JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program:	**N 4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor:	**Agroekologie**
Katedra:	**Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů**
Vedoucí katedry:	**prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.**

Diplomová práce

Výskyt a prevalence *Nosema* spp. u včely medonosné (*Apis mellifera*)

Autor:	**Bc. Jana Anderlová**
Vedoucí diplomové práce:	**doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.**
Konzultant diplomové práce:	**RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.**

České Budějovice, duben 2013

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

……

Bc. Jana Anderlová

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za cenné rady, odbornou pomoc a trpělivost. Mé poděkování patří také kolektivu pracovníků Laboratoře veterinární a humánní protistologie za ochotu a odbornou pomoc v laboratoři. Dále děkuji včelařům, kteří poskytli biologický materiál a napomohli tak vzniku této práce. Zásluhy na dokončení má i můj manžel s dcerou, jeho a moje rodiče, kteří mi pomohli vytvořit zázemí pro psaní této práce.

Tato studie byla finančně podpořena grantovou agenturou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (022/2010/Z a 011/2013/Z).

Abstrakt

Nosemóza je závažné onemocnění včel způsobené mikrosporidiemi *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Oba druhy jsou hojně rozšířeny po světě i v České republice.

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit výskyt a prevalenci *Nosema* spp., popsat druhovou variabilitu a posoudit vliv sezóny. Pro identifikaci druhů rodu *Nosema* byla využita molekulární metoda PCR amplifikující část genu kódujícího malou ribosomální podjednotku rRNA.

Celkem bylo vyšetřeno 77 vzorků od 17 chovatelů, z nichž bylo 71 % (55 vzorků) pozitivních na výskyt *Nosema* spp. Vzorky byly odebírány v pěti obdobích v letech 2011–2012. Ve všech chovech se vyskytovala jak *N. apis*, tak i *N. ceranae*. V roce 2011 byl zjištěn výskyt pouze *N. apis*, až na jeden vzorek, kde byla detekována smíšená infekce. V roce 2012 byly detekovány smíšené infekce, anebo se vyskytovala samostatně *N. ceranae*. V tomto roce byla úplná absence samostatného výskytu *N. apis*. Nejvíce pozitivních výsledků bylo detekováno v podzimních a zimních měsících.

Klíčová slova:

včela medonosná; *Nosema* spp.; PCR; diagnostika; prevalence

Abstract

Nosemosis is a serious disease of bees caused by microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Both species are widely spread around the world and in the Czech Republic.

The aim of this thesis was to evaluate the incidence and prevalence of *Nosema* spp., describe the species variability and assess the influence of the season. PCR method amplifying part of the gene encoding the small ribosomal subunit rRNA was used to identify the species of *Nosema* spp.

A total 77 samples originated from 17 farmers were examined Out of them, 71% (55 samples) were positive for the presence of *Nosema* spp. Samples were collected in five seasons in 2011–2012. Both *N. apis*, and *N. ceranae* were detected in all breeds. In 2011, *N. apis* was detected as causative agent of nosemosis except one sample, where the mixed infection was detected. In 2012, *N. ceranae* was observed in mono- or mixed infections. Currently monoinfections of *N. apis* were not detected in 2012. Generally, the highest occurrence was detected in the autumn and winter months.

Keywords:

honey bee; *Nosema* spp.; PCR; diagnostic; prevalence

OBSAH

1 ÚVOD 7
2 CÍL PRÁCE 8
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED 9
3.1 TAXONOMIE MIKROSPORIDIÍ 9
3.2 NOSEMA SPP. A NOSEMÓZA 9
3.2.1 HISTORIE 9
3.2.2 DRUHY PARAZITUJÍCÍ U VČEL 10
3.2.2.1 *NOSEMA APIS* 10
3.2.2.2 *NOSEMA CERANAE* 11
3.2.3 VÝVOJOVÝ CYKLUS *NOSEMA* SPP. 12
3.2.4 VZNIK A PRŮBĚH INFEKCE 14
3.2.5 PATOGENITA 16
3.2.6 PREVALENCE 17
3.2.7 DIAGNOSTIKA 20
3.2.8 LÉČBA NOSEMÓZY 22
3.2.9 PREVENCE VZNIKU NÁKAZY 23
4 METODIKA 25
4.1 PŘEHLED SLEDOVANÝCH CHOVŮ 25
4.2 ODBĚR VZORKŮ 27
4.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ 28
4.4 GENOTYPIZACE 28
4.4.1 IZOLACE DNA 28
4.4.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR) 29
4.4.3 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA 30
4.4.4 EXTRAKCE DNA Z GELU 31
4.4.5 SEKVENACE 32
5 VÝSLEDKY 33
6 DISKUZE 37
7 ZÁVĚRY 40
8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ 41

1 ÚVOD

Význam včely medonosné nespočívá pouze v produkci medu, vosku a mateří kašičky, ale zejména v opylování rostlin. Produkce potravin v Evropě je z velké části závislá právě na včelách. Rostliny by bez jejich opylení neprodukovaly kvalitní plody, nerozmnožovaly by se a celková rozmanitost rostlin by se ztrácela.

Včelaření je jedním z mála oborů lidské činnosti, které nijak nenarušuje životní prostředí a je zcela přirozenou a neodmyslitelnou součástí přírody.

Zvýšená poptávka po medu a ostatních včelích produktech, zvyšuje i zájem o včelařství. Počet včelařů se snižuje, zatímco počty včelstev se zvyšují. V roce 1999 bylo v České republice zhruba 20 komerčních včelařů, dnes jejich počet stoupl na 250.

Cílem každého včelaře je mít silná a zdravá včelstva, neboť jen ta mu zajistí vysoké výnosy medu. Včelař proto musí dbát na správnou techniku chovu, na dobré zazimování, krmení a celkovou prevenci proti chorobám. V mnoha případech právě nemoc ukončí včelaření. Nemoci včel se rozdělují na nakažlivé a nenakažlivé. Při nenakažlivém onemocnění včely hynou nejčastěji hladem, zimou, ale také v důsledku průjmu nebo zácpy. Průjem včel zpravidla způsobuje těžce stravitelná potrava. Zácpa vzniká většinou nepoměrem krmiček a otevřeného plodu v úle, zpravidla spojeným s chladným počasím, kdy se ve včelstvu projeví žízeň (Hanousek, 1991). Infekční nemoci rozdělujeme na způsobené houbami (zvápnění včelího plodu, zkamenění včelího plodu), bakteriemi (mor včelího plodu, hniloba včelího plodu, septikémie včel), viry (virus deformovaných křídel, virus pytlíčkového plodu) a parazity (varroáza, roztočíková nákaza včel, nosemóza), způsobené zejména prvoky nebo roztoči.

Druhou nejrozšířenější nemocí včel je nosemóza, na kterou se zaměřuji v této diplomové práci. Nebezpečí nosemózy spočívá v rychlém šíření a masovém namnožení, které dále způsobuje zpomalený rozvoj včelstva, následně nižší výnosy medu nebo dojde k úplnému úhynu včelstva.

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci, která se zabývala posouzením vlivu *Nosema apis* a *Nosema ceranae* na včelstvo.

2 CÍL PRÁCE

- Vyhodnotit výskyt a prevalenci *Nosema* spp. u vybraných chovatelů v Jihočeském kraji.
- Pomocí molekulárních metod určit druhy *Nosema* spp.
- Zjistit sezónní dynamiku *Nosema* spp. ve sledovaných včelstvech.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 TAXONOMIE MIKROSPORIDIÍ

Mikrosporidie jsou dlouhodobě známé parazitické organismy téměř všech skupin zvířat, včetně bezobratlých a obratlovců (Mathis et al., 2005).

Mikrosporidie jsou řazeny do samostatného kmene Mikrosporidia v rámci říše Fungi a jejich nejblíže příbuznou skupinou jsou Zygomycetes (Keeling et al., 2000).

Většina entomopatogenních mikrosporidií patří do rodu *Nosema*, která má více než 150 popsaných druhů, které infikují téměř všechny taxonomické skupiny hmyzu, zejména řády Lepidoptera a Hymenoptera (Sprague, 1978; Becnel et Andreadis, 1999).

Společnou charakteristikou mikrosporidií je, že mimo hostitelskou buňku přežívají jen jako metabolicky neaktivní spory a že infikování hostitelských buněk zahrnuje klíčení spor, tj. dojde k vytlačení pólového vlákna, které prorazí hostitelskou buňku a přímo do její cytoplasmy aplikuje infekční sporoplasmu (Bigliardi et Sacchi, 2001).

Počet závitů pólové trubice je důležitým kritériem pro taxonomické odlišení různých druhů rodu *Nosema* (Burges et al., 1974).

3.2 *NOSEMA* SPP. A NOSEMÓZA

Nosemóza je závažné onemocnění dospělých včel, způsobené mikrosporidiemi rodu *Nosema*; *Nosema apis* a *Nosema ceranae* jsou dva houbové patogeny, které infikují včelu medonosnou (*Apis mellifera*) (Gisder et al., 2010). U včelí kolonie jsou často infikováni všichni členové, včetně dospělých dělnic, trubců a královny (Chen et al., 2009).

3.2.1 HISTORIE

Předpokládá se, že nosemová nákaza se vyskytuje u včelstev odedávna. Dönhoff popsal chorobu identickou s nosemovou nákazou již v letech 1856–1858;

původce nákazy však nebyl zjištěn, a proto se na jeho pozorování zcela zapomnělo (Svoboda et al., 1968).

V roce 1909 byla za původce nosemózy u včel označena mikrosporidie *Nosema apis* (Zander, 1909). Až do nedávna byla *N. apis* považována za jediného původce nosemózy u Evropské včely medonosné (*Apis mellifera*). V roce 1996 byl u asijských včel (*Apis cerana*) popsán obdobný parazitický patogen, který byl pojmenován *Nosema cerenae* (Fries et al., 1996). V Evropě byla tato „původně asijská" mikrosporidie detekována ve včelstvech ve Španělsku, i když lze předpokládat, že se *N. ceranae* v Evropě vyskytovala již dříve (Higes et al., 2006).

Přeprava včely medonosné po celém světě je spojena i s přepravou mikrosporidií *N. apis* - parazita trávicího traktu včel. *N. apis* byla následně popsána i jako parazit včely východní (*Apis cerana*) (Singh, 1975; Fries et Feng, 1995; Rice, 2001).

3.2.2 DRUHY PARAZITUJÍCÍ U VČEL

Do dnešní doby, byly popsány dva druhy mikrosporidií parazitující u včel: *Nosema apis* (Zander, 1909) a *Nosema ceranae* (Fries et al., 1996). *N. apis* je původní parazit Evropské včely medonosné (*Apis mellifera*) a *N. ceranae* asijské včely medonosné (*Apis cerana*) (Fries et al., 1996).

3.2.2.1 *NOSEMA APIS*

Spory *N. apis* jsou oválného tvaru o velikosti 5–7 μm × 3–4 μm. Pólová trubice je stočena více jak 30× okolo vnitřního obvodu spory a je tedy výrazně delší než u *N. ceranae*. Ve včelím těle trvá vývojový cyklus sedm dní. V průběhu dvou týdnů od nakažení dochází ke zničení výstelky středního střeva.

Vzhled spor *N. apis* může být zaměnitelný s kvasinkovými buňkami, plísňovými sporami, tukovými inkluzemi nebo cystami měňavky včelí (*Malpighamoeba mellificae*). Ty jsou obdobné velikosti jako spory *Nosema*, jejich velikost je v průměru 6–7 μm, ale jsou kulovitého tvaru místo oválného. Pozitivní identifikace může být provedena pouze pozorováním typických spor v žaludku nebo

výkalech. Velmi mírné infekce nemusí být prokazatelné (World Organisation for Animal Health, 2008).

Spory *N. apis* mají pod mikroskopem výrazný vzhled s tlustou bezbarvou stěnou a modře mořenými nevýraznými vnitřky. Jádra uvnitř spory nejsou viditelná. Touto metodou můžeme odlišit *N. apis* od jiných patogenů nalezených ve včelách (World Organisation for Animal Health, 2008).

N. apis je nejčastější příčinou infekce dospělých včel a je považována za ekonomicky nejzávažnější onemocnění včel v Austrálii (Anon 1, 2013).

Parazit je všudypřítomný a množí se po celý rok. Výskyt nosemové nákazy se obecně zvyšuje, pokud jsou včely oslabeny, když na podzim a v zimě v chladnějším podnebí klesá množství plodu a dále brzy na jaře, když dochází ke zvýšení počtu plodů (Weiser, 1961; Webster, 1993). V zimě jsou spory jen zřídka k nalezení, nebo se nacházejí pouze u silně infikovaných včel (World Organisation for Animal Health, 2008).

Parazitu *N. apis* nevyhovují vysoké teploty, proto se jeho výskyt výrazně snižuje během letních měsíců. Tyto sezónní výkyvy během roku umožňují včelstvům alespoň částečně obnovovat svoje kolonie. Pokud není nákaza silná a včelař bedlivě nesleduje svůj chov, tak nákazu ani nezaznamená.

3.2.2.2 *NOSEMA CERANAE*

V současné době je *N. ceranae* převládající mikrosporidiální parazit včel v Severní Americe (Chen et al., 2008) a Evropě (Klee et al., 2007).

Infekce *N. ceranae* se vyznačuje zejména výrazným poklesem produkce medu a snížením počtu včel v kolonii, který může vést až ke kolapsu včelstva. Mezi zdravotní dopady nosemové nákazy způsobené *N. ceranae* u včel patří snížená schopnost získávat živiny z prostředí a zkrácená životnost (Higes et al., 2007). Na úrovni včelí kolonie může nosemová nákaza vést k nízkému růstu a ke špatnému přezimování. Nicméně *N. ceranae* je rozšířená jak ve zdravých, tak ve slabých včelstvech a její celkový příspěvek ke ztrátám včel je diskutabilní (Cox-Foster et al., 2007; Higes et al., 2008; Pajuelo et al., 2008).

Viditelné příznaky, jako úplavice, malátnost a větší počet mrtvých včel před úlem u nákazy způsobené *N. ceranae*, zcela chybí. Nakažené včely hynou už po osmi dnech a ve většině případů mimo úl.

Higes et al. (2007) zaznamenal 100% úmrtnost uměle nakažených včel v laboratoři do osmi dnů.

Spory *N. ceranae* měří 4,4 × 2,2 μm (Smith, 2012). Počet závitů pólové trubice uvnitř spory je 18–21 (Chen et al., 2009).

Na rozdíl od infekcí vyvolaných *N. apis* je nejvyšší výskyt *N. ceranae* během letních měsíců. Včelaři z každé země, ve které byla identifikována nákaza způsobená *N. ceranae*, hlásili největší problémy během léta (Oliver, 2013). Martín-Hernández et al. (2009) potvrdil různé epidemiologické vzorce mezi oběma druhy.

N. ceranae pochází z tropické Asie a její spory jsou citlivé na chladné počasí. Spory mohou být zabity zchlazením nebo zmrazením. Pokud umístíme kontaminované plásty do mrazničky a ujistíme se, že všechny části jsou zmraženy (u plástů obsahujících med to trvá déle), docílíme usmrcení všech životních stádií *N. ceranae*, zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), lesknáčka úlového (*Aethina tumida*) a dalších drobných parazitů (Chen et al., 2009).

Bylo dokázáno, že spory *N. ceranae* jsou více citlivé na teplotu 20 °C než spory *N. apis* (Cox-Foster et al., 2007), naopak došlo k částečnému zachování životaschopnosti spor *N. ceranae* při ošetření za teploty 60 °C po dobu 6 hodin (Fenoy et al., 2009). Naproti tomu spory *N. apis*, které byly vystaveny po dobu 15 minut teplotě 60 °C, byly zcela zabity (Cantwell et Shimanuki, 1970).

Teplota 60 °C se běžně používá k odstranění vosku ze starých plástů, ty potom bývají znovu použity v úlech a může docházet k dalšímu šíření infekce v nových koloniích včel (Fenoy et al., 2009). Plásty mohou být sterilizovány zahřátím na 49 °C po dobu 24 hodin (Cantwell et Shimanuki, 1970).

3.2.3 VÝVOJOVÝ CYKLUS *NOSEMA* SPP.

Úplný vývojový cyklus *N. apis* trvá až sedm dní. Spory *Nosema* spp. mají dvě spojená jádra, které fungují jako jednotka. Obě vrstvy obalu spory a polární trubice hrají důležitou roli během mikrosporidiální infekce. Hustý a pevný obal sporu chrání

a pomáhá jí odolávat různým tlakům z prostředí (Xu et al., 2006). Stěna spor se skládá z elektronové vnější vrstvy, z proteinové exospory a průsvitné elektronové vnitřní endospory, která obsahuje chitin a proteiny (Bhat et al., 2009; Chioralia et al., 1997; Keeling, 2003; Lom 1972; Rezaian et Krake, 1987; Rostand et Esko, 1997).

Pólová trubice je stočená podél vnitřního obvodu spory a slouží k přenosu infekční části (sporoslasmy) do hostitelské buňky. Pólová trubice je dutá a její délka dosahuje až 400 μm. Na konci pólové trubice se nachází kotevní disk, který ukotvuje pólovou trubici k přední části spory.

Po proniknutí spor do těla včely společně s potravou jsou spory filtrovány z medného váčku přes česlo, žaludek až do střev. Fyzikální a chemické podmínky ve střevech jsou spouštějícím faktorem pro vystřelení spor a následné vegetativní rozmnožování nosemy uvnitř buněk střeva (Chen et al., 2009). Pólová trubice je vymrštěna ze spory a proniká buněčnou membránou buněk střeva, kde je potom sporoplasma převedena do cytoplasmy hostitelské buňky. Tam se vegetativní stadia množí a dokončují svůj životní cyklus (Weidner et Byrd, 1982; Williams et al., 2002; Xu et Weiss, 2005).

Uvolněné spory postupují trávicím ústrojím včely do výkalového vaku, který opouštějí společně s výkaly anebo ve střevech napadají další hostitelské buňky.

Zatímco se zdá, že *N. apis* omezuje svůj životní cyklus pouze na střevní stěny, bylo nedávno prokázáno, že *N. ceranae* napadá i ostatní tkáně (Chen et al., 2009). Kromě primární infekce ve středním střevě byla molekulárními metodami prokázána přítomnost *N. ceranae* ve tkáních hypofaryngeálních a slinných žláz, malpigických trubicích a v tělním tuku (Chen et al., 2009). Včely infikované *N. ceranae* nevykazují žádné specifické klinické příznaky.

Široká škála vnějších faktorů ovlivňuje biotický potenciál každého druhu, patří mezi ně teplota, která působí na životní cykly většiny parazitických druhů (Bush et al., 2001). Vývojový cyklus *Nosema* spp. u včel je závislý na teplotě (Martín-Hernández et al., 2009).

Zatímco infekce *N. ceranae* může být ve včelách detekována ve všech čtyřech ročních obdobích (Martín-Hernández et al., 2007; Higes, 2008), infekce způsobená *N. apis* je častější na jaře a na podzim (Bailey, 1955; Doull et Eckert, 1962; Dyes et Wilson, 1978; World Organisation for Animal Health, 2008). Jedním

z vysvětlení vysoké virulence u *N. ceranae* by mohlo být lepší přizpůsobení se vyšším teplotám než u *N. apis* (Fenoy et al., 2009; Martín-Hernández et al., 2009), což naznačuje, že šíření by mohla být ovlivněna změnou klimatu (Gisder et al., 2010).

Na vývoj *N. apis* a tedy i na jeho šíření má veliký vliv teplota v úle. Optimální teplota pro rozvoj spor je 30–35 °C, pokud teplota stoupne nebo klesne pod tuto hranici, vývoj se značně omezí (Kubišová et Hálsbachová, 1998). Malone et al. (2001) uvádí, že spory nosem jsou zabity při dlouhodobém vystavení teplotám převyšujícím 33–35 °C.

Sezónnost nosemózy byla sledována i z hlediska vlivu srážek (Dyess et Wilson, 1978), ale tento vliv není v současné době, jasně prokazatelný (Martín-Hernández et al., 2007).

3.2.4 VZNIK A PRŮBĚH INFEKCE

K nosemové nákaze dochází většinou požitím spor s potravou a vodou (Chen et al., 2009). Čím více buněk je napadeno a vyřazeno z činnosti, tím hůře je trávena potrava, především bílkoviny a cukry. Silná nákaza vyvolává zvýšenou potřebu potravy a vody, přičemž se však snižuje celkový obsah dusíkatých látek u nakažené včely. Nedostatek bílkovin se projevuje u nemocných včel atrofií hltanových žláz, špatně strávené cukry zatěžují výkalový vak, zvláště v zimním období a vyvolávají úplavici včel. Výkaly nemocných včel jsou zdrojem nákazy pro další včely (koprofagie), (Kubišová et Hálsbachová, 1998). Sladké výkaly lákají ostatní včely, které je konzumují. Vysoce vyvinutý pud čistoty jim velí odklízet výkaly a mrtvé včely z úlu ven.

Zdravé i nakažené včely mají ve zvyku kálet venku mimo úl. Pokud dlouhou dobu trvá nepříznivé počasí a včely nemohou ven z úlu, tak kálejí i uvnitř úlu, čímž se výrazně zvyšuje šíření nákazy.

Nosemová nákaza má specifické negativní účinky na včely. Starší včely, které jsou nakaženy, v krátké době umírají a mladé včely ve snaze udržet příjem nektaru a pylu přebírají jejich povinnosti. Menší počet včel v úle nedokáže udržovat optimální úlovou teplotu. Včely, které byly infikovány a jsou méně než jeden týden staré, nejsou schopné dobře trávit potravu a produkovat dostatek potravy pro plod.

Infikované včely mají tendenci „přeskočit“ chovnou fázi svého života a stanou se rovnou létavkami. Jejich délka života se může snížit až o 78 % (Mussen, 2011).

Včelí královna se může nakazit stejně jako dělnice při konzumaci potravy obsahující spory nosem. Pokud se nakazí včelí královna, má to negativní dopad na celou včelí kolonii. V jejím těle jsou narušeny metabolické procesy ve střevech, způsobené parazitem a to zřejmě vede i k těžkému poškození vaječníků. Nejprve dojde k omezení kladení vajíček, následně může královna přestat klást úplně anebo i zemřít. Největší rozdíl byl zjištěn ve velikosti vaječníků, kdy nakažená královna měla vaječníky menší a v některých případech byly i svraštělé. Zatím není zcela jasné, jakým způsobem poškozuje *N. apis* reprodukční orgány včelí královny. Velké množství vajíček, larev a kukel, které byly nakladeny nakaženými včelími královnami, nebylo infikováno *N. apis* (Hassanein, 1951).

V silně infikované kolonii včel se nemůže až 15 % larev plně vyvíjet, jelikož mladé včely „krmičky“ nemají dostatečně rozvinuté hltanové žlázy (Anon 1, 2013).

Dalším zdrojem nákazy včelstva jsou pokálená česna, napajedla, rámky, plásty i včelař nedodržující zásady hygieny. Včely šíří nákazu loupeží a zalétáváním (Kubišová et Hálsbachová, 1998). Včely se z proletu nevracejí vždy do svého mateřského úlu, ale občas zalétávají i do sousedních úlů, zvláště pokud jsou umístěny blízko u sebe. Na česnech úlů bývají zpravidla včely „strážkyně“, které by měly do úlu vpustit jen vlastní včely, nicméně pokud včela letí se zásobami, ve většině případů je vítána.

V období, kdy nemají včely co sbírat, je nedostatek pylu a nektaru, se stává, že se včelstva začnou navzájem okrádat o zásoby. Silná včelstva okrádají o zásoby a o část dělnic ta slabá. Pokud včelař včas nezasáhne, může o včelstvo přijít. Vyloupené včelstvo může být oslabeno z důvodu nemoci, což vede k jejímu šíření.

K propuknutí nákazy může tak přispět jarní podněcování bílkovinnými krmivy, zejména glycidovými těsty s pylem a jinými bílkovinnými přísadami, jejichž konzumování především staršími včelami může stimulovat rozvoj *N. apis* (Kubišová et Hálsbachová, 1998). Dalšími faktory, které ovlivňují propuknutí a intenzitu nákazy jsou např. nevhodná potrava na zimu (medovicové medy), rušení zimního klidu, nepříznivé klimatické podmínky, nevhodné umístění úlů aj. (Kubišová et Hálsbachová, 1998).

Bailey et Ball (1991) prokázali, že by mohlo být do dvou týdnů od počátku nákazy ve včelím střevě nalezeno 30 až 50 miliónů spor. Nemocné včely pak podstatně dříve opouštějí úl a hynou.

Spory nosemy jsou všudypřítomné také ve volné přírodě. Včely kálejí za letu, výkaly ulpí na trávě, ve vodě a velmi často na nekryté napáječce (Hanousek, 1991).

3.2.5 PATOGENITA

Na intenzitu množení *N. apis* má vliv také přirozená rezistence, mladé včely jsou obecně považovány za odolnější. Bylo dokázáno, že i různá plemena včel mají odlišnou odolnost vůči *N. apis* a je možné, že si některé včely vytvořily stejnou rezistenci i vůči *N. ceranae* (Oliver, 2013).

Včela buckfastská je plemeno odolné vůči nosemové nákaze a roztočíku včelímu (akarinóze). Jedná se o kříženec včel britské tmavé a italské, tedy o „umělou rasu“, jak je označuje sám tvůrce Adam Kebrle, mnich z Buckfastského opatství v jižní Anglii, který tyto včely křížil padesát let (Anon 3, 2013). Naproti tomu plemeno *Apis mellifera caucasica* (Kavkazská) je velmi náchylné na vznik nosemové nákazy.

Higes et al. (2006), Martín-Hernández et al. (2007) a Higes et al. (2007) uvádí, že *N. ceranae* se jeví jako vysoce patogenní pro *Apis mellifera*. Vysoká míra úmrtnosti je spojena s přítomností autoinfekčních spor, které umožňují rychlé dělení a invazi do trávící tkáně a ovlivňují regenerační schopnost trávicích buněk (Higes et al., 2007). Poškozená střevní tkáň je následkem sekundární infekce a "úplavice". Hnědé skvrny od průjmu na plástech a v exteriéru úlu jsou charakteristickým znakem infekce *N. apis,* který ale není pozorován při infekcích způsobených *N. ceranae*. Včely infikované *N. apis* se také vyprazdňují uvnitř úlu a kontaminují plásty miliony infekčních spor (Mussen, 2011).

Experimentální infekce *Apis mellifera* vyvolané *N. ceranae* prováděná Higesem et al. (2007) jasně ukázala, že je tento parazit pro svého hostitele vysoce patogenní a představuje vážnou hrozbu pro včelařský průmysl.

3.2.6 PREVALENCE

Nosemóza se vyskytuje u včel po celém světě (Matheson, 1996). K infekci dochází nejčastěji po požití spory v krmivu (Bailey, 1981; Webster, 1993), při trophallaxis (Webster, 1993), nebo při péči o zevnějšek těla (Bulla, 1977; Fries, 1988; Webster, 1993).

Během posledních let se u včel zvýšil výskyt infekcí způsobovaných mikrosporidiemi. Zároveň v zamořených oblastech narostl počet úmrtí včelstev a byla hlášena nižší produkce medu (Martín-Hernández et al., 2007). Jedna z hlavních hypotéz, která by mohla vysvětlit tento problém, je nedávný vstup a rychlé šíření *N. ceranae* v Evropě (Higes et al., 2005). Byla vybrána dvě různá období s pozitivní frekvencí vzorků na *Nosema* spp. V prvním období (1999 až 2002), byl diagnostikován nižší počet pozitivních vzorků v letních měsících, ukazující na sezónnost výskytu *N. apis*. Nicméně, v roce 2003 došlo ke změně v počtu nosema pozitivních vzorků, s nárůstem ve všech měsících, nezávisle na zvýšení počtu vzorků získaných v laboratoři. V roce 2005 již nebyly žádné statisticky významné rozdíly ve frekvenci nosema pozitivních vzorků v jednotlivých měsících nebo sezóně, svědčí to tedy o naprosté absenci sezónnosti v diagnostice mikrosporidiózy (Martín-Hernández et al., 2007). Tabulka 1 ukazuje, že procento pozitivních vzorků zaslaných do laboratoře se zvýšilo z 13 % na 24,7 % během prvních 3 let a v posledním roce až na 95,6 %. Přítomnost spor byla ověřena pomocí kontrastní mikroskopie při 400 násobném zvětšení.

Tabulka 1. Vzorky pozitivní na spory *Nosema* spp. v evropských zemích (Španělsko, Francie, Německo, Švýcarsko)

Rok	Počet vzorků	% Pozitivních
1999	**154**	**13,0**
2000	**124**	**9,7**
2001	**146**	**24,7**
2002	**443**	**23,5**
2003	**484**	**54,5**
2004	**3002**	**89,0**
2005	**1423**	**95,6**

(*vlastní úprava* - Martín-Hernández et al., 2007).

Pomocí multiplex polymerázové řetězové reakce (dále jen PCR) bylo vyšetřováno 290 vzorků z různých evropských zemí na přítomnost mikrosporidií *N. apis* a *N. ceranae*. Celkem 88 vzorků (30,3 %) bylo negativních na oba dva druhy rodu *Nosema* parazitující u včel. Bylo zjištěno, že *N. ceranae* je nejčastějším druhem, byla přítomna v 53,8 % vzorků ze všech sledovaných zemí. *N. apis* byla detekována v 9,3 % zkoumaných vzorků. Smíšené infekce byly zjištěny v 6,6 % vzorků. Oba druhy byly nalezeny ve všech zkoumaných zemích, s různou úrovní prevalence (Martín-Hernández et al., 2007) (tabulka 2).

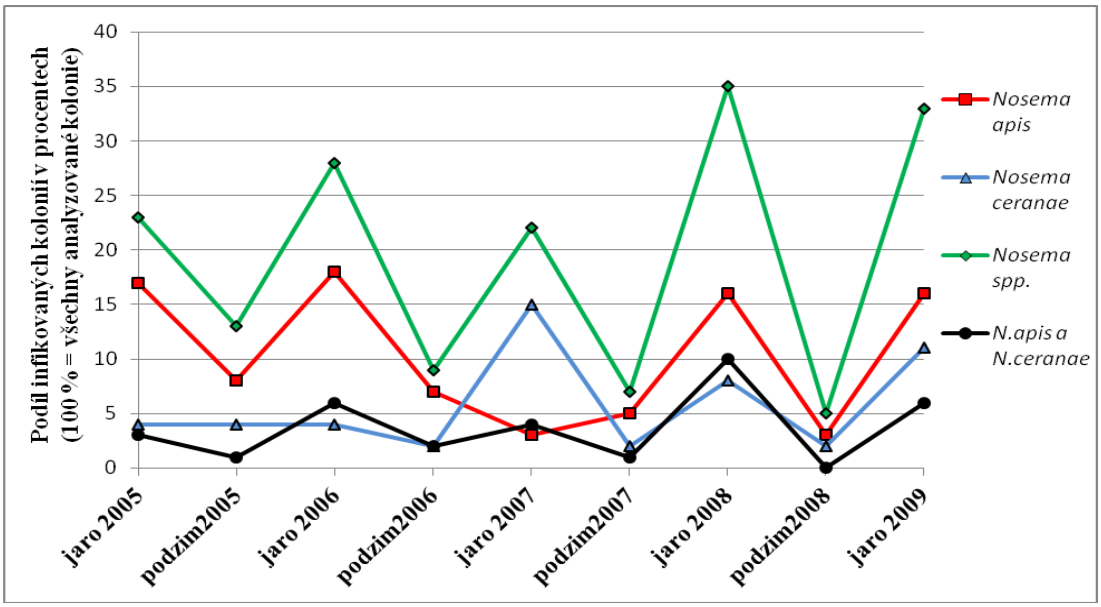
Tabulka 2. Výsledky screeningu *Nosema* spp. metodou multiplex PCR.

Roky	**Stát**	**Počet vzorků celkem**	***Nosema ceranae***		***Nosema apis***		***N. ceranae* a *N. apis***	
			Počet	%	Počet	%	Počet	%
2005–2006	Španělsko	149	52	34,9	21	14,1	11	7,4
2006	Francie	36	27	75,0	0	0,0	6	16,7
2006	Švýcarsko	36	23	63,9	1	2,8	0	0,0
2003, 2005, 2006	Německo	69	54	78,3	5	7,2	2	2,9
Celkem vzorků		290	156	53,8	27	9,3	19	6,6

(*vlastní úprava* - Martín-Hernández et al., 2007).

Výsledky získané v Německu v období od jara roku 2005 do jara 2009 prokazují jasnou sezónnost ve výskytu *N. apis* a *N. ceranae*. V jarních vzorcích byl výskyt spor vždy vyšší než na podzim. Na jaře se podíl pozitivních vzorků pohyboval od 22,4 % do 35,4 % a na podzim 5,2–12,7 % (Gisder et al., 2010), (graf 1). Byl zjištěn vyšší výskyt *N. apis* než *N. ceranae*. Dále byla zjištěna jen nízká prevalence smíšené nákazy.

Graf 1. Prevalence *Nosema* spp. v Německu v letech 2005–2009



(*vlastní úprava* – Gisder et al., 2010)

Výskyt *Nosema* spp. v České republice

Dlouhodobě se u nás v rámci prevence sleduje a kontroluje výskyt nosemózy u chovatelů s komerční produkcí matek (tabulka 3). Celkem bylo vyšetřeno 4 010 včelstev ze 113 lokalit. Prevalence *Nosema* spp. dosahovala 54 % (2167 včelstev), z toho samostatná infekce *N. ceranae* byla zjištěna v 52,3 % případů (1 134 včelstev) a smíšená infekce v 16,4 % případů (356 včelstev). Doposud nebyla *N. ceranae* detekována jako primární patogen, který vede ke kolapsu včelstev v ČR (Kamler et al., 2011).

Tabulka 3. Prevalence *Nosema* spp. zjišťovaná mikroskopickou metodou

Roky	*Nosema apis*	*Nosema ceranae*	*N. apis* a *N. ceranae*
2008–2009	91,3 %	7,6 %	1,1 %
2009–2010	68,5 %	21,9 %	9,6 %
2010–2011	28,4 %	54,1 %	17,1 %

(*vlastní úprava* – Kamler et al., 2011)

3.2.7 DIAGNOSTIKA

Na počátku nejsou příznaky nosemózy na první pohled patrné. V pozdější fázi lze pozorovat neklid včelstva, kdy se včely se zduřelými zadečky pokoušejí dostat z úlu i v zimním období, aby se mohly vykálet nebo přílišné hromadění mrtvolek na dně úlu.

V některých akutních případech nákazy způsobené *N. apis* jsou vidět hnědé fekální značky na plástech a z vnějších stran úlu, s nemocnými či mrtvými včelami v blízkosti úlu. Nicméně, většina kolonie nevykazuje žádné zjevné známky infekce a to i v případě, že nemoc způsobuje významné ztráty v produkci medu a opylovací účinnosti. Během zimy se může zvýšit úmrtnost včel (World Organisation for Animal Health, 2008).

Dalším nejvíce nápadným ukazatelem je oslabení včelstva v důsledku zkrácení života nakažených včel, ke kterému dochází v jarních měsících - dubnu a květnu. Pokud včelstvo není schopno vyrovnat tuto ztrátu novou generací včel, tak umírá (Kubišová et Hálsbachová, 1998).

Také jiná onemocnění včel (např. měňavková nákaza, roztočíková nákaza, průjem) mohou mít podobné příznaky jako nosemóza, proto je nutné podrobnější vyšetření včelstva (Kubišová et Hálsbachová, 1998).

Jako nejméně přesnou, ale nejlevnější metodu při zjišťování výskytu spor *Nosema* spp. se používá vypreparování včelích žaludků a střev a jejich následné prohlížení. Zdravé střevo by mělo mít hnědou nebo bronzovou barvu, naproti tomu, střevo napadené sporami se trhá, je bělavě zbarvené a někdy i zduřelé, bez charakteristických „sevření“.

Mikroskopická diagnostika

Podle Rittera (2006) nelze oba druhy rodu *Nosema*, *N. apis* a *N. ceranae*, od sebe rozeznat obvyklými mikroskopickými rutinními vyšetřeními. Mikroskopická vyšetření se nejčastěji používají k určení přítomnosti nákazy. Pokud je třeba detekovat přesného původce nákazy, je nutné použít molekulární metody.

Naproti tomu Kamler et al. (2011), ve své práci uvádí, že mikroskopický rozdíl *N. apis* a *N. ceranae* je významný a dostačující ke screeningu výskytu *Nosema* spp. v chovech včel.

Při mikroskopickém rozlišení je patrný rozdíl ve velikosti spor obou druhů mikrosporidií. Spory *N. apis* jsou větší (průměrná velikost je 5,8 × 3,3 µm a jsou oválného tvaru) oproti sporám *N. ceranae*, které jsou menší (průměrná velikost 4,6 × 2,5 µm a jsou spíše cylindrického tvaru) (Kamler et al., 2011).

Postup detekce pro mikroskopické vyšetření:

- včelu usmrtit éterem nebo zmrazením
- vypreparovat střevo
- přidat destilovanou voda
- vše rozmělnit v porcelánové nebo skleněné misce
- kapku připraveného roztoku (vzorku) prohlížet mikroskopem při 400 násobném zvětšení

Vyhodnocení intenzity infekce:

- méně než 20 spor – slabá infekce
- 20 – 100 spor střední infekce
- více než 100 spor závažná míra infekce (Anon 4, 2012)

Použití barviva obvykle není nutné.

Pokud si včelař není jistý, jestli je nakažena královna, může provést mikroskopickou kontrolu jejích výkalů. Královna se položí na Petriho misku a nechá se tam asi hodinu, aby se vyprázdnila. Výkaly, které vypadají jako bezbarvá kapalina, prohlížíme mikroskopem.

Molekulární diagnostika

V případě nejasných morfologických znaků pro identifikaci druhu *Nosema* spp. mohou jiné techniky prostřednictvím molekulárních markerů výrazně pomoci v diagnostice a identifikaci mikrosporidií u včel. Technika PCR poskytuje velmi citlivý test pro detekci microsporidiální infekce, umožňuje detekci parazita na velmi nízkých úrovních infekce a může odhalit všechny fáze životního cyklu (Weiss et Vossbrinck, 1999). Jednou z velmi častých molekulárních metod je multiplex PCR

umožňující detekci obou dvou včelích mikrosporidií současně v jediné reakci (Martín-Hernández et al., 2007).

3.2.8 LÉČBA NOSEMÓZY

Při léčbě nosemózy má zvláštní význam dezinfekce zaměřená na prázdné plásty, prázdné úly, medomety, nádoby na med a veškeré včelařské náčiní a pomůcky (Sochlikov et Ignaťjev, 2008).

Při výskytu onemocnění provádíme tzv. ohniskovou dezinfekci. V případě, že jsou včelstva zdravá, stačí preventivní ochranná dezinfekce např. před zazimováním nebo na jaře.

Výpary z roztoku kyseliny octové o minimální koncentraci 60 % inaktivují všechny spory během několika hodin. Při vyšší koncentraci můžeme dosáhnout ještě rychlejších účinků a to do několika minut (Bailey, 1957; de Ruiter et van der Steen, 1989). Po provedení ohniskové dezinfekce kyselinou octovou bychom měli nechat plásty větrat alespoň 14 dní, před dalším použitím v úle.

Správně provedenou dezinfekci dokáže odhalit jen biologická zkouška. K získání vzorků se vezme dezinfikovaný materiál a opláchne se vodou. Ze zachycené tekutiny se koncentrují spory, které se s cukerným roztokem podávají dvou až třídenním mladuškám v odděleném termostatickém inkubátoru. Po uplynutí pěti až sedmi dnů, tedy ukončení vývojového cyklu parazita, hodnotíme úspěšnost dezinfekce. Dezinfekce se považuje za úspěšnou, jestliže se v zorném poli mikroskopu najdou maximálně jedna až tři spory nosemy (Sochlikov et Ignaťjev, 2008).

Jedinou účinnou chemoterapeutickou metodou pro léčbu nosemových infekcí včel je v současné době přidávání fumagillinu do krmení včel (25 mg aktivní složky na 1 litr cukrového roztoku) (Anon 4, 2012).

Fumagillin může potlačit a zabránit infekci plodu, včelích královen i celé zimující kolonie. Aktivní složka fumagillinu je antibiotikum produkované plísní *Aspergillus fumigatus*. Přípravek je aplikován v podzimních měsících, kdy se již lék nemůže dostat do produkce medu. V České republice a ve většině zemí Evropské unie je používání antibiotik zakázáno. Čeští včelaři využívají k léčbě kyselinu mravenčí, ta ničí spory nosem na plástech a stěnách úlu.

3.2.9 PREVENCE VZNIKU NÁKAZY

Podmínkou v boji proti této nemoci je síla včelstva a mladá, zdravá a výkonná matka. Zazimování silných včelstev s nerušeným průběhem zimy je dalším dobrým činitelem. Také pravidelně a často dezinfikovaná napáječka přispěje k zamezení nemoci. Obnova starého díla se stavbou mezistěn přispívá k ozdravení (Hanousek, 1991).

Veliký význam má výměna plástů, zejména na konci zimy nebo začátkem jara, aby se mladé včely znovu nenakazily při čištění úlu. Dlouhověké zimní včely umírají a nově narozené kálejí již mimo úl.

Nosema se snadno šíří pomocí kontaminovaných plástů (World Organisation for Animal Health, 2008). Ve výkalech na plástech si udržují spory životaschopnost až dva roky (Kubišová et Hálsbachová, 1998).

Po výměně plástů se stopami výkalů, nastalo na počátku letní sezony výrazné snížení intenzity onemocnění ve srovnání se včelstvy, kterým plásty vyměněny nebyly (Sochlikov et Ignaťjev, 2008).

Spory zůstávají v suchém prostředí (např. na plástech) životaschopné i několik měsíců. Životnost ztrácejí během několika dnů ve vodě vystavené slunečnímu záření anebo působením tepla a některých fumigantů (Anon 2, 2005).

Ve včelích výkalech mohou spory nosem přežívat až jeden rok. Spory také zůstávají životaschopné až čtyři měsíce po ponoření do medu (White, 1919), a až 4,5 roku v mrtvých tělech nakažených včel (Steche, 1985). Spory mohou ztratit svou životnost po 3 dnech, když jsou ponořené do medu při úlové teplotě (Morgenthaler, 1939). Je pravděpodobné, že fekální kontaminace vosku, zejména plástů k odchovu plodu, nebo i jiných povrchů v interiéru úlu, obsahuje dostatečné množství spor a takto může být přenášena na další generace (World Organisation for Animal Health, 2008).

Úly by měly mít jednak zajištěné dostatečné větrání, ale zároveň musí být chráněné před chladem a vlhkostí. Klimatické podmínky, zejména dostatek slunečního záření, mají veliký význam ve včelařství. Včelíny a úly by neměly být umístěny na severní stranu a na stinná místa. Na umístění úlů jsou vhodné například zvýšené lavice, které brání vlhkosti. Umístění úlů na chladném místě, má za následek slabší rozvoj kolonie. (Anon 1, 2013).

Na podzim se včelí kolonie připraví na zimní období. Včelstvům se nenechávají žádné přebytečné nástavky, snižuje se jejich počet na jeden až dva nástavky. Od počátku podzimu se nenechávají žádné plásty ležet vedle úlů a nepřemisťují se mezi úly. Pokud jsou dodrženy všechny tyto zásady, včelstvo není ve stresu a bude držena nízká úroveň nosemózy (Anon 1, 2013).

4 METODIKA

4.1 PŘEHLED SLEDOVANÝCH CHOVŮ

K hodnocení výskytu a prevalence *Nosema* spp. v Jihočeském kraji byly zkoumány vzorky z lokalit a chovů uvedených v tabulce 4. Vzorky byly odebírány celkem od 17 chovatelů, ze 17 stanovišť.

Tabulka 4. Přehled chovů a vybraných lokalit

Lokalita	Chovy	Počet včelstev na počátku sledování
Chmelná	chovatel č. 1	12
Chmelná	chovatel č. 2	6
Chmelná	chovatel č. 3	3
Chmelná	chovatel č. 4	2
Chmelná	chovatel č. 5	50
Nová Ves	chovatel č. 6	50
Nová Ves	chovatel č. 7	10
Nová Ves	chovatel č. 8	5
Nová Ves	chovatel č. 9	7
Nová Ves	chovatel č. 10	11
České Chalupy	chovatel č. 11	12
České Chalupy	chovatel č. 12	4
Jaronín	chovatel č. 13	4
Jaronín	chovatel č. 14	10
Brloh	chovatel č. 15	65
Brloh	chovatel č. 16	6
Křemže	chovatel č. 17	18
Celkem včelstev		**275**

Všechna včelstva vybraných chovatelů jsou umístěna na jednom stanovišti po celý rok, žádné včelstvo není kočovné.

Všichni včelaři chovají včelu medonosnou Kraňskou (*Apis mellifera carnica*), chovatelé číslo 5, 6, 11 a 15 kmen Singer.

Úly jsou nástavkové, desetirámkové a převážně z dřevěného materiálu. Chovatelé číslo 5, 6, 15 a 17 mají úly polystyrenové s dřevěným podmetem. Včelaři číslo 5, 6, 7, 8, 13 a 15 mají volně postavené úly, ostatní včelaři vlastní včelíny.

Za normálních okolností se ve včelstvu nachází kolem 30–150 mrtvolek. Množství včel se od zazimování na podzim do konce zimy snižuje v průměru asi o jednu třetinu (Rejnič et al., 1987).

Charakteristika jednotlivých chovů

Lokalita Chmelná

	Chov č. 1	**Chov č. 2**	**Chov č. 3**	**Chov č. 4**	**Chov č. 5**
Umístění	včelín	včelín	včelín	včelín	volně
Dezinfekce vybavení	ne	ne	pravidelná	pravidelná	pravidelná
Výměna rámků	ne	ne	částečná	částečná	pravidelná
Počet včelstev:					
- podzim 2011	12	6	3	2	50
- rok 2012	10	2	8	3	54
- jaro 2013	2	0	6	3	54

Lokalita Nová Ves

	Chov č. 6	**Chov č. 7**	**Chov č. 8**	**Chov č. 9**	**Chov č. 10**
Umístění	volně	volně	volně	včelín	včelín
Dezinfekce vybavení	pravidelná	pravidelná	pravidelná	pravidelná	pravidelná
Výměna rámků	pravidelná	částečná	pravidelná	ne	částečná
Počet včelstev:					
- podzim 2011	50	10	5	7	11
- rok 2012	60	?	5	6	12
- jaro 2013	66	8	4	6	12

Lokalita České Chalupy

	Chov č. 11	**Chov č. 12**
Umístění	včelín	včelín
Dezinfekce vybavení	pravidelná	ne
Výměna rámků	pravidelná	ne
Počet včelstev:		
- podzim 2011	12	4
- rok 2012	12	3
- jaro 2013	14	1

Lokalita Jaronín

	Chov č. 13	Chov č. 14
Umístění	volně	včelín
Dezinfekce vybavení	pravidelná	ne
Výměna rámků	částečná	ne
Počet včelstev:		
- podzim 2011	4	10
- rok 2012	4	10
- jaro 2013	4	10

Lokalita Brloh

	Chov č. 15	Chov č. 16
Umístění	volně	včelín
Dezinfekce vybavení	pravidelná	pravidelná
Výměna rámků	pravidelná	pravidelná
Počet včelstev:		
- podzim 2011	65	6
- rok 2012	52	7
- jaro 2013	45	7

Lokalita Křemže

	Chov č. 17
Umístění - čelín/volně	včelín
Dezinfekce vybavení	pravidelná
Výměna rámků	pravidelná
Počet včelstev:	
- podzim 2011	18
- rok 2012	18
- jaro 2013	18

4.2 ODBĚR VZORKŮ

Odběr vzorků probíhal celkem v pěti obdobích. První odběry vzorků se uskutečnily 6. 11. a 4. 12. roku 2011. Aby se zamezilo přílišnému rušení včel

v tomto chladném období, byl zvolen termín shodný s preventivním léčením proti varroáze, kdy byly včely stejně vyrušeny včelařem.

Další termín byl zvolený po prvním jarním proletu včel dne 16. 3. 2012. Následovaly další dva termíny v roce 2012 (28. 10. a 4. 12.) opět v době léčení proti varroáze.

Mrtvé včely byly sbírány ze dna úlu a dávány do sterilních uzavíratelných plastových nádobek. Počet posbíraných včel se pohyboval od 10 do 20 kusů z jednoho včelstva. Následně byly vzorky včel uchovávány v lednici.

Ve vzorcích se nacházely jen dělnice a ojediněle i trubci.

4.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Po vyjmutí z lednice byly jednotlivé včely vypreparovány, byly jim vyjmuty žaludky a střeva, následně uloženy do očíslovaných sterilních 1,5ml mikrozkumavek a opět uchovávány v lednici.

V každé 1,5ml mikrozkumavce se nacházely žaludky a střeva z deseti pitvaných včel daného chovu.

4.4 GENOTYPIZACE

4.4.1 IZOLACE DNA

Celková DNA byla extrahována přímo z včelích žaludků a střev pomocí PSP Spin Stool DNA Kit (Invitek) podle následujícího postupu:

1. Vzorky dát do Safe-Lock-Tube.
2. Přidat 0,5 mm skleněné kuličky a 0,8 ml Lysis Buffer P.
3. Rozbíjet v bead beateru 1 minutu při maximální rychlosti.
4. Inkubovat 10 minut při teplotě 95 °C v termobloku a centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g*.
5. Veškerý supernatant přenést do InviAdsorb-Tube.
6. Vortexovat cca 15 sekund, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě a opět centrifugovat 3 minuty při 14 000 *g*.

7. Veškerý supernatant přenést do čistých 1,5ml mikrozkumavek a centrifugovat 3 minuty při 14 000 *g*.
8. Do čistých 1,5ml mikrozkumavek napipetovat 25 µl Proteinase K, přidat 400 µl supernatantu a vortexovat.
9. Inkubovat při 70 °C po dobu 10 minut v termobloku.
10. Po inkubaci připipetovat 400 µl Binding Buffer P a vortexovat.
11. Supernatant přepipetovat do Spin Filter + Tube a inkubovat přibližně 1 minutu při laboratorní teplotě.
12. Centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g*.
13. Z odpadních mikrozkumavek vylít odpad a napipetovat 500 µl Wash I na kolonu a centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g*.
14. Vylít odpad a napipetovat 800 µl Wash II na kolonu a centrifugovat 1 minutu při 14 000 *g*.
15. Opět vylít odpad a kolonu centrifugovat 3 minuty při 14 000 *g*.
16. Kolonu vložit do čisté 1,5ml mikrozkumanky a napipetovat 200 µl předehřátého Elution Buffer D na kolonu.
17. Následně inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 8000 *g*. Kolonu odstranit a sběrnou mikrozkumavku s vyizolovanou DNA uchovat při -20 °C.

4.4.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Byl použit PCR protokol pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribosomálni podjednotku rRNA (Martín-Hernández et al., 2007) (tabulka 5). Celkový objem reakční směsi pro jednotlivé polymerázové reakce byl 20 µl (tabulka 6).

Chemikálie:

1) **PCR H_2O** (Top-Bio, ČR)
2) **$MgCl_2$** (25 mM, Top-Bio, ČR)
3) **10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu** (Top-Bio, ČR)
4) **deoxyribonukleotid trifosfát** (dNTPs, 10 mM, Top-Bio, ČR)
5) **primery forward a reverse** (10 µM, Generi Biotech, ČR, tabulka 5)
6) **bovinní sérový albumin** (BSA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
7) **Taq polymeráza** (1 U/1 µl)

Tabulka 5. Sekvence primerů pro amplifikaci části genu kódujícího 16S ribosomální podjednotku *N. ceranae* a *N. apis* (Martín-Hernández et al., 2007).

Nosema ceranae	
Primer - **Forward**	5´-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA- 3´
Primer - **Reverse**	5´-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG- 3´
Nosema apis	
Primer - **Forvard**	5´-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA- 3´
Primer - **Reverse**	5´-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACTATG- 3´

Tabulka 6. Reakční směs pro PCR protokol pro amplifikaci části genu kódující 16S ribosomální RNA

	Koncentrace	**Objem (µl)**
H_2O	----------	**14,87**
$MgCl_2$	25 mM	**1,50**
10× pufr	----------	**2,50**
dNTP	10 mM	**0,50**
Forward	10 µl	**0,50**
Reverse	10 µl	**0,50**
BSA	10 mg/ml	**1,00**
Tag	1U/1µl	**0,63**
DNA	----------	**3,00**

Při PCR byl použit amplifikační program, který uvádí tabulka 7. Postup od denaturace po finální extenzi se opakoval ve 35 cyklech.

Tabulka 7. Amplifikační program pro termocycler

Krok	**Teplota**	**Čas**
Počáteční denaturace	94 °C	3 min.
Denaturace	94 °C	45 sec.
Nasedání primerů	62 °C	45 sec.
Dosyntetizování nového řetězce	72 °C	60 sec.
Finální extenze	72 °C	7 min.

4.4.3 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Pomocí gelové elektroforézy byla zjišťována velikost PCR fragmentů. Na 1% agarózovém gelu s přídavkem ethidium-bromidu byl detekován výsledný produkt PCR a následně vizualizován pomocí UV (302 nm).

Chemikálie:

• **50× TAE pufr** (242 g tris báze; 457,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)

• **agaróza** (Biotech, ČR)

• **ethidium-bromid** (Sigma-Aldrich, ČR)

• **100 bp DNA Ladder** (O´Gene RulerTM, Biogen, ČR)

Postup:

1. Smíchat agarózu s 1× TAE pufrem (pro 1% gel smíchat 0,4 g agarózy se 40 ml TAE pufru; pro 2% gel smíchat 0,8 g agarózy se 40 ml TAE).
2. Nechat agarózu rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou přibližně na teplotu 50 °C.
3. Přidat 3 µl ethidium-bromidu a promíchat.
4. Do předem připravené formy nalít gel, vložit hřeben a nechat ztuhnout.
5. Gel vložit do elektroforetické vany naplněné 1× TAE pufrem.
6. Do jamek nanést 1× 10 µl ladderu a 20 µl PCR produktů.
7. Nastavit napětí 70 V a vyvíjet dobu potřebnou pro separaci fragmentů (přibližně 60 minut).
8. Pomocí UV transiluminátoru vizualizovat fragmenty DNA.

4.4.4 EXTRAKCE DNA Z GELU

1. Vyříznout fragment DNA o očekávané velikosti z gelu čistým skalpelem a přenést ho do připravené 1,5ml mikrozkumavky.
2. Do 1,5ml mikrozkumavky s fragmentem DNA v gelu připipetovat 400 µl QG pufru.
3. Inkubovat 10 minut při 50 °C v termobloku, při pravidelném míchání každé 2–3 minuty během inkubace.
4. Přepipetovat veškerý objem na kolonu a centrifugovat 1 minutu při 16 000 *g* (kolona pojme 700 µl).
5. Umístit kolonu na novou mikrozkumavku.
6. Na kolonu připipetovat 500 µl QG pufru a centrifugovat 1 minutu při 16 000 *g*.

7. Umístit kolonu na novou mikrozkumavku.
8. Na kolonu připipetovat 750 µl PE pufru, inkubovat 2–5 minut při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 16 000 *g*.
9. Umístit kolonu na novou mikrozkumavku.
10. Centrifugovat znovu 1 minutu při 16 000 *g*.
11. Kolonu vložit do nové 1,5ml mikrozkumavky a na kolonu napipetovat 200 µl EB pufru (předehřát na 70 °C).
12. Inkubovat 1 minutu a poté centrifugovat 1 minutu při 16 000 *g*.
13. Získanou DNA vysušit v evaporizátoru (Speed Vac) a skladovat při 4 °C.

4.4.5 SEKVENACE

Vybrané PCR produkty byly sekvenovány za použití jednotlivých primerů. K přípravě vzorků k sekvenaci byl použit ABI BigDye® Terminator v 3.1. Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

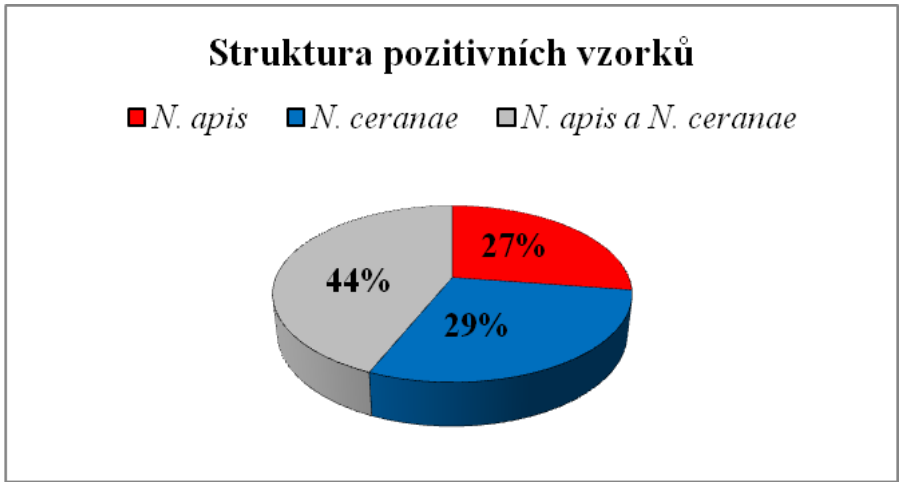
Sekvenační reakce byla zakázkově provedena ve firmě Macrogen. Sekvence byly upraveny pomocí programu ChromasPro (http://www.technelysium.com.au/chromas.html). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí programu ClustalX (ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/).

5 VÝSLEDKY

V letech 2011 až 2012 byly odebrány vzorky včel od 17 chovatelů v pěti intervalech a to na podzim 6. 11. 2011, v zimě 4. 12. 2011, na jaře 16. 3. 2012, na podzim 28. 10. 2012 a v zimě 4. 12. 2012. Celkem bylo vyšetřeno 77 vzorků. Z celkového počtu vyšetřených vzorků bylo 55 (71 %) pozitivních na *Nosema* spp.

Z celkového počtu pozitivních nálezů byl u 15 vzorků (27 %) detekován výskyt pouze *N. apis* a u 16 vzorků (29 %) pouze *N. ceranae*. Ve zbývajících 24 pozitivních vzorcích (44 %) byly přítomny oba druhy jak *N. apis*, tak i *N. ceranae* (graf 2).

Graf 2. Struktura pozitivních nálezů zkoumaných vzorků.



Z následující tabulky 8 je zřejmé, že *Nosema* spp. byla nalezena ve všech včelstvech sledovaných chovatelů. V chovech číslo 1 a 4 byly spory *Nosema* spp. detekovány během všech kontrolních návštěv. Zbývající chovy měly vždy alespoň jedno období bez nálezu.

Tabulka 8. Přehled výskytu obou druhů *Nosema* spp. v jednotlivých chovech podle období odběru vzorků.

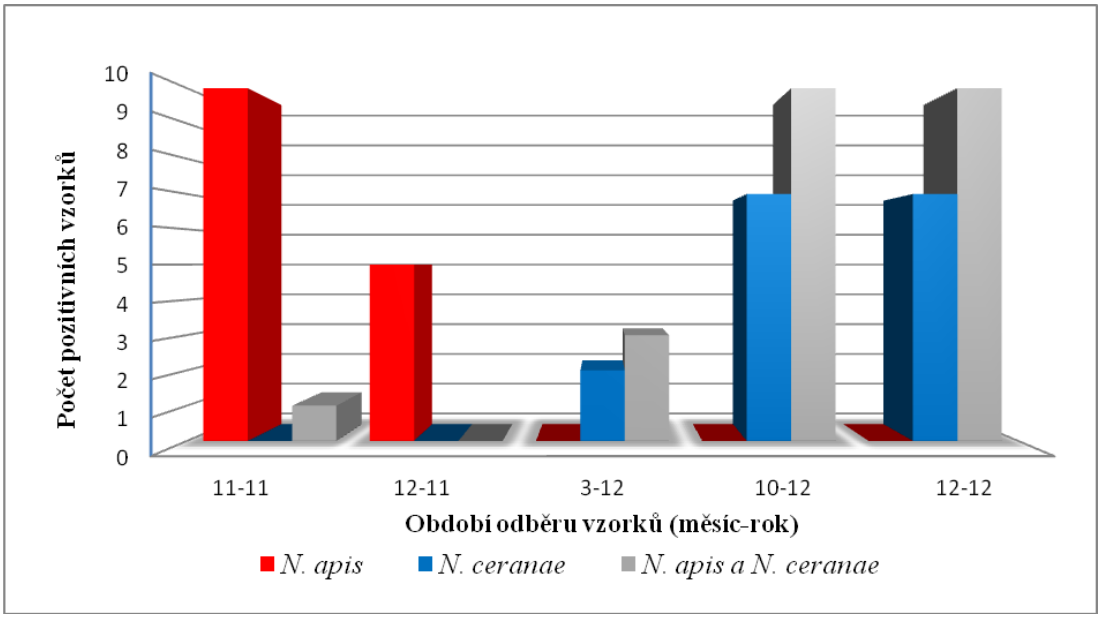
Chovatel číslo	6. 11. 2011	4. 12. 2011	16. 3. 2012	28. 10. 2012	4. 12. 2012
1	*N. apis*	*N. apis*	*N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*
2	*N. apis*	*N. apis*		*N. ceranae*	*N. ceranae*
3	*N. apis*			*N. apis + N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*
4	*N. apis + N. ceranae*	*N. apis*	*N. ceranae*	*N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*
5	*N. apis*	*N. apis*		*N. ceranae*	*N. ceranae*
6	xxx	*N. apis*		*N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*
7	*N. apis*	xxx		*N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*
8	*xxx*			*N. apis + N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*
9	xxx		*N. apis + N. ceranae*	*N. ceranae*	*N. ceranae*
10	*N. apis*		*N. apis + N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*	*N. ceranae*
11	*N. apis*			*N. apis + N. ceranae*	*N. ceranae*
12	*xxx*			*N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*
13	*N. apis*			*N. apis + N. ceranae*	*N. ceranae*
14	*N. apis*			*N. apis + N. ceranae.*	*N. apis + N. ceranae*
15	*xxx*			*N. apis + N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*
16	*N. apis*		*N. apis + N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*	*N. ceranae*
17	xxx			*N. apis + N. ceranae*	*N. apis + N. ceranae*

Legenda: *xxx: vzorky se nepodařilo odebrat*
Prázdná pole: negativní nález

Za pozornost stojí, že v roce 2011 byl až na jednu výjimku zaznamenán výskyt pouze *N. apis*. Rovněž v jednom případě byla detekována *N. cerenae* ve smíšené infekci s *N. apis*. Následující jaro 2012 byl zaznamenán výrazný ústup *N. apis* ve většině pozitivních chovů a zvýšení výskytu *N. ceranae*. Zvyšující se trend výskytu této mikrosporidie byl potvrzen v roce 2012. V tomto roce bylo 23

vzorků pozitivních na oba dva druhy mikrosporidií rodu *Nosema*, přičemž v žádném vzorku se nevyskytoval samostatně druh *N. apis* (tabulka 8, graf 3).

Graf 3. Výskyt spor *N. apis* a *N. ceranae* v jednotlivých zkoumaných obdobích od listopadu 2011 do prosince 2012.



Tabulka 9 uvádí změny počtu včelstev v jednotlivých chovech od podzimu roku 2011 do jara roku 2013. Výrazné ztráty včelstev měli chovatelé číslo 1, 2, 12 a 14. Chovatel číslo 2 během zimy 2012 přišel o všechna svá včelstva.

Tabulka 9. Změny počtu včelstev v jednotlivých chovech od roku 2011 do jara roku 2013. Procentuální hodnoty jsou pouze u chovů, u kterých došlo ke snížení počtu včelstev.

CHOVY	2011 podzim	2012 podzim	Změna (%)	2013 jaro	Změna (%)
chovatel č. 1	12	10	-16,7	2	-83,4
chovatel č. 2	6	2	-66,7	0	-100,0
chovatel č. 3	3	8	+166,6	6	+100,0
chovatel č. 4	2	3	+50,0	3	+50,0
chovatel č. 5	50	54	+8,0	54	+8,0
chovatel č. 6	50	60	+20,0	66	+32,0
chovatel č. 7	10	xxx	xxx	8	-20,0
chovatel č. 8	5	5	0	4	-20,0
chovatel č. 9	7	6	-14,3	6	-14,3
chovatel č. 10	11	12	+9,1	12	+9,1
chovatel č. 11	12	12	0	14	+16,7
chovatel č. 12	4	3	-24,5	1	-75,0
chovatel č. 13	4	4	0	4	0
chovatel č. 14	10	10	0	10	0
chovatel č. 15	65	52	-20,0	45	-30,8
chovatel č. 16	6	7	+16,7	7	+16,7
chovatel č. 17	18	18	0	18	0
	275	**266**	**-96,7**	**260**	**-94,5**

xxx – není znám počet včelstev

6 DISKUZE

Výsledky této práce ukázaly výskyt obou druhů *N. apis* a *N. ceranae* u všech vyšetřovaných včelstev, což je v souladu s posledními výsledky uveřejněnými v rámci evropských zemí (Martín-Hernández et al., 2007; Gisder et al., 2010; Kamler, 2011). Tyto výsledky ukazují na šíření introdukovaného druhu *N. ceranae* v rámci včelstev v Evropě (Nabian et al., 2011; Higes et al., 2005; Martín-Hernández et al., 2007).

Celková prevalence ve zkoumaných chovech byla 71 %, což odpovídá výsledkům z let 2003–2005 publikovaným Martín-Hernándezem et al. (2007), kdy se celková prevalence v evropských zemích (Španělsko, Francie, Německo, Švýcarsko) pohybovala od 54,5 % do 95,6 %. Obdobně Hong et al. (2011) prokázali pomocí molekulárních metod 95% promořenost chovů v Koreji. Naopak nízká prevalence byla zjištěna v letech 1999 až 2000, kdy se pohybovala od 9,7 % do 13 % (Martín-Hernández et al., 2007), což ukazuje na postupné šíření patogenů ve včelstvech v Evropských zemích.

Ve zkoumaných vzorcích byla nejčastěji nalezena smíšená infekce, která dosahovala hodnoty 44 %. Naproti tomu výsledky Martín-Hernándeze et al. (2007), Gisdera et al. (2010) a Kamlera (2011) udávají hodnoty nižší od 1,1 % do 16,7 % a nejvyššího výskytu dosahují *N. apis* nebo *N. ceranae* samostatně. Nicméně tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdílnými klimatickými podmínkami a metodickým rozdíly. Obzvláště v případě výsledků Kemlera (2011), který použil pro odlišení obou dvou druhů morfologii spor, lze uvažovat zkreslení výsledků, zejména pokud jeden druh spor byl ve vzorku přítomen ve výrazně menším množství. Gisder et al. (2010) zjistili v Německu během let 2005–2009 vyšší výskyt *N. apis* než *N. ceranae*. Ve sledovaných chovech této práce byl zjištěn také vyšší výskyt *N. apis* (27 %), ale pouze v roce 2011. V roce 2012 tomu bylo zcela naopak a převládal výskyt *N. ceranae* (29 %), což se shoduje se zjištěními prováděnými v evropských zemích Martínem-Hernándezem et al. (2007). Tyto výsledky mohou ukazovat na postupné promořování chovů *N. ceranae*. Pro potvrzení této hypotézy by bylo zapotřebí provést dlouhodobější sledování.

Souvislost mezi ztrátou včelstev a výskytem *N. ceranae* nebo *N. apis* nelze v rámci této práce prokázat, neboť se detekovaní paraziti vyskytovali i v jiných

chovech, které si počty včelstev dokázaly udržet anebo byly jejich ztráty minimální. Higes et al., (2006) uvádí, že během několika posledních let dochází ke zvyšování počtu infekcí způsobených mikrosporidií *N. ceranae* v evropských zemích, narůstá počet úmrtí včelstev a následně se snižuje produkce medu. Nicméně není zcela jasné, zda je *N. ceranae* jediný činitel tohoto jevu, jelikož byl tento parazit zjištěn i ve zdravých včelstvech (Oldroyd, 2007). Cox-Foster et al. (2007), Higes et al. (2008) a Pajuelo et al. (2008) zjistili, že *N. ceranae* je rozšířená jak ve zdravých, tak i v oslabených včelstvech a její celkový příspěvek ke ztrátám včel je diskutabilní. Nemůžeme tedy posoudit, který parazit má na včelí kolonii větší vliv. Stejný závěr ve své práci uvádí i Gisder et al. (2010), kde údaje jeho analýzy neodhalily souvislost mezi úmrtími v kolonii a detekovanou infekcí *N. apis* a *N. ceranae*.

Obecně se počítá s 5% úhynem včelstev přes zimu (Svoboda et al., 1968). Celková ztráta ve všech sledovaných chovech činila od podzimu 2011 do jara roku 2013 pouze 5,5 %, což lze považovat za normální zimní ztráty.

Nabian et al. (2011), uvádí, že nejvýznamnější rozdíl mezi oběma druhy nosem (*N. apis* a *N. ceranae*) je v tom, jak rychle dokáží způsobit smrt ve včelí kolonii. Včely napadené *N. ceranae* mohou zemřít už 8 dní po nakažení, což je rychlejší průběh než u *N. apis*. Z výsledků této práce je patrné, že zvýšený výskyt *N. apis* v roce 2011 neměl na úbytek včelstev v chovech veliký vliv. V roce 2012 kdy se vyskytovala v chovech jen *N. ceranae* nebo smíšená infekce, nebyly ztráty také výrazné.

Zatímco infekce *N. ceranae* může být ve včelách detekována ve všech čtyřech ročních obdobích (Martín-Hernández et al., 2007; Higes, 2008), infekce způsobená *N. apis* je častější na jaře a na podzim (Bailey, 1955; Doull et Eckert, 1962; Dyes et Wilson, 1978; World Organisation for Animal Health, 2008). Výsledky této práce se shodují s tvrzením, že se *N. apis* vyskytuje na podzim. Ve sledovaných chovech na podzim v roce 2011 byly nalezeny převážně spory *N. apis*, nicméně se tyto výsledky už neshodují s tvrzením, že se vykytuje ve zvýšené míře i na jaře, jelikož z jarních vzorků bylo pouze 5 (ze 17 vzorků) pozitivních. Přítomnost *N. ceranae* ve včelstvech můžeme potvrdit v podzimních, zimních a jarních měsících. V letních měsících nebyly vzorky odebírány, tudíž je nelze posoudit.

Včely infikované *N. apis* se vyprazdňují uvnitř úlu, kontaminují plásty miliony infekčních spor. Následkem silně poškozené střevní tkáně je sekundární infekce, která způsobuje „úplavici“. Můžeme pozorovat hnědé skvrny od průjmu na stěnách úlu nebo na rámkách (Mussen, 2011). Ve sledovaných chovech, se nevyskytoval žádný z těchto příznaků silné nákazy.

Naproti tomu výskyt *N. ceranae* ve včelstvech je spojen s nízkou produkcí medu a zvýšenými zimními ztrátami (Nabian et al., 2011). Předchozí tvrzení nebylo touto prací prokázáno. Včelaři ze sledovaných chovů měli sice nižší produkci medu oproti minulým letům, nicméně to nemuselo být způsobeno pouze *N. ceranae*, ale i špatnými klimatickými podmínkami.

7 ZÁVĚRY

- Pomocí molekulární metody PCR byly detekovány dvě mikrosporidie *N. apis* a *N. ceranae* infikující *Apis mellifera* v chovech v České republice.
- Ve všech sledovaných chovech se vyskytovali oba paraziti jak *N. apis*, tak i *N. ceranae*.
- Celkový výskyt činil 71 % (55 pozitivních vzorků).
- Výsledky naznačují na postupné šíření *N. ceranae* ve včelstvech v ČR.
- Nebyl prokázán jednoznačný vliv sezóny na výskyt *N. apis* nebo *N. ceranae*.
- Nebyl sledován výrazný úhyn včelstev v souvislosti s nosemovou infekcí.

8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

Anon 1 2013. [cit. 2013-03-11] Dostupné z www: http://www.qualitybeekeepingsupplies.com.au/index.php/faqs/24-nosema-disease

Anon 2 2005. [cit. 2013-03-09] Dostupné z www: http://agdev.anr.udel.edu/maarec/wp-content/uploads/2010/03/Diseases_of_Honey_Bees_PM.pdf

Anon 3 2013. [cit. 2013-03-02] Dostupné z www: http://www.jakzacitvcelarit.cz/teorie/plemena-vcel,

Anon 4 2012. [cit. 2012-06-08] Dostupné z www: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/a0849e/a0849e00.pdf

Bailey L. 1955. The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee. Ann. Appl. Biol. 43:379-389.

Bailey L. 1957. Comb fumigation for *Nosema* disease. Am. Bee J. 97:24-26.

Bailey L. 1981. Honey bee pathology. Academic. Press. 124.

Bailey L., Ball B. V. 1991. Honey bee pathology. Vol. 2nd. Academic. Press 193.

Becnel J. J., Andreadis T. G. 1999. Microsporidia in insect. p. 447-501. In: Wittner M., Weiss L. M.. (eds.). The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press.

Bhat S., Bashir I., Kamili A. 2009. Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera-Bombycidae): a review. Afr. J. Agric. Res. 4:1519-1523.

Bigliardi E., Sacchi L. 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. Microbes. Infect. 3:373-379.

Bulla 1977. In: Comparative Pathobiology. Vol. 1. Biology of Microsporidia (1976); Vol. 2. Systematics of the Microsporidia, Lee A., Cheng T. C., (eds.). Plenum. Press.

Burges H. D., Canning E. U., Hulls J. K. 1974. Ultrastructure of *Nosema oryzaephili* and the taxonomic value of the polar filament. J. Invert. Pathol. 23:135-39.

Bush A. O., Fernández J. C., Esch G. W., Seed J. R. 2001. Parasitism: the diversity and ekology of animal parasites. Cam. Univ. Press. 1:566.

Cantwell G. E., Shimanuki H. 1970. The use of heat to control *Nosema* and increase production for the commercial beekeeper. Am. Bee J. 110:263.

Cox-Foster D. L., Conlan S., Holmes E., Palacios G., Evans J. D., Moran N. A., Quan P. L., Briese T., Hornig M., Geiser D. M., Martinson V., van Engelsdorp D., Kalkseitn A. L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchinson S. K., Simons J. F., Egholm M., Pettis J. S., Lipkin W. I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science. 318:283-287.

de Ruiter A., van der Steen J. 1989. Disinfection of combs by means of acetic acid (96%) against *Nosema*. Apidologie. 20:503-506.

Doull K. M., Eckert J. E. 1962. A survey of the incidence of *Nosema* disease in California. J. Econ. Entomol. 3:313-317.

Dyes E. G., Wilson C. A. 1978. A study of the seasonal variations of *Nosema apis* Zander of honey bees in Mississippi. Am. Bee J. 118:33-35.

Fenoy S., Rueda C., Higes M., Martín-Hernandez R., del Aquila C. 2009. High-level resistence of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. Appl. Environ. Microbiol. 75:6886-6889.

Fries I. 1988. Contribution to the study of *Nosema* disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Rapport 166, Sveriges Landbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och värd, Uppsala, Sweden.

Fries I., Feng F. 1995. Cross infectivity of *Nosema apis* in *Apis mellifera* and *Apis cerana*, p. 151-155. In: Proceedings of the 34th International Apicultural Congress. Apimondia.

Fries I., Feng F., da Silva A., Slemenda S. B., Pieniazek J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32:356-365.

Gisder S., Hedtke K., Möckel N., Frielitz M. CH., Linde A., Genersch E. 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? Appl. Environ. Microbiol. 76:3032-3038.

Hanousek L. 1991. Začínáme včelařit, Praha, nakladatelství Brázda, s. 109.

Hassanein M. H. 1951. Studies of the effect of infektion with *Nosema apis* on the physiology of the queen honey-bee. Q. J. Microsc. Sci. 92:225-231.

Higes M., Martin R., Sanz A., Avarez N., Garcia M. P., Meana A. 2005. El síndrome de despoblamiento de las colmenas en Espaňa. Consideraciones sobre su origen. Vida Apicola. 133:15-21.

Higes M., Matin R., Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. J. Invert. Pathol. 92:93-95.

Higes M., Garcia-Palencia P., Martin-Hernandez R., Meana A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J. Invert. Pathol. 94:211-217.

Higes M., Martin-Hernandez R., Botías C., Garrido-Bailon E., Gonzalez-Porto A. V., Barrios L., del Nozal M., Bernal J. L., Jiménez J. J., Palencia G. P., Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environ. Microbiol. 10:2659-2669.

Hong I. P., Woo S. O., Choi Y. S., Han S. M., Kim N. S., Kim H. K., Han S. H., Lee M. Y., Lee M. L., Byeon K. H. 2011. Prevalece of *Nosema* and virus in

honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies on flowering period of Acacia in Korea. Mycobiology. 39:317-320.

Chen Y. P., Evans J. D., Smith I. B., Pettis J. S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. J. Invert. Pathol. 97:186-188.

Chen Y. P., Evansa J. D., Murphyb C., Gutellc R., Zukerd M., Gundensen-Rindale D., Pettisa J. S. 2009. 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.

Chioralia G., Trammer T., Maier W. A., Seitz H. M. 1997. Morphologic changes in *Nosema algerae* (Microspora) during extrusion. Parasitol. Res. 84:123-131.

Kamler et al. 2011. [cit. 2013-02-15] Dostupné z www: http://eagri.cz/public/web/file/142451/Zaver_zprava_Nosema_2011_final.pdf,

Keeling P. J., Luker M. A., Palmer J. D. 2000. Evidence from β - tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. Mol. Biol. Evol. 17:23-31.

Keeling P. J. 2003. Congruent evidence from alpha-tubulin and betatubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. Fungal. Genet. Biol. 38:298-309.

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. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J. Invert. Pathol. 96:1-10.

Kubišová S., Hálsbachová H., 1998. Včelařství, Brno, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, s. 86.

Lom J. 1972. On the structure of the extruded microsporidian polar filament. Parasitol. Res. 38:200-213.

Malone L. A., Gatehouse H. S., Tregidga E. L. 2001. Effects of time, temperature, and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a parasite of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). J. Invert. Pathol. 77:258-268.

Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A. M., Garrido-Bailón E., Higes M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl. Environ. Microbiol. 73:6331-6338.

Martín-Hernández R., Meana A., García-Palencia P., Marín P., Botías C., Garrido-Bailón E., Barrios L., Higes M. 2009. Effect of temperatureon the biotic potential of honeybee microsporidia. Appl. Environ. Microbiol. 75:2554-2557

Matheson A. 1996. World bee health update. Bee World. 77:45-51.

Mathis A., Weber R., Deplazes P. 2005. Zoonotic Potential of the Microsporidia. Clin. Microbiol. Rev. 18:423-445.

Morgenthaler D. 1939. Die ansteckende Frühjahrsschwindsucht (*Nosema*-Amoeben-Infection) der Biene. Erweiterter Sonderdruck aus der Schweizerischen Bienenzeitung Heft 2. 3 und 4.

Mussen E. C. 2011. [cit. 2013-03-10] Dostupné z www: http://entomology.ucdavis.edu/files/147621.pdf

Nabian S., Ahmadi K., Nazem Shirazi M. H., Gerami Sadeghian A. 2011. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian protozoa of European honeybees (*Apis mellifera*) in Iran. Iranian J. Parasitol. 6:89-95.

Oldroyd B. P. 2007. What's killing American honey bees? PLoS Biol. 5:1195-1199.

Oliver R. 2013. [cit. 2013-03-11] Dostupné z www: http://scientificbeekeeping.com/the-nosema-twins-part-1-2/,

Pajuelo A. G., Torres C., Orantes Bermejo F. J. 2008. Colony losses: A double blind trial on the influence of supplementary protein nutrition and preventative treatment with fumagillin against *Nosema ceranae*. J. Apicult. Res. 47:84-86.

Rejnič J., Haragsim O., Rekoš J. 1987. Včelařství. Institut výchovy a vzdělání MZVž ČSR – Praha, s. 143

Rezaian M., Krake L. 1987. Nucleic acid extraction and virus detection in grapevine. J. Virol. Methods. 17:277-285.

Rice R. 2001. Nosema diseases in honeybees. Genetic variation and control. RIRDC 1/46. Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, Australia.

Ritter W. 2006. *Nosema ceranae*. Odborné včelařské překlady 2006. In: Bienenvater č. 7/8:25- 27.

Rostand K. S., Esko J. D. 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. Infect. Immun. 65:1-8.

Singh, Y. 1975. *Nosema* in Indian honey bee (*Apis cerana indica*). Am. Bee J. 115:59.

Smith M. L. 2012. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? PLoS One. 7:e43319

Sochlikov A. B., Ignať jev P. S. 2008. Laserová interferenční mikroskopie při nosemóze. Odborné včelařské překlady 2008. In: Pčelovodstvo. 8:25-26.

Sprague V. 1978. Characterization and composition of the genus *Nosema*. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 11:5-16.

Steche W. 1985. Revision of Zander and Bottcher. Nosematose. In: Böttcher F.K., Kaeser W., Steche W., Zander E. 1984. Krankheiten der Biene, Handbuch der Bienenkunde. Ulmer (Eugen) Germany.

Svoboda J., Haragsimová L., Hanko J., Haragsim O. 1968. Nemoci a škůdci včely medonosné. Praha. Státní zemědělské nakladatelství, s. 47.

Tay W. T., O´Mahony E. M., Paxton J. R. 2005. Complete rRNA gene sequence reveals that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumble bee

(*Bombus* spp.) hosts yet contains multiple polymorphic sites. J. Eukaryot. Microbiol. 52:505-513.

Webster T. C. 1993. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. Am. Bee J. 133:869-870.

Weidner E., Byrd W. 1982. The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. J. Cell Biol. 93:970-975.

Weiser J. 1961. Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten. Monogr. Angew Entomol. 17:1-149.

Weiss L. M., Vossbrinck C. R. 1999. Molecular biology, molecular phylogeny and molecular diagnostic approaches to the microsporidia, p. 129-171. In: Witner M. and Weiss L. M. (eds.), The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press. p. 553.

White G. F. 1919. *Nosema* Disease. U. S. Dept. Agricl. 780:1-59.

Williams B. A. P., Hirt R. P., Lucocq J. M., Embley T. M. 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian Trachipleistophora hominis. Nature. 418:865-869.

World Organisation for Animal Healt 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (terrestrial manual), 6th ed., p. 410-414, World Organisation for Animal Health. [cit. 2013-02-11] Dostupné z www: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf.

Xu Y., Takvorian P., Cali A., Wang F., Zhang H., et al. 2006. Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi*. Infect. Immun. 74:239-247.

Xu Y., Weiss L. M. 2005. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. Int. J. Parasitol. 35:941-953.

Zander E. 1909. Tierische parasiten als krankenheitserreger bei der biene. Münchener Bienenzeitung. 31:196-204.