Praca oryginalna *Original paper*

Pierwsze przypadki zarażenia pszczół w Polsce przez Nosema ceranae

GRAŻYNA TOPOLSKA, SYLWIA KASPRZAK

Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159 c, 02-787 Warszawa

Topolska G., Kasprzak S.

First cases of Nosema ceranae infection in bees in Poland

Summary

The aim of the study was to discover if Nosema ceranae, a new parasite of Apis mellifera, is present in Poland. The first 15 samples of bees collected after the winter from the bottom of hives sent to laboratory for analysis in 2007 were investigated. The investigation under light microscopy revealed the presence of Nosema spores in ten samples. On the basis of the spores appearance conjunctures were made that N. ceranae was present in eight samples. Samples with Nosema spores were sent to Centro Regional Apicola in Marchamalo (Guadalajara, Spain) where the team of Profesor Meana and Dr. Higes, using PCR analysis, found N. ceranae in all the samples. The studies showed that N. ceranae is present in Polish apiaries and is becoming quite a common infection, and that the appearance of spores under a light microscope can play an important role in the diagnosis of the infection.

Keywords: Nosema ceranae, Apis mellifera

Obecnie znane są dwa wewnątrzkomórkowe, obligatoryjne pasożyty pszczoły miodnej *Apis mellifera* należące do gromady *Microsporea*: *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Oba rozwijają się w nabłonku jelita środkowego pszczoły. Do niedawna, jako członków gromady *Microsporea* zaliczano je do pierwotniaków. Aktualnie mikrosporydia uważane są za wysoko wyspecjalizowane pasożytnicze grzyby (4).

N. apis została opisana w 1909 r. przez Zandera u pszczoły miodnej *A. mellifera* (22). Do zakażenia pszczoły sporami *N. apis* dochodzi drogą pokarmową. Namnażanie pasożyta prowadzi do upośledzenia trawienia u pszczół (20). Zmniejszona jest u nich produkcja mleczka gardzielowego (21), służącego do karmienia larw. Długość ich życia może ulec skróceniu o połowę (18). Chore rodziny gorzej odchowują czerw (19). Zimą lub wczesną wiosną dochodzi do zamierania wielu pszczół i siła rodziny maleje (3, 6, 15). U rodzin silnie zakażonych stwierdza się biegunkę tzn. pobrudzenie kałem plastrów i przedniej ściany ula. Przy zakażeniu matki dochodzi do jej wymiany, zimą często do zamarcia rodziny (7). Przy słabszym zarażeniu choroba przejawia się jedynie w zmniejszonej produkcyjności rodzin (8). W ciągu sezonu pszczelarskiego stopień zarażenia rodziny spada (1). Pasożyt występuje powszechnie na świecie, jednak zakażenie z reguły przebiega bez wyraźnych objawów (3).

W 2004 r. w próbkach pszczół pochodzących z rodzin *A. mellifera* z Tajwanu wykryto obecność pasożyta *N. ceranae* (14), który dotychczas stwierdzany był jedynie u występującej w Azji pszczoły wschodniej *Apis cerana* (9). W 2005 r. stwierdzono *N. ceranae* w próbkach pszczół w Hiszpanii (13). Wyniki eksperymentalnego zakazania pszczół *A. mellifera* tym pasożytem wskazują, że jest on prawdopodobnie bardziej patogenny dla tego gatunku niż *N. apis* i pozwalają przypuszczać, iż w naturze owady giną w terenie, nie wykazując wcześniej objawów klinicznych, takich jak biegunka obserwowana przy zakażeniu *N. apis* (12). Przypuszcza się, że bardzo liczne przypadki zamierania rodzin pszczelich stwierdzane w ostatnich latach w Europie są powiązane z zaadaptowaniem się *N. ceranae* do nowego żywiciela, jakim jest *A. mellifera* (12).

Przy obserwacji w mikroskopie świetlnym różnice w budowie spor *N. apis* i *N. ceranae* są niewielkie. Spory *N. ceranae* są długości 3,3-5,5 µm zaś szerokości 2,3-3,0 µm. Spory *N. apis* są większe, w długości różnica ta wynosi średnio 1 µm, i mają bardziej regularny kształt niż spory *N. ceranae*, które są bardziej beczułkowate (10). Jednakże największe spory *N. ceranae* są większe od najmniejszych spor *N. apis*. W ultrastrukturze spor obu gatunków pasożytów występują wyraźniejsze różnice: wić biegunowa *N. ceranae* jest dużo krótsza i posiada 20-30, podczas gdy u *A. mellifera* 26-32 zwoje (9). Metodą stosowaną do różnicowania *N. ceranae* i *N. apis* jest test PCR polegający na wykrywaniu w badanym materiale sekwencji małej podjednostki rRNA (13) i RFLP-PCR (16).

Celem niniejszych badań było stwierdzenie, czy *N. ceranae* występuje w Polsce.

Materiał i metody

Materiałem do badań było 15 pierwszych osypów zimowych, pochodzących z czterech pasiek (I-IV), nadesłanych przez pszczelarzy do naszego laboratorium w 2007 r. Osypy pochodziły z rodzin żyjących i były nadesłane w celu wykonania rutynowego badania osypów (11), oraz z rodzin zamarłych.

Osypy poddano:

– badaniu pod lupą stereoskopową w kierunku obecności: pszczół ze zdeformowanymi skrzydłami, samic *Varroa destructor* tkwiących między pierścieniami szkieletu zewnętrznego pszczół i leżących luzem, kryształów cukru, larw motylicy, odchodów gryzoni,

– badaniu mikroskopowemu w kierunku obecności spor pasożytów z gromady *Microsporea* i cyst *Malpighamoeba mellificae*,

– badaniu wirusologicznemu w kierunku obecności: wirusa choroby czarnych mateczników (BQCV), wirusa chronicznego paraliżu pszczół (CBPV), wirusa ostrego paraliżu pszczół (ABPV).

Liczbę znalezionych roztoczy i pszczół ze zdeformowanymi skrzydłami notowano w skali czterostopniowej: brak, nieliczne, liczne, bardzo liczne.

Badanie mikroskopowe wykonywano wg metody opisanej przez Hartwig i Topolską (11). W tym celu pobierano 100 pszczół; w przypadku pasieki III, ze względu na małą liczebność próbek, badano jedynie 20 pszczół. Stopień zakażenia oceniano wg schematu: (–) brak spor w preparacie mikroskopowym, (+) pojedyncze lub kilka spor nie w każdym polu widzenia, (++) pojedyncze lub kilka spor w każdym polu widzenia, (+++) liczne spory w każdym polu widzenia.

Do badania wirusologicznego pobierano kolejne 30 pszczół osypu. Pszczoły ekstrahowano za pomocą metody opisanej przez Ball i Allena (3) i testowano przy użyciu testu AGID i zastosowaniu surowic diagnostycznych.

Następnie po około 20 pszczół z próbek, w których stwierdzono spory *Nosema* wysłano do Hiszpanii (w temp. 0-4°C), gdzie zespół Aranzazu Meany i Mariano Higesa, za pomocą testu PCR, postawił ostateczne rozpoznanie rodzaju inwazji *Nosema*. Z pasieki III do badań wysłano zbiorczą próbkę powstałą przez zlanie razem czterech rozcierów pszczół, uzyskanych podczas przygotowywania próbek do badania mikroskopowego, przecedzenie przez filtr z fizeliny [25 GSM (g/m^2)], wirowanie 10 min. przy przyspieszeniu 800 g i rozprowadzenie osadu w 30 ml wody destylowanej.

Wyniki i omówienie

W wyniku przeprowadzonych badań po raz pierwszy wykazano obecność pasożyta *N. ceranae* w Polsce.

Oprócz *N. ceranae* w próbkach stwierdzono *N. apis*, *V. destructor*, wirus choroby czarnych mateczników oraz kryształy cukru.

Odkąd w Europie wykryto obecność *N. ceranae*, w istniejącej literaturze podkreślano, że spory *N. ceranae* i *N. apis* różnią się między sobą tak nieznacznie, iż nie można ich rozróżnić podczas oglądania preparatu w mikroskopie świetlnym, a przydatna w celach diagnostycznych może być jedynie technika PCR. Jest ona jednak droga i dotychczas wykonywana była jedynie przez kilka wyspecjalizowanych laboratoriów na świecie. W ostatnich latach w preparatach sporządzonych z pszczół obserwowano w badaniach własnych występowanie spor *Nosema* o nieco zmienionym wyglądzie: nieco mniejszych, węższych, o lekko zaokrąglonych ścianach bocznych. Dopiero badania Friesa i wsp. (10) nasunęły przypuszczenie, że spory te mogą należeć do gatunku *N. ceranae* oraz że wygląd spor w preparacie mikroskopowym może mieć znaczenie diagnostyczne.

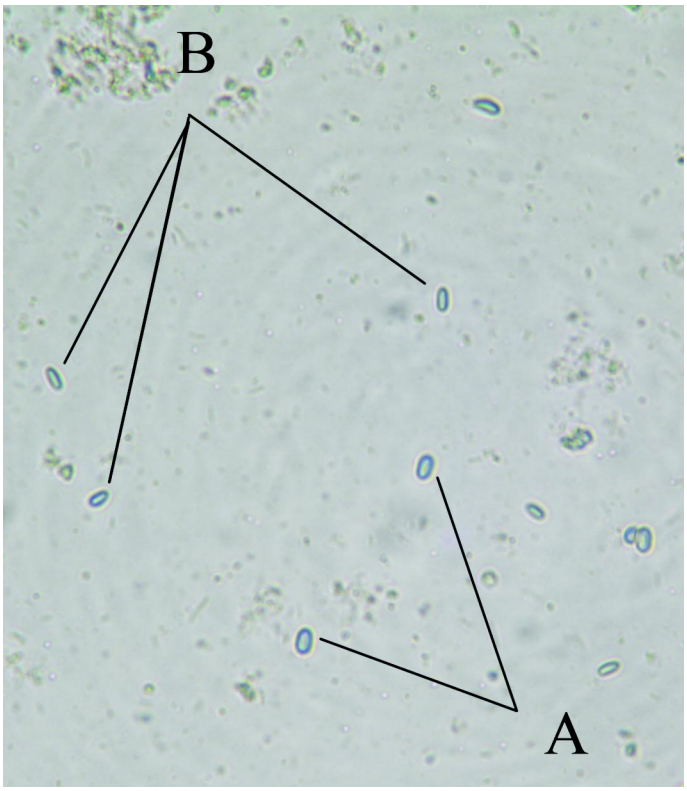
W tab. 1. przedstawiono wyniki badania osypów zimowych w kierunku obecności *N. apis* i *N. ceranae* oraz innych patogenów pszczół.

Badanie mikroskopowe próbek wykazało obecność spor *Nosema* w 10 na 15 badanych osypów. Na podstawie cech morfologicznych oceniono, że w 8 próbkach występują spory *N. apis* łącznie ze sporami *N. ceranae* (ryc. 1), a w dwóch próbkach jedynie spory *N. ceranae*. Badanie PCR wykazało obecność we wszystkich przesłanych do Hiszpanii próbkach obecność *N. ceranae*, przy czym w trzech próbkach dodatkowo znaleziono *N. apis*. Ponieważ w próbce zbiorczej z pasieki III badaniem tym stwierdzo-

Tab. 1. Wynik badania osypów zimowych w kierunku obecności *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, *Varroa destructor* i kryształów cukru

Pasieka	Nr próbki	*V. destructor*		*Nosema sp.*		Inne	Status rodziny
		luzem	między pierścieniami szkieletu zewn.	badanie mikroskopowe	badanie PCR		
I	1	–	–	*N. apis* + *N. ceranae* (+++)	*N. apis* + *N. ceranae*	–	żyje
	2	–	–	*N. apis* + *N. ceranae* (++)	*N. ceranae*	–	żyje
	3	–	–	*N. apis* + *N. ceranae* (+)	*N. apis* + *N. ceranae*	–	żyje
	4	–	–	*N. apis* + *N. ceranae* (+)	*N. ceranae*	–	żyje
II	5	–	–	*N. apis* (++)	*N. apis* + *N. ceranae*	BQCV, kryształy cukru	nie żyje
III	6	nieliczne	liczne	*N. apis* + *N. ceranae* (++)	*N. ceranae*	–	nie żyje
	7	nieliczne	liczne	*N. apis* + *N. ceranae* (++)		–	nie żyje
	8	nieliczne	liczne	*N. apis* + *N. ceranae* (++)		–	nie żyje
	9	nieliczne	liczne	*N. apis* + *N. ceranae* (++)		–	nie żyje
IV	10	nieliczne	b. liczne	*N. apis* (++)	*N. ceranae*	–	nie żyje

Objaśnienia: (+) pojedyncze lub kilka spor nie w każdym polu widzenia; (++) pojedyncze lub kilka spor w każdym polu widzenia; (+++) liczne spory w każdym polu widzenia; BQCV – wirus choroby czarnych mateczników



Ryc. 1. Obraz mikroskopowy preparatu sporządzonego z próbki pszczół zakażonych *Nosema apis* i *Nosema ceranae*; spory, których wygląd sugeruje przynależność do A) *Nosema apis*, B) *Nosema ceranae*

no jedynie *N. ceranae*, zatem wszystkie próbki z tej pasieki zawierały jedynie spory *N. ceranae*.

Od kilku lat na podstawie badania nadsyłanych do laboratorium Katedry Nauk Klinicznych próbek pszczół obserwowano nietypowy przebieg nosemozy. Charakteryzował się on tym, że dużą liczbę spor *Nosema* stwierdzano często pod koniec lata, natomiast w przypadku typowego przebiegu infekcji w miarę upływu sezonu pszczelarskiego nasilenie inwazji spada i spory często trudno jest wykryć za pomocą badań laboratoryjnych. Przypuszczano więc, że zmianę tę należy wiązać z wykorzystywaniem przez pszczelarzy do podkarmiania pszczół pod koniec lata zapasów pokarmu pozostałych po zamarłych rodzinach. Ponadto pszczelarze często donosili o braku jakichkolwiek śladów biegunki w zaatakowanych rodzinach. Obecność *N. ceranae* w naszych pasiekach może tłumaczyć ten nietypowy przebieg nosemozy.

Stwierdzenie *N. ceranae* we wszystkich próbkach zawierających spory *Nosema*, a obecności *N. apis* jedynie w trzech próbkach nasuwa wniosek, że podobnie jak w Hiszpanii (17), Francji (5) *N. apis* jest wypierana w Polsce przez *N. ceranae*.

Sześć na dziesięć próbek ze sporami *Nosema* pochodziło z rodzin zamarłych. W pięciu z tych próbek stwierdzono obecność licznych samic *Varroa* między pierścieniami szkieletu zewnętrznego pszczół. Świadczy to o niewystarczającym zwalczaniu warrozy w okresie jesiennym w rodzinach, z których próbki pochodziły. W szóstej próbce stwierdzono silną infekcję wirusa choroby czarnych mateczników oraz liczne kryształy cukru świadczące o obecności skrystalizowanego pokarmu. Zarówno oba towarzyszące nosemozie zakażenia, jak i krystalizacja pokarmu, z którego pszczoły nie mogły skorzystać, z pewnością miały udział w zamarciu rodzin. Natomiast rodziny, w których poza sporami *Nosema* nie stwierdzono innych patogenów, przeżyły zimę. Uzyskane wyniki nie mogą potwierdzić krążącego ostatnio wśród europejskich pszczelarzy przypuszczenia, że *N. ceranae* odpowiedzialna jest za obserwowany ostatnio w Europie znaczny wzrost śmiertelności wśród rodzin pszczelich w ciągu zimowli.

Podsumowanie

Nosema ceranae jest obecna w polskich pasiekach. Jej występowanie staje się dość powszechne i przypuszczalnie wypiera ona *N. apis*. W diagnostyce zakażenia istotne znaczenie może mieć wygląd spor w preparacie mikroskopowym.

Piśmiennictwo

1. *Bailey L.*: The natural mechanism of suppression of Nosema apis Zander in enzootically infected colonies of the honey bee, Apis mellifera Linnaeus. J. Insect Pathol. 1959, 1, 347-350.
2. *Bailey L., Ball B. V.*: Honey Bee Pathology. Academic Press, London 1991.
3. *Ball B. V., Allen M.*: The prevalence of pathogens in honey bee (Apis mellifera) colonies infested with the parasitic mite Varroa jacobsoni. Ann. Appl. Biol. 1988, 113, 237-244.
4. *Cavalier-Smith T.*: A revised six-kingdom system of life. Biol. Rev. 1998, 73, 203-266.
5. *Chauzat M. P., Higes M., Martin R., Meana A., Faucon J. P.*: Nosema ceranae and Nosema apis in France: co-infections in honey bee colonies. Proc. Second Europ. Conf. Apidology, Prague 10-14 September 2006, s. 30.
6. *Demianowicz A., Wawryn T.*: Wpływ zakażenia pasożytem Nosema apis Zander na wysokość produkcji i siłę rodzin pszczelich w sezonie 1946/47 r. Med. Wet. 1948, 4, 538-541.
7. *Fries I.*: Nosema apis: a parasite in the honey bee colony. Bee World 1993, 74, 5-19.
8. *Fries I., Ekbohm G., Villumstad E.*: Nosema apis, sampling techniques and honey yeld. J. Apic. Res. 1984, 23, 102-105.
9. *Fries I., Da Silva A., Slemenda S. B., Pieniazek N. J.*: Nosema ceranae n. sp. (Microspoa, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee Apis cerana (Hymenoptera, Apidae). Europ. J. Protistol. 1996, 32, 356-365.
10. *Fries I., Martin R., Meana A., Gracia-Palencia P., Higes M.*: Natural infections of Nosema ceranae in European honey bees. J. Apic. Res. 2006, 45, 230-233.
11. *Hartwig A., Topolska G.*: Przydatność rutynowych badań pszczół z osypu zimowego. Pszczeln. Zesz. Nauk. 1995, 39, 71-77.
12. *Higes M., Garcia-Palencia P., Martin-Hernandez R., Aranzazu M.*: Experimental infection of Apis mellifera honeybees with Nosema ceranae (Microsporidia) J. Invert. Pathol. 2007, 94, 211-223.
13. *Higes M., Martin R., Meana A.*: Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J. Invert. Pathol. 2006, 92, 93-95.
14. *Huang W. F., Jiang J. H., Chen Y. W., Wang C. H.*: A Nosema ceranae isolate from the honeybee Apis mellifera. Apidologie 2007, 38, 30-37.
15. *Jeffree E. P., Allen M. D.*: The influence of colony size and of Nosema disease on the rate of population loss in honey bee colonies in winter. J. Econ. Entomol. 1965, 49, 831-834.
16. *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. Invert. Pathol. 2007 – w druku (doi:10.1016/j.jip.2007.02.014).
17. *Martin H. R., Higes M., Garido M. E., Meana A.*: Reliability of Diagnostic methods to detect Nosema spp. spores in honey bees: Molecular identification versus visual observation. Proc. Second Europ. Conf. Apidology, Prague 10-14 September 2006, s. 34.
18. *Maurizio A.*: Beobachtungen über die Lebensdauer und den Futterverbrauch gefangen gehaltenen Bienen. Beih. Schweiz. Bienenzig. 1946, 2, 1-48.
19. *Moeller F. E.*: Nosema disease control in package bees. Am. Bee J. 1962, 102, 390-391.
20. *Morse R. A., Nowogrodzki R.*: Honey Bee Pests, Predators, and Diseases., Cornell University Press, Ithaca, New York 1990.
21. *Wang Der-I., Moeller F. E.*: Ultrastructural changes in the hypopharyngeal gland of worker honey bees infected by Nosema apis. J. Invert. Pathol. 1971, 17, 308-320.
22. *Zander E.*: Tierische Parasiten als Krankenheitserreger bei der Biene. Münchener Bienenzeitung 1909, 31, 196-204.

Adres autora: dr Grażyna Topolska, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: grazyna_topolska@sggw.pl