprivredi smanjenim obimom oprašivanja i lošijim prinosima. Nedavno je opisan nametnik europske medonosne pčele *N. ceranae*, a njegova zemljopisna rasprostranjenost nije dovoljno poznata. U ovom istraživanju deset skupnih uzoraka zimskih gubitaka pčela sakupljenih u pčelinjacima smještenim na području Koprivničko - križevačke županije su svjetlosnim mikroskopom i molekularnom metodom višestrukog PCR – a pretraženi na raširenost nametnika *N. apis* i *N. ceranae*. Svjetlosnim mikroskopom spore *Nosema sp.* su utvrđene u 80% istraživanih uzoraka. Molekularnom metodom višestrukog PCR - a je u svim istraživanim uzorcima utvrđena *N. ceranae*. Slijed nukleotida u sekvenci DNK iz pretraženih uzoraka spora je 100% identičan s *N. ceranae* slijedom nukleotida pohranjenim u bazama podataka banke gena.

Literatura

1. ANDERSON, D. L. and H. GIACON (1992): Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera, Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. J. Econ. Entomol. 85, 47-51.
2. Anon. (2008): OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Nosemosis of honey bees. http://www.iao.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf
3. CHEN, Y. P., J. D. EVANS, C. MURPHY, R. GUTELL, M. ZUKER, D. GUNDENSEN-RINDAL and J. S. PETTIS (2009): Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. J. Eukar. Microbiol. 56, 142-147.
4. CHEN, Y., J. D. EVANS, I. B. SMITH and J. S.

5. PETTIS (2008): *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidean infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. J. Invertebr. Pathol. 97, 186-188.
6. CORNMANN, R. S., J. P. CHEN, M. C. SCHATZ, C. STREET, Y. ZHAO, B. DESANY, M. EGHOLM, S., HUTCHISON, J. S. PETTIS, W. LIPKIN and J. D. EVANS (2009): Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. PLoS Pathogen 5, 6, e1000466. doi:10.1371/journal.ppat.1000466.
7. DELAPLANE, K. S. and D. F. MAYER (2000): Crop pollination by bees. CABI Publishing, New York, USA. 352-352.
8. DOULL, K. M. and J. M. ECKERT (1962): A survey of the incidence of *Nosema* disease in California. J. Econ. Entomol. 3, 313-317.
9. DYES, E. G. and C. A. WILSON (1978): A study of the seasonal variations of *Nosema apis* Zander of honey bees in Mississippi. Am. Bee J. 118, 33-35.
10. ELLIS, J. D. and P. A. MUNN (2005): The worldwide health status of honey bees. Bee World 86, 88-101.
11. FAUCON, J. P. (2005): La noselose. Sante Abeille 209, 343-367.
12. FRIES, I., F. FENG, A. DA SILVA, S. B. SLEMENDA and N. J. PIENIAZEK (1996): *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis ceranae* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32, 356-365.
13. FRIES, I. (1995): *Nosema apis* – a parasite in the honey bee colony. Bee World 74, 5-19.
14. FRIES, I. (1997): Protozoa. In: MORSE, R. A. and K. FLOTTUM (eds.). Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. Third edition. A. I. Root Company, Medina, Ohio, USA. 57-76.
15. FRIES, I. and E. FORSGREN (2008): Undersökning av spridningen av *Nosema ceranae* i Sverige. Investigation of the distribution of *Nosema ceranae* in Sweden Bitidningen 107, 1-2, 26-27.
16. GIERSCHE, T., T. BERG, F. GALEA and M. HORNITZKY (2009): *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. Apidologie 40, 117-123.
17. GOODWIN, M., A. TEN HOUTEN, J. PERRY and E. R. BLACKMAN (1990): Cost benefit analysis of using fumagilin to treat nosema. New Zealand Beekeeper 208, 11-12.
18. HASSANEIN, M. H. (1951): Studies on the effect on infection with *Nosema apis* on the physiology of the queen honey bee. Q. Jl. Microsc. Sci. 92, 225-231.
19. HIGES, M., R. MARTIN and A. MEANA (2006): *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bee in Europe. J. Invertebr. Pathol. 92, 93-95.
20. HIGES, M., P. GARCIA-PALENCIA, R. MARTIN-HERNANDEZ and A. MEANA (2007): Experimental infection of *Apis mellifera* honeybee with *Nosema ceranae* (Microsporida). J. Invertebr. Pathol. 94, 211-217.
21. HIGES, M., R. MARTIN-HERNANDEZ, C. BOTIAS, E. G. BAILON, A. GONZALES-PORTO, L. BARRIOS, M. J. DEL NOZAL, P. G. PALENCIA and A. MEANA (2008): How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environ. Microbiol. 10, 2659-2669.
22. HIGES, M., R. MARTIN-HERNANDEZ and A. MEANA (2010): *Nosema ceranae* in Europe an emergent type C nosemosis. Apidologie 41, 375-392.

22. HORNITZKY, M. (2005): A report for the Rural Industries Research and Development Corporations, Kingston, Australia, 1-16. <http://www.rirdc.gov.au/reports/HBE/05-055.pdf>.
23. HUANG, W.-F., J.-H. JIANG, Y.-W. CHEN and C.-H. WANG (2007): A *Nosema ceranae* isolate from the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38, 30-37.
24. KARLHOFER, J. (2008): Untersuchungen zum Vorkommen von *Nosema apis* ZANDER bzw. *Nosema ceranae* FRIES in Bienenproben aus dem Zeitraum Zwischen der Aus- und Einwinterung der Bienenvölker. FH Wr. Neustadt, Biotechnische Verfahren, Tulln, Bachelor-Arbeit, 2008.
25. KLEE, J., A. M. BESANA, E. GENERSCH, S. GISDER, A. NANETTI, D. Q. TAM, T. X. CHINH, F. PUERTA, J. M. RUZ, P. KRYGER, D. MESSAGE, F. HATJINA, S. KORPELA, I. FRIES and R. J. PAXTON (2007): Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 1-10.
26. MALONE, L. A., H. A. GIACON and M. R. NEWTON (1995): Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Nosema apis* Z. *Apidologie* 2, 495-502.
27. MARTIN-HERNANDEZ, R., A. MEANA, L. PRIETO, A. MARTINEZ SALVADOR, E. GARRIDO-BAILON and M. HIGES (2007): Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6331-6338.
28. MARTIN-HERNANDEZ, R., A. MEANA, P. GARCIA-PALENCIA, P. MARTIN, C. BOTIAS, E. GARRIDO-BAILON, L. BARRIOS and M. HIGES (2009): Temperature effect on biotic potential of honey bee microsporidia. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.02908-08.
29. MORSE, R. A. and H. SHIMANUKI (1990): Summary of control methods. In: Morse RA, Nowogrodzki R (ed.), Honey bee pests, predators and diseases, Cornell University Press, Ithica and London, 341-354.
30. MURESAN, E., Z. DUCA and I. PAPAY (1975): The study of some histochemical indices of the midgut, healthy and infected with *Nosema apis* Z., of the *Apis mellifera carpatica* bee. In: Proc.XXVth Int. Apic. Congr. Apimondia, Grenoble, 384-385.
31. OLDROYD, B. P. (2007): What's killing American honey bees? *PLoS Biol.* 5, 1195-1199.
32. PAXTON, R. J., J. KLEE, S. KORPELA and I. FRIES (2007): *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558-565.
33. PHAM – DELEQUE, M. H., A. DECOURTYE, L. KAISER and J. DEVILLERS (2002): Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie* 33, 425-432.
34. POLTEV, V. J. and E. V. NEŠATAEVA (1984): Bolezni i vredimeli pčel. Kolos, Moskva, SSSR, 120-124.
35. SINA, M., G. ALASTAIR, M. FARMER, R. ANDERSEN, O. ANDERSON, J. BARTA, S. BOWSER, G. BRUGEROLLE, R. FENSOME, S. FREDERICQ, T. JAMES, S. KARPOV, P. KUGRENS, J. KRUG, C. LANE, L. LEWIS, J. LADGE, D. LYNN, D. MANN, R. MACCOURT, L. MENDOZA, O. MOESTRUP, S. MOZKY, T. NERAD, C. SHEARER, A. SMIRNOV, F. SPIEGEL and M. TAYLOR (2005): The New Higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *J. Eukar. Microbiol.* 52, 399-451.
36. SULIMANOVIĆ, Đ., LJ. ZEBA i J. MARKOVIĆ (1995): Prepoznavanje i suzbijanje pčelinjih bolesti. PIP. Zagreb.
37. TLAK GAJGER, I., Z. PETRINEC, LJ. PINTER and Z. KOZARIĆ (2009a): Experimental treatment of nosema disease with "Nozevit" phytopharmacological preparation. *Am. Bee J.* 149, 485-490.
38. TLAK GAJGER I., O. VUGREK, LJ. PINTER and Z. PETRINEC (2009b): "Nozevit patties" treatment of honey bees (*Apis mellifera*) for the control of *Nosema ceranae* disease. *Am. Bee J.* 149, 11, 1053-1056.
39. WHITTINGTON, R. and M. L. WINSTON (2003): Effects of *Nosema bombi* and its treatment fumagillin on bumble bee (*Bombus occidentalis*) colonies. *J. Invertebr. Pathol.* 84, 54-58.
40. WILLIAMS, G. R., M. A. SAMPSON, D. SHUTLER and R. E. L. ROGERS (2008): Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *J. Invertebr. Pathol.* 99, 342-344.
41. ZANDER, E. (1909): Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münc. Bienenzeit.* 31, 196-204.

Distribution of *Nosema ceranae* in Koprivnica-Križevci County

Ivana TLAK GAJGER, DVM, PhD, Assistant Professor, Danijela GRILEC, DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Zdravko PETRINEC, PhD, Professor in retirement

Honey bees (*Apis mellifera*) caused by two species of microsporidia, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. The disease occurs worldwide, including Croatia, and it causes significant losses in honey production and economic losses, such as reduced yields of honey and other bee products, and poor pollination resulting in lower quality and reduced yields in agriculture. *Nosema ceranae* is a recently described microsporidian parasite of honey bees and its geographical distribution is not well known. In this study, samples of winter honey bee losses collected in apiaries in

Koprivnica-Križevci County were analyzed, using light microscopy and multiplex PCR for the presence of *N. apis* and *N. ceranae*. 80% of investigated samples were assessed as *Nosema sp.* positive by using light microscopy. PCRs gave all positive results (100%). The positive samples were identified as *N. ceranae*, while all negative samples were identified as *N. apis*. The nucleotide sequences of amplification products from nosema infected honey bee samples were 100% identical to the *N. ceranae* sequence deposited in the GenBank database.