

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vyšetření mikrosporidií *Nosema* spp. v dělnicích včely
medonosné (*Apis mellifera*)**

Diplomová práce

Bc. Daniela Malátová

Zájmové chovy zvířat

Vedoucí práce: Ing. Dalibor Titěra, CSc.

Konzultant: MVDr. Martin Kamler

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vyšetření mikrosporidií *Nosema* spp. v dělnicích včely medonosné (*Apis mellifera*)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího a konzultanta diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce Ing. Daliboru Titěrovi, CSc. za vstřícný přístup a poskytnuté rady. Nemalé poděkování patří také MVDr. Martinu Kamlerovi za veškerou odbornou pomoc, podporu a předání cenných znalostí a zkušeností.

Vyšetření mikrosporidií *Nosema* spp. v dělnicích včely medonosné (*Apis mellifera*)

Souhrn

Nosemóza je nebezpečné, celosvětově rozšířené onemocnění včel medonosných *Apis mellifera*, jehož původci jsou dva druhy rodu *Nosema*, *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Dlouhodobé působení těchto patogenů ohrožuje život včelstev. Cílem této diplomové práce bylo praktické vyhodnocení vhodnosti vzorkování a vyšetření včely medonosné na přítomnost původce nose mózy včel.

Z každého včelstva byly odebrány dva typy vzorků: zimní mrtvolky ze dna úlu a živé dělnice z okrajových plástů, vždy po 30 jedincích. Výsledky mikroskopického vyšetření těchto dvou typů vzorků se poté vzájemně porovnávaly. Celkem bylo vyšetřeno 207 včelstev, z toho u 72 včelstev byly včely vyšetřovány jednotlivě a u 135 včelstev byl použit směsný vzorek. Při individuálním vyšetření včel se relativní počet pozitivních jedinců v případě zimních mrtvolek a živých včel významně lišil. Ze směsných vzorků bylo potvrzeno, že výsledek vyšetření velmi významně závisí na typu použitého vzorku. V obou případech vycházela vyšší pozitivita při vyšetření zimních mrtvolek. Při hodnocení získaných dat ze všech včelstev vyšel shodný výsledek v 62 % a rozdílný ve 38 % vzorků. Ve 34 % případů byl pozitivní pouze vzorek zimních mrtvolek a ve 4 % vyšla pozitivita pouze u živých včel.

Výsledky pokusu diplomové práce ukazují, že použití zimních mrtvolek nebo živých včel je důležitým faktorem, který ovlivňuje výsledek vyšetření včelstev na přítomnost původce nose mózy. Vyšší míra positivity je zjištěna při vyšetření zimních mrtvolek, tento výsledek ale neposkytuje příliš přesný obraz o aktuální úrovni infekce u živých včel ve včelstvu.

Výsledky diplomové práce jsou užitečné nejen pro upřesnění metodik plemenářské práce Uzaného chovatelského sdružení včely medonosné kraňské, ale i pro včelařskou praxi vůbec.

Klíčová slova: včela medonosná, *Apis mellifera*, endoparazit, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, diagnostika

Analysis od microsporidia *Nosema* spp. in workers of honey bee (*Apis mellifera*)

Summary

Nosemosis is a dangerous, worldwide disease of the Western honey bees *Apis mellifera*, caused by two species of the genus *Nosema*: *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Long-term exposure to these pathogens threatens the life of honey bee colonies. The aim of this thesis was to evaluate practically the suitability of sampling and testing honey bees for the presence of the causative agent of nosemosis in honey bees.

Two samples were taken from each colony, winter dead bees from the bottom of the hive and live workers from the peripheral frames, 30 bees in each sample. The results of microscopic examination of these two types of samples were then compared with each other. A total of 207 colonies were examined, of which 72 colonies were examined as individual bees and 135 colonies were examined using a pooled sample. When the bees were tested individually, the relative number of positive individuals was significantly different between winter dead and live bees. From the mixed samples, it was confirmed that the result of the examination depended highly significantly on the type of the used sample. In both cases, the positivity was higher in the case of winter dead bees. When evaluating the data collected from all colonies, the result was the same in 62 % of the samples and different in 38 %. In 34 % of cases, only the sample of winter dead bees was positive and in 4 % of cases only the live bees were positive.

The results of the thesis experiment show that the use of winter dead or live bees is an important factor influencing the outcome of the examination of colonies for the presence of the pathogen of nosemosis. A higher positivity level is observed when testing winter dead bees, but this result does not give a very accurate picture of the current level of infection of living bees in the colony.

The results of the thesis are useful not only for specifying breeding methods of the Recognized breeding association of Carniolan honey bee, but also for beekeeping practice in general.

Keywords: honey bee, *Apis mellifera*, endoparasite, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, diagnostics

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Včela medonosná a její patogeny.....	10
3.2 <i>Nosema apis</i>, <i>Nosema ceranae</i>	12
3.2.1 Historie	12
3.2.2 Morfologické rozdíly	13
3.2.3 Vývojový cyklus	13
3.2.4 Průběh infekce	14
3.2.5 Smíšené infekce	15
3.2.6 Infikovaní jedinci.....	16
3.2.7 Vliv infekce	16
3.3 Diagnostika	19
3.3.1 Vzorky	19
3.3.2 Laboratorní metody	20
3.3.3 Světelná mikroskopie.....	21
3.3.4 Molekulární detekce	21
3.4 Zásahy proti nose móze	23
3.4.1 Chemická léčba.....	23
3.4.2 Přírodní produkty	23
3.4.3 Zootechnická opatření.....	24
3.4.4 Šlechtění <i>Nosema</i> rezistentních včel.....	25
4 Materiál a metody	26
4.1 Přehled stanovišť.....	26
4.2 Odběr vzorků.....	26
4.3 Příprava preparátu pro individuální vyšetření.....	28
4.4 Příprava směšného vzorku	28
4.5 Mikroskopické vyšetření	29
4.6 Statistické vyhodnocení	29
5 Výsledky.....	30
5.1 Individuální vyšetření.....	30
5.1.1 Stanoviště č. 1 (Lobeč)	31
5.1.2 Stanoviště č. 2 (Postřížín)	32
5.1.3 Stanoviště č. 3 (Jasánky).....	33
5.1.4 Stanoviště č. 4 (Zlončice)	34

5.2	Směsné vzorky	35
5.2.1	Stanoviště č. 5 (Zámek Veltrusy)	36
5.2.2	Stanoviště č. 6 (Neuměřice)	36
5.2.3	Stanoviště č. 7 (Palpost).....	37
5.2.4	Stanoviště č. 8 (Hoštice)	37
5.2.5	Stanoviště č. 9 (Malá Bučina).....	38
5.2.6	Výsledky všech směsných vzorků	38
5.3	Celkové shrnutí výsledků vyšetření.....	39
5.3.1	Vyhodnocení výsledků všech vyšetřených včelstev	39
5.3.2	Prevalence na jednotlivých stanovištích	40
6	Diskuse	41
7	Závěr	43
8	Literatura.....	44

1 Úvod

Včela medonosná *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 je nedílnou součástí ekosystému (Papa et al. 2022). Je považována za nejdůležitější druh opylovače zemědělských plodin (Joseph et al. 2020) i planých rostlin v mnoha oblastech světa, a to díky svému velkému areálu rozšíření i schopnosti využívat a opylovat širokou škálu rostlinných druhů (Hung et al. 2018). Je také jediným hmyzím druhem, který člověku poskytuje jak zdroj potravy, tedy med, tak i několik dalších užitečných produktů jako je vosk, pyl, propolis, mateří kašička a včelí jed. Ty se následně využívají v různých odvětvích lidské činnosti např. v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu či lékařství (Papa et al. 2022). Pro včelařské účely byla včela medonosná postupně dovezena na všechny kontinenty kromě Antarktidy a stojí za produkcí převážné většiny medu na celém světě (Fries 2014).

Dlouhodobé působení roztočů, špatné výživy, pesticidů a patogenních mikroorganismů ohrožuje život včelstev (Goblirsch et al. 2013). Jedním takovým onemocněním, které je pro včely nebezpečné, je nose móza. Jedná se o celosvětově rozšířenou infekci způsobenou mikrosporidii *Nosema apis* Zander, 1909 a *Nosema ceranae* Fries et al., 1996. V současné době je více rozšířená *N. ceranae* (Mazur & Gajda 2022), která je v oblasti zdraví včel velmi aktuálním tématem, o čemž svědčí řada každoročně publikovaných vědeckých prací (Martín-Hernández et al. 2018).

Pro sledování onemocnění a zahájení správné léčby je zásadní provést rychlou a spolehlivou diagnózu (Mazur & Gajda 2022). V České republice je vyšetření na nose mózu povinné pro chovatele včelích matek Uzaného chovatelského sdružení včely medonosné kraňské. Vzorky zimních mrtvolek, případně živých včel létavek je nutné odebrat v průběhu podzimu nebo zimy (Český svaz včelařů z.s. 2019). Uhynulé včely nejsou obecně pro vyšetření doporučovány, v našich zeměpisných podmínkách však není možné v tuto dobu odchytávat létavky z česna, které jsou nejvhodnějším vzorkem (Fries et al. 2013).

V této práci jsem se zaměřila na praktické vyhodnocení vhodnosti vzorkování včel pro jejich vyšetření na přítomnost původce nose mózy s ohledem na metodiku používanou v laboratořích v ČR.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce bylo praktické vyhodnocení vhodnosti vzorkování a vyšetření včely medonosné na přítomnost původce nose mózy včel. Mikroskopicky se vyšetřovaly vzorky dělnic zimních mrtvolek a živých včel na přítomnost spor *Nosema* spp. Výsledky se porovnávaly a statisticky vyhodnotily.

Hypotéza č. 1:

Relativní počet jedinců s pozitivním nálezem spor *Nosema* je stejný v případě vyšetření živých a mrtvých včel ze stejného včelstva v zimním období.

Hypotéza č. 2:

Výsledek vyšetření směsných vzorků živých včel a zimních mrtvolek ze stejného včelstva na přítomnost spor *Nosema* je shodný.

3 Literární řešerše

3.1 Včela medonosná a její patogeny

Včelstvo *Apis mellifera* obvykle tvoří jedna matka, 20 až 40 tisíc dělnic a v závislosti na ročním období až několik tisíc trubců (Page & Peng 2001). Dělnice vylíhnuté od konce zimy do léta jsou krátkověké, v případě jarních včel je průměrná délka života 30 až 40 dní, nejkratší délku života mají letní včely, zpravidla pouze 25 až 30 dní. Zimní včely, tedy dělnice přežívající nejchladnější měsíce roku, se líhnou na podzim a oproti ostatním je v jejich případě délka života významně delší, obvykle přesahuje 100 dní, maximum se pohybuje až okolo 250 dní (Mattila et al. 2001). Ze všech jedinců nejdéle, tedy 2 až 3 roky, žije matka (Page & Peng 2001). Včely se řadí mezi hmyz s proměnou dokonalou, mají tedy 4 vývojová stádia (vajíčko, larva, kukla a dospělec). Dělnice i matky se líhnou z oplozených vajíček se stejným genotypem (Wang et al. 2015), rozdílné je ale prostředí pro jejich odchov a především výživa. Délka larválního stádia je 5 až 6 dní, poslední 2 až 3 dny rozdílného krmení vedou k odlišnému vývoji v dělnici anebo matku (Page & Peng 2001). Larvy matek jsou po celou dobu krmeny výhradně mateří kašičkou, zatímco larvy dělnic jsou od třetího dne krmeny speciální směsí mateří kašičky, medu a pylu. Matky jsou chovány ve speciálně konstruovaných matečních buňkách, dělnice se vyvíjejí ve stejných buňkách, jako jsou skladovány zásoby medu a pylu (Yadav et al. 2017). Vývoj od vajíčka v dospělce trvá v případě matky 16 dní, u dělnice 21 dní (Wang et al. 2015). Z neoplozených vajíček se líhnou trubci, kteří se vyvíjejí v buňkách se stejným tvarem jako v případě dělnic, pouze jsou větší (Yadav et al. 2017). Jejich vývoj trvá 24 dní, ze všech kast je tedy nejdelší (Sidor & Džugan 2020). Včela medonosná se řadí mezi eusociální hmyz, pro který je charakteristická dělba práce ve společenstvu. Úkolem sterilních dělnic je podpořit svou činností reprodukci jednoho jedince, matky (Breed et al. 2015). Mladé dělnice pečují o matku a plod, starší dělnice shánějí pyl, nektar, vodu a chrání úl (Sammataro et al. 2000).

Na včelstva působí řada faktorů, které narušují a oslabují obranné mechanismy včel. Mezi ně patří patogeny (Taric et al. 2019), jejichž působením může dojít v konečném důsledku až k úhynu včelstva (Hristov et al. 2020). Sociální společenstvo je díky vysoké hustotě a homogenitě jedinců (Schmid-Hempel 1995), jejich vzájemným interakcím a blízkému kontaktu obzvláště zranitelné (Naug & Camazine 2002). Dělnice svou činností navíc udržují v hnízdě téměř konstantní teplotu a vlhkost navzdory vnějším podmínkám, což pro patogeny činí z úlu ještě vhodnější prostředí (Sammataro et al. 2000). Na druhou stranu vysoce vyvinutá sociální organizace umožnila vznik sociální imunity, pro kterou je typické altruistické chování jedinců

a jejich vzájemná spolupráce. Výsledkem je zamezení, kontrola nebo eliminace infekce (Cremer et al. 2007).

Včely medonosné mohou být napadeny různými škůdci a chorobami, včetně parazitických roztočů, virů, mikrosporidií, bakteriálních infekcí a plísní. Mezi ekonomicky významné parazity se řadí druhy kleštík včelí *Varroa destructor*, roztočík včelí *Acarapis woodi*, *Varroa jacobsoni* a *Tropilaelaps clareae* (Dhooria 2016). V současné době je se včelou medonosnou spojováno přibližně 24 druhů patogenních virů, tento počet však nejspíše nebude konečný (Gisder & Genersch 2015). Virové infekce byly dříve považovány za neškodné, po celosvětovém rozšíření kleštíka včelího však včelaři začali zaznamenávat rostoucí obtíže s chovem včelstev. Tento roztoč totiž také působí jako šířitel různých virů uvnitř i mezi včelstvy a také jako aktivátor množení některých virů v infikovaných jedincích (Genersch & Aubert 2010). Je s ním spojován například virus deformovaných křídel (DWV) či virus akutní paralýzy včel (ABPV). Dále se u včel často vyskytuje virus chronické paralýzy včel (CBPV), virus pytlíčkovitosti plodu (SBV) a virus černání matečnic (BQCV) (Hristov et al. 2020). Mezi nejznámější bakteriální nemoci patří mor a hniloba včelího plodu. Obě tyto infekce postihují larvální stádia (Gaggia et al. 2015) a způsobují jejich smrt. Původcem moru včelího plodu je *Paenibacillus larvae*, v případě hniloby včelího plodu *Melissococcus plutonius* (Fuenfhaus et al. 2018).

3.2 *Nosema apis*, *Nosema ceranae*

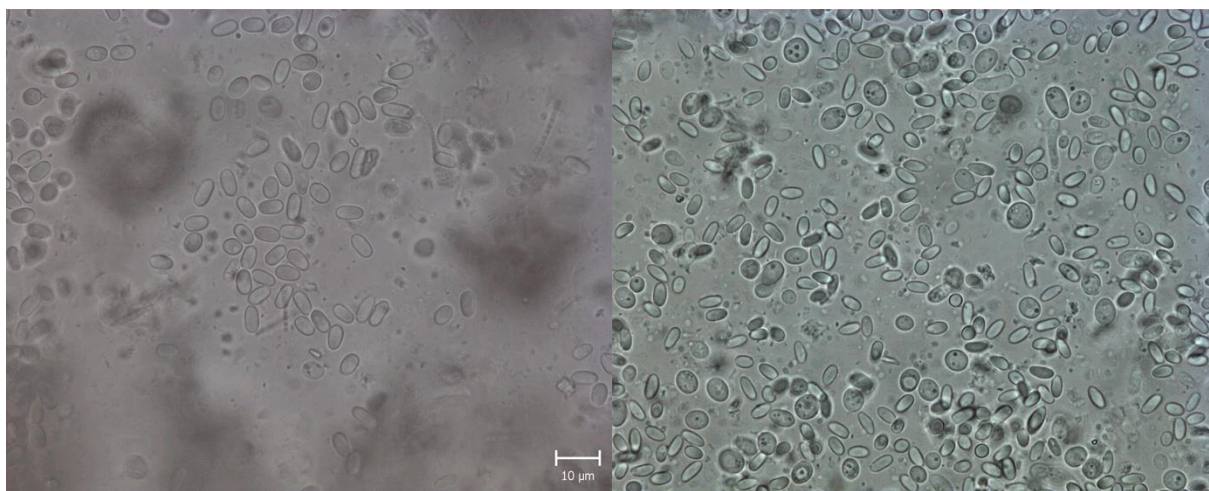
Nosemóza je nebezpečné, celosvětově rozšířené onemocnění včel medonosných (*Apis mellifera*), jehož původci jsou dva druhy rodu *Nosema*, *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Mazur & Gajda 2022). V roce 2017 byl na území Ugandy objeven třetí druh, *Nosema neumanni* Chemurot et al. 2017 (Chemurot et al. 2017), jeho vliv na zdraví včel je však třeba ještě detailně prozkoumat (Duquesne et al. 2021), rozšíření mimo hranice zatím ale nebylo potvrzeno (Mazur & Gajda 2022). Rod *Nosema* se řadí do třídy Microsporidia, říše Fungi (Adl et al. 2005). V nedávné době však Tokarev et al. (2020) zařadil druhy *Nosema*, které napadají včely, do nového rodu *Vairimorpha*. Tito nitrobuněční parazité napadají epitelové buňky žaludku dospělých jedinců (Forsgren & Fries 2010).

3.2.1 Historie

Nosema apis byla objevena u evropské včely medonosné a je jednou z prvních popsáných mikrosporidií vůbec (Fries et al. 2006). *N. ceranae* jako první popsal Fries et al. (1996) na základě světelně mikroskopických a ultrastrukturálních charakteristik u včely východní *Apis cerana* Fabricius, 1793 v Číně. Dříve byla *N. ceranae* považována za parazita omezeného na asijskou včelu medonosnou (Forsgren & Fries 2010), později bylo potvrzeno, že oba druhy *Nosema* křížově infikují druhého hostitele (Sinpoo et al. 2018). První přirozený výskyt u evropské včely medonosné byl potvrzen v roce 2005, konkrétně u vzorků odebraných na území Španělska (Higes et al. 2006). Archivované vzorky však naznačují, že měla rozšířený geografický a hostitelský areál již desítky let předtím (Goblirsch 2018) a je pravděpodobné, že po desetiletí byla nesprávně diagnostikována jako *N. apis* (Ferroglio et al. 2013). Při analýze historických vzorků byla *N. ceranae* potvrzena na území Finska od roku 1998 (Paxton et al. 2007), na území Itálie ještě o pět let dříve, tedy od roku 1993 (Ferroglio et al. 2013). Tato zjištění podporují hypotézu, že *N. ceranae* byla nejprve zavlečena do jižní Evropy, odkud se poté šířila do dalších částí. Její rychlé šíření na velké vzdálenosti bylo pravděpodobně způsobeno přepravou nakažených včel komerčními nebo zájmovými včelaři (Klee et al. 2007). V České republice byla *N. ceranae* poprvé diagnostikována v roce 2008 (Ryba et al. 2012). Ačkoliv není jisté, kdy přesně se *N. ceranae* objevila poprvé jako patogen *A. mellifera*, je možné, že se to časově shoduje s rozšířením roztoče *Varroa destructor*, kdy došlo k přesunům včelstev *A. mellifera* do oblastí, kde se přirozeně vyskytovala *A. cerana* a zpět. Vzájemná interakce mezi včelími druhy mohla vést také k předání a rozšíření *N. ceranae* (Goblirsch 2018).

3.2.2 Morfologické rozdíly

Přestože rozdíly ve velikosti spor mezi *N. ceranae* a *N. apis* nejsou při světelné mikroskopii okamžitě patrné, je možné je při detailnějším zkoumání pozorovat (viz Obrázek 1). Spory *N. ceranae* jsou ve srovnání s *N. apis* o něco menší (Fries et al. 1996). Konkrétně spory *N. ceranae* jsou velké $4.5 \times 2.4 \mu\text{m}$ (Huang et al. 2007), zatímco spory *N. apis* měří $6 \times 3 \mu\text{m}$ (Fries et al. 1996). Dalším rozlišovacím faktorem je jejich tvar, v případě *N. ceranae* pozorujeme špičatější spory, u *N. apis* jsou konce více zaoblené (Titěra 2017). Ultrastrukturálně se odlišují také v počtu závitů polárního vlákna uvnitř spor. U *N. ceranae* jich můžeme pozorovat 18-21 (Chen et al. 2009), u *N. apis* je jejich počet vyšší a to 26-32 (Fries 1989). Při pozorování spor rastrovacím elektronovým mikroskopem si lze všimnout odlišného povrchu, u *N. ceranae* je více strukturovaný s hlubším reliéfem (Ptaszynska et al. 2014).

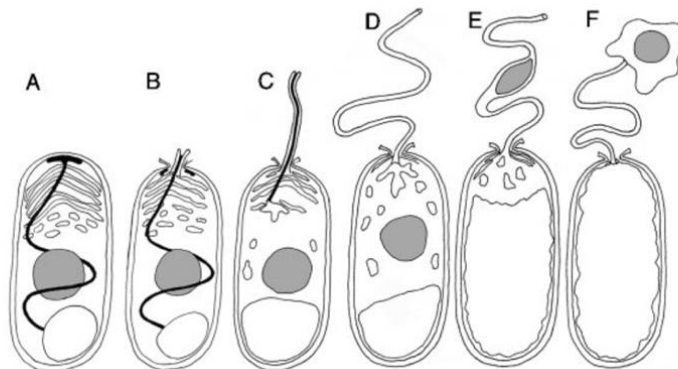


Obrázek 1 Spory *Nosema apis* (vlevo) a *Nosema ceranae* (vpravo) (Martin Kamler)

3.2.3 Vývojový cyklus

Nosema apis a *N. ceranae* je svým životním cyklem striktně vázána na trávicí trakt včely, konkrétně na sliznici žaludku (Huang & Solter 2013), do které musí neprve proniknout. Jedná se tedy o obligátně intracelulární parazitismus. Mikrosporidie se nejčastěji vyskytují ve formě spor, tímto stádiem začíná i končí jejich vývojový cyklus. Jedná se o infekční a zároveň jediné stádium, které je schopno přežít mimo organismus hostitele (Vávra & Larsson 2014). K nákaze jedince dojde jejich požitím spolu s potravou nebo vodou (Mazur & Gajda 2022). Ve vhodném prostředí začíná spora klíčit. Tento proces spočívá ve vymrštění polární trubice a narušení hostitelské buňky. Poté je cytoplazmatický obsah spory včetně jádra vytlačován přes

trubici vlivem rozšiřující se zadní vakuoly. Při průchodu dojde k obalení membránami a tímto způsobem vznikne sporoplazma, která se poté od polární trubice oddělí a zůstane v hostitelské buňce (Vávra & Larsson 2014). Celý průběh klíčení spory je znázorněn na Obrázku 2.



Obrázek 2 Klíčení spory (Keeling & Fast 2002)

Sporoplazma dále dozrává v meront, ze kterého se ve fázi merogonie po období růstu a dělení stanou dceřinné buňky, sporonty. Ty poté vstupují do fáze sporogonie, jejímž konečným produktem je sporoblast, ze kterého se po dozrání stává spora (Vávra & Larsson 2014). V průběhu merogonie a sporogonie se jedná o diplokaryotická stádia (Gisder et al. 2011), z jednoho sporontu vzniknou na konci cyklu dvě zralé spory. V typickém případě je hostitelská buňka nakonec zcela zaplněna sporami (Vávra & Larsson 2014), dojde k jejímu prasknutí a následnému uvolnění velkého množství nových spor, které v případě tzv. primárních spor následně injikují další buňky nebo pokud se jedná o enviromentální spory, hromadí se ve výkalovém vaku a poté jsou vyloučeny do vnějšího prostředí (Higes et al. 2020). Při infekci jedince lze první napadené buňky žaludku pozorovat po třech dnech, po sedmi dnech je infikována většina buněk, které již vykazují známky degradace (Higes et al. 2007). V případě *N. apis* dochází ke konzistentní produkci spor po 12 dnech od inokulace, v případě *N. ceranae* dochází k lineárnímu zvyšování produkce spor od 12 do 20 dne po inokulaci a počet zralých spor je trvale vyšší v porovnání s *N. apis* (Huang & Solter 2013).

3.2.4 Průběh infekce

Pro *N. apis* je typická sezónní dynamika průběhu infekce, kdy lze zaznamenat náhlý a velký nárůst na jaře a nejnižší úroveň v létě (Martín-Hernández et al. 2007). Na začátku jara dělnice čistí pláсты pokálené infikovanými výkaly a tímto způsobem dochází k přenosu infekce (Bailey 1955). Matka začíná plodovat a zvyšuje se počet jedinců ve včelstvu. Lety včel jsou

však stále omezené počasím, a tak se infekce může rychleji šířit (Martín-Hernández et al. 2007). Během léta a letové aktivity poté dochází k úhynu starých, nakažených dělnic a s tím souvisí i snížení pravděpodobnosti přenosu na nově vylíhnuté jedince (Bailey 1955).

Při pozorování včelstev ve Španělsku popsal Higes et al. (2008) průběh infekce *N. ceranae* u *A. mellifera* a byly definovány 4 fáze. V první fázi nejsou pozorovány žádné symptomy infekce, procento infikovaných včel však postupně narůstá. Ve druhé fázi infekce dosahuje svého vrcholu, kdy je nejvyšší procento infikovaných létavek. Ve třetí fázi se populace velmi výrazně rozroste, úroveň infekce ve včelstvu klesá a dosahuje svého minima, po kterém však nastává opět postupný nárůst. Podle pozorování projevů se včelaři zdá, že se včelstvo zotavilo, ve čtvrté fázi ale přijde náhlý vysoký úbytek jedinců. Nastává druhý vrchol infekce, tentokrát dochází k výraznému nárůstu infekce u včel uvnitř úlu. V konečném důsledku umírá matka i celé včelstvo. Ať už bylo včelstvo infikováno na jaře nebo v létě, ke kolapsu došlo asi po roce a půl, oba vrcholy infekce byly vždy během podzimu a zimy a největší pokles v mezidobí mezi tím.

3.2.5 Smíšené infekce

U jednoho včelstva, a dokonce i jedince se mohou současně vyskytovat oba druhy *Nosema* (Burgher-MacLellan et al. 2010). Smíšené infekce mají větší negativní vliv na přežívání včel, než je tomu v případě infekce pouze jedním druhem (Milbrath et al. 2015). Při smíšené infekci dochází k mezidruhové konkurenci, kdy jeden druh dokáže inhibovat množení toho druhého. Silnější inhibiční efekt má *N. ceranae* na *N. apis*. Zajímavé je, že záleží na pořadí, ve kterém se mikrosporidie dostanou do organismu, první druh poté inhibuje ten druhý, při současném napadení hostitele ve stejnou chvíli k vzájemnému omezení nedochází (Natsopoulou et al. 2015).

Existuje hypotéza, že u populace *A. mellifera* nahrazuje pravděpodobně virulentnější druh *N. ceranae* původní *N. apis* (Gisder et al. 2017). Spory *N. apis* jsou náchylné ke zvýšeným teplotám, v případě *N. ceranae* je odolnost vyšší (Sánchez Collado et al. 2014). Změna klimatických podmínek, průměrných teplot během ročních období a zvýšená četnost extrémních klimatických jevů ovlivňuje rozšíření, sezónnost a závažnost infekčních chorob (de la Roque et al. 2008). Terénní údaje získané napříč Evropou ukazují na převahu *N. ceranae* v jižních oblastech, jako je Španělsko, a převahu *N. apis* naopak v oblastech s chladnějším klimatem, jako je například Švédsko. Mezi těmito oblastmi by tedy měla existovat přechodná zóna se stejnou relativní prevencí obou druhů, kde je vyšší konkurenční schopnost *N. ceranae* kompenzována její větší citlivostí vůči chladu. Podle předpokladů by touto zónou měla být

střední Evropa. Pro její přesné určení je ale zapotřebí dalších studií a očekává se, že se bude měnit i během roku v závislosti na změnách teplotních podmínek (Natsopoulou et al. 2015).

3.2.6 Infikování jedinci

Oba druhy mohou infikovat všechny jedince včelstva, tedy dělnice, trubce i matky (Alaux et al. 2011). V případě *N. ceranae* může pravděpodobně dojít k nakažení jedince již ve stádiu larvy. (Eiri et al. 2015). Přítomnost DNA *N. ceranae* byla totiž potvrzena v mateří kašičce získané z infikovaných úlů (Traver & Fell 2012), další cestou může být samotný proces krmení larev (Eiri et al. 2015), již dříve potvrzen přenos při krmení mladých včel infikovanými dělnicemi (Smith 2012). Při nákaze larev v laboratorních podmínkách vyvolala vyšší dávka spor silnou imunitní odpověď, která poté vedla k menšímu počtu spor v dospělosti, následně ale také došlo ke zkrácení délky jejich života (Eiri et al. 2015). Může také dojít k úhynu během vývoje, v laboratorních podmínkách byla při podání vysokých koncentrací spor *N. apis* líhivost matek nulová, zatímco v případě *N. ceranae* nebyla ovlivněna. Pro chovatele matek by tedy mohla přítomnost infekce *N. apis* představovat velkou hrozbu (Naudi et al. 2022). Je však potřebné zjistit, jakým dávkám spor jsou larvy vystaveny v přirozených podmínkách a zda je infekce u larev běžná nebo spíše ojedinělá (Eiri et al. 2015).

U infikovaných matek včely medonosné je potvrzena přítomnost DNA *N. ceranae* v různých tkáních hlavy, hrudníku i zadečku. Mladší matky jsou oproti starším náchylnější k inokulaci (Traver & Fell 2012; Chaimanee et al. 2014). Oba druhy *Nosema* vyskytující se u včely medonosné se mohou přenášet pohlavně (Roberts et al. 2015). Infikovaní mohou být jak nedospělí, tak dospělí trubci (Traver & Fell 2011), kteří mají ve svém spermatu spory *Nosema* (Peng et al. 2015; Roberts et al. 2015). Po spáření matek s infikovanými trubci nebo inseminací infikovaným spermatem dochází k přenosu tohoto parazita. V případě *N. ceranae* také nachází v tkáních vaječnicků a spermatéky, na rozdíl od *N. apis*, která je pouze ve střevě (Roberts et al. 2015). Infekce vaječnicků a spermatéky představuje možnost vertikálního přenosu *N. ceranae* (Traver & Fell 2012). Při výzkumu Roberts et al. (2015) však transovariální přenos nebyl potvrzen, u žádného ze 400 vajíček nakladených infikovanými matkami nebyla infekce zjištěna.

3.2.7 Vliv infekce

Na individuální úrovni nose móza nejvíce ovlivňuje dělnice (Mazur & Gajda 2022). V žaludku dochází k degradaci epitelu a k lýze buněk (Fries 1993). *N. cerane* se oproti *N. apis* dokáže množit i v bazálních buňkách epitelu, tím je narušena jeho vysoká regenerační

schopnost a nastává trvalé poškození (Higes et al. 2007). Důsledkem vlivu infekce na žaludek je snížení celkové produkce trávicích enzymů, a to se projevuje vážnými poruchami trávení a vstřebávání živin (Fries 1993). *Nosema* je energeticky plně závislá na hostiteli a tím ho vystavuje značnému nutričnímu stresu (Mayack & Naug 2009), včely jsou podvyživené a umírají (Higes et al. 2008). V případě infekce *N. ceranae* je tento stres pravděpodobně ještě vyšší z důvodů kratší koevoluce a nejspíše se jedná o důvod vyšší úmrtnosti. Infikované včely jsou více hladové a konzumují více potravy. Při krmení v laboratorních podmínkách ad libitum sacharózou se délka života téměř shodovala s neinfikovanými jedinci, nedostatečné množství potravy tak může být důvodem zkrácené délky života infikovaných včel (Mayack & Naug 2009), infekce *N. ceranae* totiž podle Goblirsch et al. (2013) zkracuje život dělnice v průměru o 9 dní.

Nosemóza má také vliv na imunitní systém hostitele. U včel z vysoce infikovaných včelstev *N. ceranae* dochází k nižší expresi imunitních genů, tedy k potlačení imunitní reakce (Lourenço et al. 2021). Zároveň dochází ke zvýšené aktivaci genů kódujících proteiny, které inhibují apoptózu (Martín-Hernández et al. 2017). Apoptóza je však důležitým prvkem reakce imunitního systému hostitele a její inhibice usnadňuje přežití vnitrobuněčného parazita (Lüder et al. 2001).

Během života vystřídá dělnice několik fází, ve kterých se věnuje konkrétním činnostem zajišťující fungování včelstva. Přechody mezi těmito etapami jsou řízeny na hormonální úrovni, konkrétně záleží na měnícím se množství a vzájemném poměru vitelogeninu (Vg) a juvenilního hormonu (JH). Mladušky setrvávající v úlu mají nízkou hladinu JH a vysokou hladinu vitelogeninu Vg, u mladých včel infikovaných *N. ceranae* je poměr opačný. To může být důvodem urychleného vývoje jejich chování a předčasného shánění potravy, vysoká hladina JH a nízká hladina Vg je totiž typická pro včely létavky. Narušení základních mechanismů časového polyetismu v důsledku infekce může být faktorem, který přispívá k vysoké mortalitě včelstev v nedávné době, protože dělnice ztrácejí flexibilitu reakcí na požadavky kolonie (Goblirsch et al. 2013). S předčasnou přeměnou v létavku se také pojí schopnost učení pachů a jejich pamatování, které je pro shánění potravy klíčové. Mladušky infikované *N. ceranae* dosahují v tomto ohledu lepších výsledků, ve věku létavek dochází naopak ke snížení výkonnosti paměti (Gage et al. 2018).

Klinické příznaky infekce se však liší v závislosti na původci. Mezi příznaky typické pro *N. apis* patří úplavice, která se projevuje přítomností výkalových skvrn uvnitř úlu (viz Obrázek 3 a 4). Včely jsou celkově malátné (Higes et al. 2008) a umírají v blízkosti úlu (Higes et al. 2020). S infekcí *N. ceranae* je spojené výrazné snížení počtu jedinců, množství plodu a také

zásob medu a pylu (Botías et al. 2013; Emsen et al. 2020). Absence zásahů pro redukci nose mózy u včelstev tak může mít pro včelaře značné negativní ekonomické důsledky (Botías et al. 2013).



Obrázek 3 Pokálený nástavek (Martin Kamler)



Obrázek 4 Detail pokáleného plástu (Martin Kamler)

3.3 Diagnostika

Při diagnostice a studiu infekcí *Nosema* spp. se používá mnoho metod jak už kvalitativních, tak i kvantitativních (Mazur & Gajda 2022).

3.3.1 Vzorky

Pro diagnostiku a detekci včelstev infikovaných *Nosema* spp. by měly být odebírány nejstarší včely, protože u létavek byla zjištěna významně vyšší míra infekce ve srovnání s mladšími včelami (Smart & Sheppard 2012). Při odchytu včel u česna se tedy vyhýbáme mladým včelám, které provádějí orientační let. Ten lze snadno určit podle toho, že včela poletuje okolo vchodu do úlu (Fries et al. 2013). Odběr vzorku tímto způsobem je v některých případech velmi obtížný nebo dokonce nemožný. Týká se to například odběrů z uhynulých včelstev, kdy je vhodné vzorky vyšetřit z důvodu kontroly nemocí. Dalším případem je odběr vzorků brzy na jaře, kdy je tento postup v mnoha oblastech nerealizovatelný, pro včelaře je však užitečné znát zdravotní stav včelstev před začátkem sezóny. V takovém případě se nabízí odběr uhynulých jedinců (Topolska & Hartwig 2005). Podle Fries et al. (1984) se výsledky vyšetření vzorků zimních mrtvolek liší oproti vzorkům živých včel, při použití mrtvých jedinců bylo zjištěno výrazně vyšší procento infikovaných včelstev. Gisder et al. (2010) porovnával kvalitativní detekci *Nosema* spp. u vzorků zimních mrtvolek a živých včel ze zimního chomáče odebraných ze stejných včelstev a výsledky se nelišily, ke stejnému závěru dospěla také Pohorecka et al. (2018). Výsledky z posledních let tedy naznačují, že oba typy diagnostického materiálu, zimní mrtvolky i živé včely, lze považovat za stejně vhodné pro kvalitativní mikroskopickou diagnostiku spor *Nosema*. Laboratorní vyšetření obou typů vzorků současně může zvýšit přesnost mikroskopické detekce *Nosema* spp. pro zjištění prevalence na jaře, zejména u včelstev s nízkou úrovní infekce. Zavedení této strategie do rutinní laboratorní diagnostiky lze považovat za alternativu k použití citlivější metody PCR nebo odběru vzorků většího počtu živých včel. Pro kvantitativní hodnocení intenzity infekce by však měly být používány vzorky živých dělnic (Pohorecka et al. 2018).

Pro diagnostiku prevalence parazitů platí, že se zvyšujícím se počtem vyšetřených včel se také zvyšuje pravděpodobnost detekce. Nedostatečně velký vzorek může vést k falešně negativnímu výsledku, což je zdánlivá nepřítomnost patogenu i když je ve skutečnosti s nízkou prevalencí přítomen. Historicky bylo jako dostatečný počet považováno 20-30 včel (Pirk et al. 2013), v současné době je doporučováno použít 60 včel (WOAH 2018). Při plánování vyšetření je třeba určit, jak vysokou prevalenci infekce chceme odhalit. Při vyšetření odhalíme

s 95% pravděpodobností 10% prevalenci infekce při použití vzorku 30 včel a 5% prevalenci při použití 60 včel (Pirk et al. 2013).

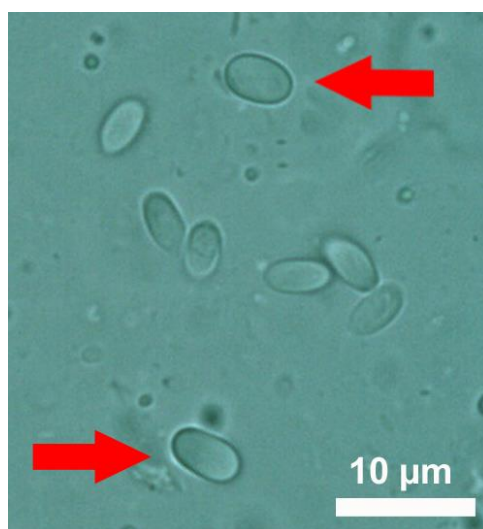
3.3.2 Laboratorní metody

Kvantitativním vyšetřením včelstev, při kterém se vyšetřuje směsný vzorek a výsledkem je počet spor na včelu, lze sledovat průběh infekce. Toho lze využít při studiu vztahu mezi reprodukční rychlostí parazita a podmínkami uvnitř a vně úlu (Doull 1965). Hodnocením směsných vzorků můžeme dojít ke stejnému průměrnému počtu spor na včelu u vzorku s několika silně infikovanými včelami, a i u vzorku, kde je podstatně více středně infikovaných včel. Lze předpokládat, že při odběru vzorků brzy na jaře bude následná produktivita včelstva více ovlivněna v případě rozsáhlejší infekce než při výskytu několika silně infikovaných jedinců (Fries et al. 1984). Procento *Nosema* pozitivních včel je považováno za užitečný ukazatel úrovně nákazy včelstev (Botías et al. 2013), také pro prosté prokázání přítomnosti či nepřítomnosti parazita ve včelstvu se jeví jako nejlepší zvolit vyšetření jednotlivých včel (Fries et al. 1984). Vyjádření úrovně infekce počtem infikovaných včel jako procento z odebraných včel, spíše než skutečným počtem spor, je jednoduchou, ale uspokojivou metodou hodnocení (El-Shemy & Pickard 1989). Individuální vyšetření je však časově náročnější, takže musí být zvážena rychlost proti přesnosti (Fries et al. 1984).

Při individuálním vyšetření se celá včela, zadeček nebo žaludek se rozmělní v 1 ml vody. Jako nejideálnější se považuje použití vypreparovaného žaludku, protože dojde k eliminaci ostatních částic. Je však třeba vzít v úvahu, že v případě zmražených a poté rozmrzlých vzorků je tato preparace obtížná. Získaný macerát se poté zkoumá mikroskopicky na přítomnost spor. Mezi podílem infikovaných včel a průměrným počtem spor na včelu získaného ze směsného vzorku existuje vysoce významná pozitivní korelace, proto lze ve většině případů použít směsný vzorek, což je méně pracné. Při vyšetření směsného vzorku se společně rozmělní požadované množství včel, zadečků nebo žaludků s destilovanou vodou v poměru 1 ml na včelu (Fries et al. 2013). Suspenze se poté přefiltruje, odstředí, opětovně naředí, a nakonec se zkoumá mikroskopicky, při použití počítačící komůrky je výsledek kvantitativní, tedy počet spor na včelu (Duquesne et al. 2021).

3.3.3 Světelná mikroskopie

Jedná se o nekvantitativní metodu, která je jednoduše proveditelná (WOAH 2018). Pro pozorování spor *Nosema* spp. je ideální mikroskop se 400x zvětšením. Ačkoliv rozdíly ve velikosti *N. ceranae* a *N. apis* nejsou okamžitě patrné, lze je díky výše popsaným morfologickým rozdílům odlišit (viz Obrázek 5). Průměrná velikost spor *N. apis* je přibližně o 1 μm větší (Fries et al. 2013), pouze okolo 4 % případů se velikosti překrývají (Kamler & Titěra 2015). Spory *Nosema* spp. je třeba odlišit od kvasinkových buněk, spor hub, tukových a vápenatých tělísek a od cyst *Malpighamoeba mellifica*, které jsou kulovité a mají průměr přibližně 6-7 μm (WOAH 2018). Pro usnadnění rozlišení spor mikrosporidií od jiných částic je vhodný mikroskop s fázovým kontrastem. Další možností je také využití kontrastního barvení Gimsovým barvivem u metanolem fixovaných nátěrů. Vzhledem ke světlolomnosti spor *Nosema* jsou však snadno detekovatelné i bez jejich barvení (Fries et al. 2013). Světelná mikroskopie je stále cennou, poměrně levnou a jednoduchou metodou pro zjišťování přítomnosti infekce *Nosema* ve včelstvech (Ansari et al. 2017).



Obrázek 5 Spory *Nosema apis* (označené šipkou) a *Nosema ceranae* (uprostřed) (Martin Kamler)

3.3.4 Molekulární detekce

Pro detekci a identifikaci *Nosema* spp. byly také vyvinuty molekulární metody, díky kterým lze potvrdit její výskyt i přesto, že vizuální detekce naznačuje její nepřítomnost. Molekulární metody jsou totiž oproti mikroskopii výrazně citlivější a lze díky nim detekovat kromě spor i vegetativní buňky. Z tohoto důvodu je nutná opatrnost při interpretaci výsledků, protože může být přítomno pouze velmi nízké množství spor a patogen tak může mít na svého

hostitele velmi malý nebo žádný vliv. Molekulární techniky vyvinuté pro detekci *Nosema* spp. u včel jsou nejčastěji založeny na PCR a existuje široká škála druhově specifických sad PCR primerů (Fries et al. 2013). Truong et al. (2021) vyvinul metodu, která využívá ultrarychlou kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (UR-qPCR). Její výhodou je stabilita a citlivost kvantifikace ve srovnání s mikroskopickým sčítáním a také rychlost ve srovnání s dřívějšími molekulárními metodami, v tomto případě jsou výsledky vyšetření k dispozici během 20 minut.

3.4 Zásahy proti noseμόze

3.4.1 Chemická léčba

Jedinou schválenou účinnou chemickou terapií pro léčbu infekce *Nosema* spp. je fumagilin, antibiotikum známé již více než 50 let. Ve včelařství v USA a některých dalších zemích se hojně používá, avšak v Evropě je jeho používání přísně zakázáno, protože není stanoven maximální limit reziduí. Kromě možných reziduí antibiotik přítomných ve včelích produktech má používání antibiotik negativní vedlejší účinky u včel, například likviduje střevní bakterie což snižuje imunitu a zvyšuje náchylnost k infekci noseμόzou (Li et al. 2017; Arismendi et al. 2018; El-Seedi et al. 2022). V případě aplikace dochází k jeho rozkládání a ředění v průběhu krmné sezóny, takže včely a mikrosporidie jsou vystaveny postupně klesajícím koncentracím léčiva. To má za následek zvyšující se počet spor, a to až o 100 % oproti infikovaným včelám, které fumagilinu nebyly vystaveny (Huang et al. 2013).

3.4.2 Přírodní produkty

V současné době existuje doporučení vyhnout se používání léčiv kvůli zvyšující se rezistenci a možnému hromadění reziduí ve včelích produktech a riziku následného vlivu na lidské zdraví. Alternativou jsou v tomto případě přírodní produkty (El-Seedi et al. 2022). Tato možnost je atraktivní pro zemědělce a ochránce životního prostředí z důvodu nižší toxicity (Burnham 2019). I u těchto látek je však nutné potvrdit přijatelnou antitymkytickou aktivitu a absenci vedlejších účinků na *A. mellifera*, minimalizovat rezidua v medu a vosku, odhadnout míru toxicity na enzymovou aktivitu u včel a také jejich vliv na energetické zásoby včel (Bravo et al. 2017; El-Seedi et al. 2022).

Jedním z možných alternativních léčebných postupů, které se dají využít k tlumení této nemoci, jsou rostlinné extrakty. Například Roussel et al. (2015) potvrdil u určitého polysacharidu získaného z řasy *Porphyridum* spp. schopnost snížit jak parazitární zátěž, tak úmrtnost včel v důsledku infekce *N. ceranae*. Je také potvrzena významná inhibiční schopnost extraktu z rostliny *Laurus nobilis* na spory *N. ceranae*. Díky absenci toxicity se tak tento ethanolový extrakt jeví jako slibná léčba (Porrini et al. 2011; Damiani et al. 2014). Další látkou, která se jeví jako účinná, je éterický olej získaný ze stromu *Cryptocarya alba* (Bravo et al. 2017). Arismendi et al. (2018) potvrdil také antiparazitární aktivitu propolisu a antimikrobiální aktivitu extraktů z určitých původních rostlin rostoucích v Chile proti *N. ceranae*.

Včely medonosné využívají vyprodukovaný propolis k ochraně hnízda před parazity a patogeny a předpokládá se, že propolis snižuje mikrobiální zátěž včelstva (Mura et al. 2020), proto se podávání propolisu získaného jeví jako slibná metoda v boji s noseμόzou. Podávání etanolového extraktu z propolisu dělnicím před infekcí nebo po ní vedlo k významnému zvýšení přežívání infikovaných včel, snížení množství spor a snížení míry infekce v testované skupině. Tyto výsledky naznačují, že extrakt z propolisu může pomoci minimalizovat dopady *N. ceranae*, případně může být využíván jako preventivní léčba. V praxi by podání extraktu včelám mohlo probíhat prostřednictvím jeho přidání do sirupů používaných při přikrmování (Naree et al. 2021). Nepodařilo se však potvrdit, že by včely účelně konzumovaly propolis jako formu samoléčby. Test výběru neodhalil žádné preference včel infikovaných *N. ceranae* pro konzumaci výrobků s jeho obsahem (Mura et al. 2020).

3.4.3 Zootechnická opatření

Výkaly infikovaných včel, které se nacházejí se na plástech v úlu, jsou jedním ze zdrojů infekce (Bailey 1955). Výměnou mezistěn za čisté můžeme tedy snížit výskyt infekce a zároveň i jiných parazitů. Negativním efektem je však možné snížení produktivity včelstva. Dalším doplňkovým opatřením je inaktivace spor pomocí dezinfekce vybavení (Holt & Grozinger 2016). V případě plástů a vosku můžeme využít ozon, u včelařských pomůcek hydroxid sodný nebo amonný a chlornan sodný (Zanet et al. 2019; Formato et al. 2022). Vhodné je také využít působení vysoké teploty, v případě spor *N. apis* stačí teplota 60 °C po dobu 5 minut, spory *N. ceranae* však působení této teploty vydrží až 6 hodin, proto se doporučuje pro jejich likvidaci vyšší teplota (Formato et al. 2022).

Jedním z dalších možných zootechnických opatření je výměna matky ve včelstvu (Holt & Grozinger 2016), kdy se jedná o velmi efektivní metodu pro kontrolu infekce *N. ceranae* v polních podmínkách (Formato et al. 2022). Matka včely medonosné *A. mellifera* žije několik let, ale její plodnost s časem klesá (Page & Peng 2001), schopnost matky nahradit počty jedinců uhynulých na infekci je však pro včelstvo klíčová (Holt & Grozinger 2016). Stárnoucí matka je obvykle nahrazena dceřinou matkou vychovanou dělnicemi a poté je původní matka zabita (Page & Peng 2001). Simeunovic et al. (2014) porovnával včelstva s matkou starou 1, 2 nebo 3 roky a ta s jednoletou matkou odolávala infekci mnohem úspěšněji. Botías et al. (2012) ve svém výzkumu přiměl včelstva k přirozené výměně staré matky za novou a pozoroval, zda bude mít tato změna vliv na úroveň infekce. Z výsledků vyplývá, že došlo k významnému snížení míry infekce srovnatelnému s léčbou fumagilinem. Projevilo se však také několik krátkodobých negativních účinků způsobených přerušáním přirozeného koloběhu jako je snížení počtu

dospělých jedinců nebo nedostatečná snůška. Snížené množství zásob poté včelstvo může učinit citlivější vůči jiným stresorům, proto je třeba tuto strategii používat opatrně, ideálně ve vrcholu kvetení pro zajištění dostatečného množství potravních zdrojů.

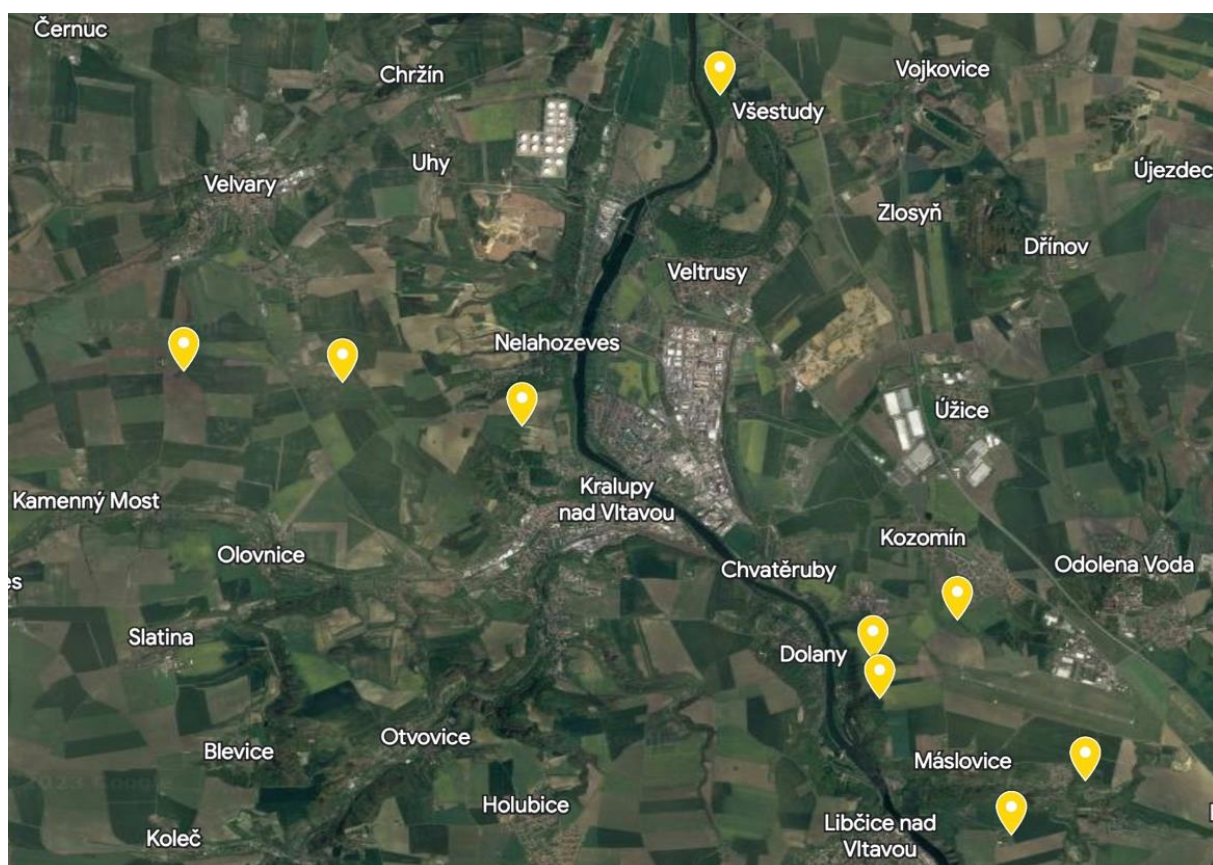
3.4.4 Šlechtění *Nosema* rezistentních včel

Velký potenciál mezi šetrnými řešeními má selekce odolných včelstev vůči nose móze (Formato et al. 2022). Chovatelé matek v Dánsku již několik desetiletí šlechtí *Nosema* tolerantní včelstva a jsou úspěšní (Huang et al. 2012). Za přirozených podmínek dochází při infekci k inhibici apoptózy napadených buněk (Martín-Hernández et al. 2017), u rezistentních jedinců však tento mechanismus imunitní obrany funguje i nadále. Díky tomu dochází k odstranění napadených buněk žaludku, které poté odchází z těla při defekaci mimo úl. Včela je tedy schopna překonat infekci a zároveň předejít šíření nemoci uvnitř včelstva (Kurze et al. 2015).

4 Materiál a metody

4.1 Přehled stanovišť

Pro odběr vzorků byla vybrána stanoviště Výzkumného ústavu včelařského Dol, který je schváleným vyšším šlechtitelským chovem Uzaného chovatelského sdružení včely medonosné kraňské. Konkrétně se vzorky odebíraly na 9 stanovištích v širším okolí Kralup nad Vltavou (viz Obrázek 6).



Obrázek 6 Stanoviště vyšetřovaných včelstev (<http://maps.google.com>)

4.2 Odběr vzorků

Odběr probíhal od 31. 1. do 13. 2. 2023. Z každého včelstva bylo odebráno 30 mrtvých a 30 živých dělnic. Počet jedinců ve vzorku byl zvolen s ohledem na akreditovaný metodický postup vyšetření používaný v laboratořích v ČR. Celkem bylo odebráno 414 vzorků, tedy 12 420 jedinců.

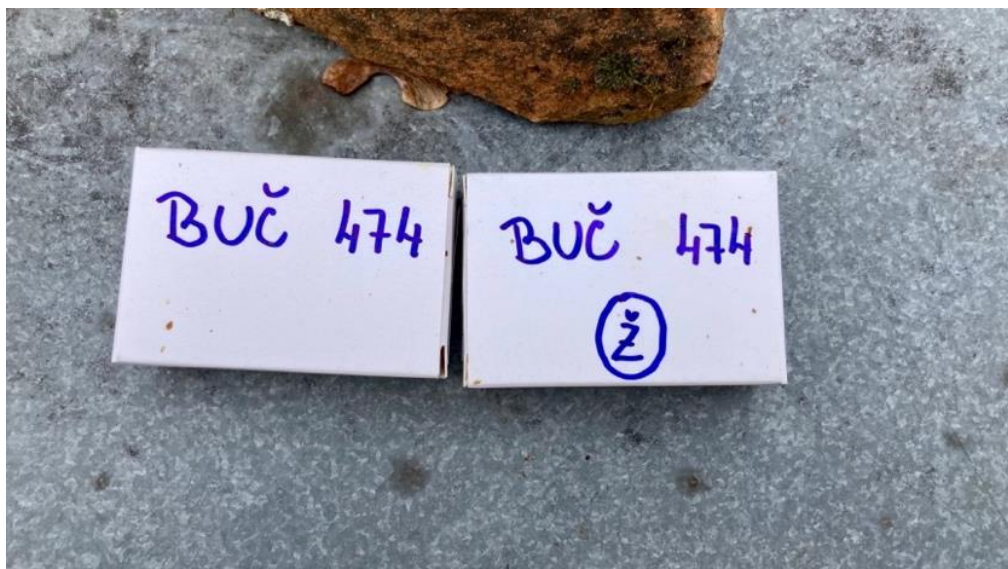
Mrtvé dělnice jsme odebírali ze dna úlu. Pomocí rozpěráku byla odstraněna česnová vložka a vyjmuta zasíťovaná podložka. Po kontrole vhodnosti vzorku (dostatečný počet jedinců

a nepoškozené včely od hlodavců) byly včely přemístěny do papírové krabičky. Živé dělnice jsme odebírali z okrajové části zimního chomáče. Po otevření úlu byl vyjmut první plást, na kterém se nacházely včely (viz Obrázek 7) a pomocí pinzety byl odebrán daný počet do krabičky.



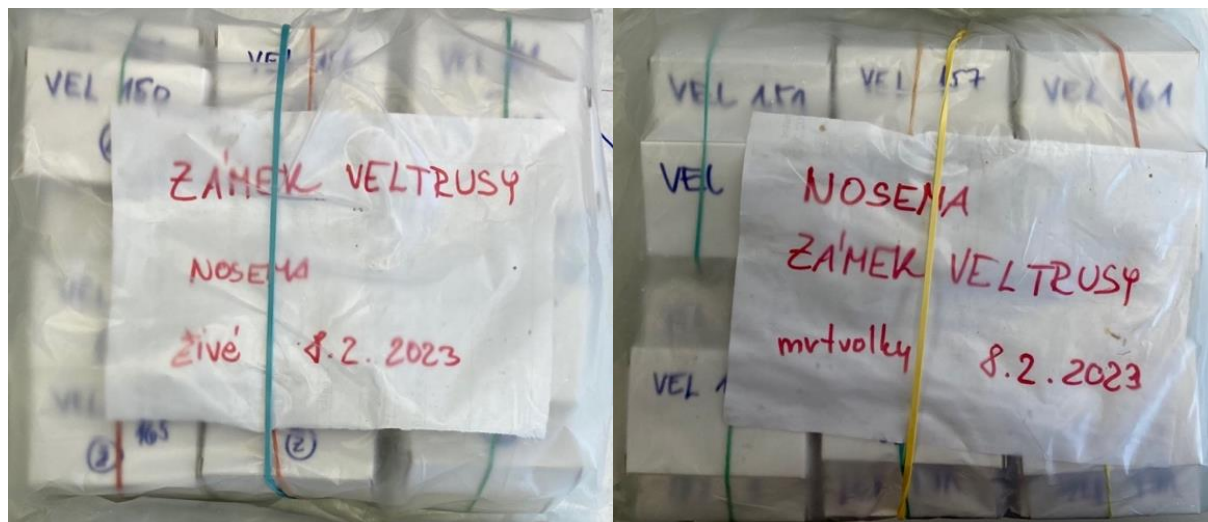
Obrázek 7 Vytažený krajní plást s dělnicemi (autor)

Jednotlivé krabičky byly nadepsány před samotným odběrem. Všechny byly označeny zkratkou názvu stanoviště, číslem daného úlu a v případě živých včel bylo připsáno písmeno Ž (viz Obrázek 8).



Obrázek 8 Označené krabičky pro odebrání vzorků (autor)

Vzorky z každého stanoviště byly po odběru srovnány, označeny štítkem s názvem stanoviště a datumem odběru (viz Obrázek 9). Poté byly uloženy do mrazáku do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byly uchovány až do doby vlastního vyšetření. V případě živých včel tímto způsobem také došlo k jejich usmrcení chladovým šokem.



Obrázek 9 Srované vzorky ze stanoviště připravené k uložení do mrazáku (autor)

4.3 Příprava preparátu pro individuální vyšetření

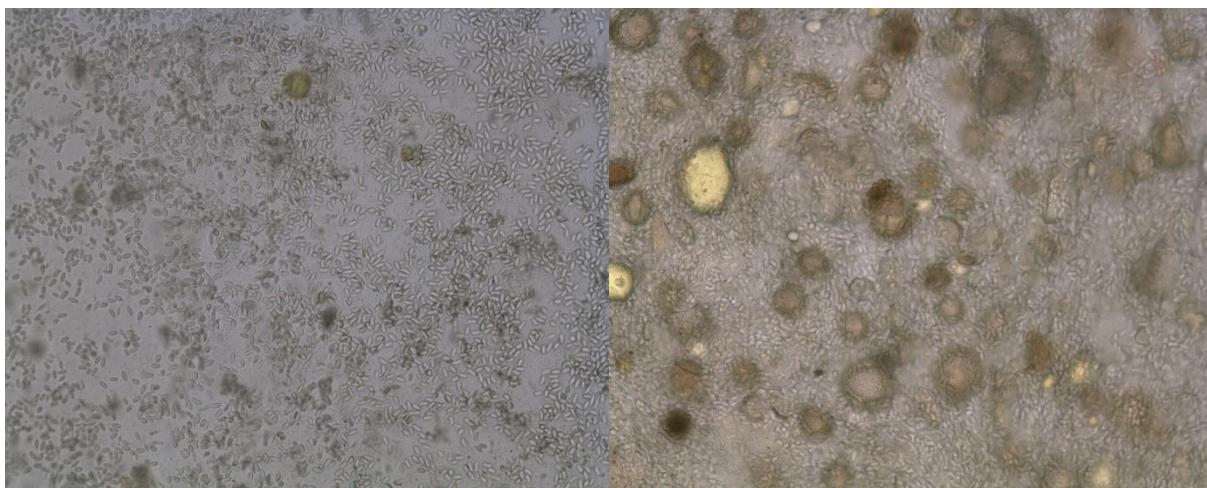
Před samotným začátkem přípravy preparátu byly používané nástroje umyty a vydesinfikovány denaturovaným lihem. Pomocí pinzety byl vypreparován výkalový vak a jeho obsah umístěn na podložní sklíčko. Poté byla pomocí pipety přidána kapka destilované vody a přiloženo krycí sklíčko. Pinzety byly mezi přípravou jednotlivých vzorků omyty a vydezinfikovány pro zabránění vzájemné kontaminace.

4.4 Příprava směšného vzorku

Pro jeden směšný vzorek je potřeba 30 včel. Předem se připraví PE pytlíky, které se označí číslem úlu, případně i zkratkou názvu stanoviště. Pomocí nůžek se oddělí zadečky včel, dají se do sáčku a přidá se k nim 15 ml destilované vody. Vzorek se poté dezintegruje po dobu jedné minuty v desintegrátoru pro vznik homogenní suspenze. Pomocí míchátky se nanese kapka na podložní sklíčko a překryje se krycím sklíčkem. Aby nedošlo k záměně vzorků, je třeba mít podložní sklíčka se vzorky označená nebo řádně seřazená.

4.5 Mikroskopické vyšetření

K vyšetření vzorků byl použit binokulární světelný mikroskop Amplival a okulár se zvětšením 10x, objektiv se zvětšením 40x, celkové zvětšení bylo 400x. Při nálezů spor *Nosema* spp. v preparátu byl vzorek označen jako pozitivní (viz Obrázek 10), v opačném případě jako negativní.



Obrázek 10 Obsah výkalového vaku s nálezem spor *Nosema* spp. (Martin Kamler)

4.6 Statistické vyhodnocení

Primární data z laboratorního deníku byla přenesena do souhrných tabulek v programu Microsoft Excel. V témže programu bylo také provedeno statistické vyhodnocení dat. Získaná data z individuálního vyšetření včel neměla normální rozdělení, nebylo tedy možné použít párový t-test. Z tohoto důvodu byl zvolen Wilcoxonův test (Kába 1973), který je jeho neparametrickou analogií. Pro statistické vyhodnocení výsledků směsných vzorků byl použit McNemarův test (Mrkvička & Petrášková 2006), který se používá pro analýzu kvalitativních znaků, kdy jsou dvojice hodnot na sobě závislé.

5 Výsledky

5.1 Individuální vyšetření

Individuálně byly na přítomnost spor *Nosema* spp. vyšetřeny včely ze 72 včelstev na 4 stanovištích. Celkem se tedy jedná o 4320 jedinců, z nichž 710 bylo vyhodnoceno jako pozitivní a 3610 jako negativní.

H₀: Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi relativním výskytem pozitivních jedinců ve vzorcích živých včel oproti vzorkům zimních mrtvolek.

H_a: Mezi výskytem pozitivních jedinců ve vzorcích zimních mrtvolek a živých včel je statisticky významný rozdíl.

Na základě statistického vyhodnocení získaných dat pomocí Wilcoxonova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ vyplývá, že nulovou hypotézu zamítáme. Tento závěr byl shodný u všech vyhodnocených stanovišť. Existuje statisticky významný rozdíl ve výskytu jedinců s pozitivním nálezem spor *Nosema* spp. při vyšetření živých a mrtvých včel ze stejného včelstva. Výskyt pozitivních jedinců je statisticky významně vyšší v případě zimních mrtvolek.

5.1.1 Stanoviště č. 1 (Lobeč)

Tabulka 1 Počet pozitivních jedinců na stanovišti č. 1

číslo úlu	živé	mrtvé
270	0	3
272	6	0
274	4	5
275	5	13
277	0	2
278	0	5
279	0	1
280	1	3
281	0	1
286	0	6
287	1	6
288	0	0
290	0	1
291	0	3
292	0	0
294	0	5
295	2	3
296	2	3
297	0	4
298	0	4
300	1	2
301	4	4
303	0	3
304	0	3
305	4	8

počet párových hodnot: 25

počet nenulových diferencí (n): 22

testovací kritérium (W): 20,5

kritická hodnota ($W_{0,05}$): 66

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$W = 20,5 < W_{0,05} = 66$$

Zamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.1.2 Stanoviště č. 2 (Postřižín)

Tabulka 2 Počet pozitivních jedinců na stanovišti č. 2

číslo úlu	živé	mrtvé
1 J	2	8
2 J	4	16
2 K	2	7
9	0	6
13	2	19
15	3	0
17	0	3
18	7	18
20	1	7
51	4	8
54	3	10
55	0	0
56	0	5
58	1	4
60	0	9

počet párových hodnot: 15

počet nenulových diferencí (n): 14

testovací kritérium (W): 2

kritická hodnota ($W_{0,05}$): 21

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$W = 2 < W_{0,05} = 21$$

Zamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.1.3 Stanoviště č. 3 (Jasánky)

Tabulka 3 Počet pozitivních jedinců na stanovišti č. 3

číslo úlu	živé	mrtvé
161	1	4
162	1	8
163	4	14
164	4	19
169	0	0
170	0	2
171	0	9
172	2	6
173	5	14
174	0	6
175	29	24
176	0	5
178	0	18
179	0	5
180	4	10

počet párových hodnot: 15

počet nenulových diferencí (n): 14

testovací kritérium (W): 5

kritická hodnota ($W_{0,05}$): 21

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$W = 5 < W_{0,05} = 21$$

Zamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.1.4 Stanoviště č. 4 (Zlončice)

Tabulka 4 Počet pozitivních jedinců na stanovišti č. 4

číslo úlu	živé	mrtvé
72	16	4
73	6	21
75	30	24
79	19	25
81	3	3
82	1	2
83	3	5
84	1	5
87	2	5
91	1	1
92	1	6
94	2	7
95	1	8
96	1	7
97	7	21
98	1	3
99	1	6

počet párových hodnot: 17

počet nenulových diferencí (n): 15

testovací kritérium (W): 23

kritická hodnota ($W_{0,05}$): 25

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$W = 23 < W_{0,05} = 25$$

Zamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.2 Směsné vzorky

Na přítomnost spor *Nosema* spp. byly vyšetřeny vzorky ze 135 včelstev na 5 stanovištích. Celkem bylo tedy vyšetřeno 270 směsných vzorků, z nichž 136 bylo vyhodnoceno jako pozitivní a 134 jako negativní.

H₀: Neexistuje statisticky významná závislost mezi typem vzorku a výsledkem vyšetření.

H_a: Mezi výsledkem vyšetření a typem vzorku existuje statisticky významná závislost.

Získaná data z jednotlivých stanovišť byla vyhodnocena pomocí McNemarova testu. Na třech stanovištích z pěti byla nulová hypotéza zamítnuta, na dvou stanovištích vyšel opačný závěr. V základu byla nulová hypotéza testovaná na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, na dvou stanovištích však byla zamítnuta také na hladině významnosti $\alpha = 0,005$. Při vyhodnocení všech získaných dat nezávisle na stanovištích byla nulová hypotéza zamítnuta na hladině významnosti $\alpha = 0,005$. Výsledek vyšetření tedy velmi významně závisí na skutečnosti, zda se použije vzorek živých včel nebo zimních mrtvolek, v případě zimních mrtvolek vychází vyšší pozitivita.

Tabulka 5 Vzorová tabulka s vysvětlivkami

n = počet včelstev na stanovišti		mrtvé včely	
		pozitivní	negativní
živé včely	pozitivní	a	b
	negativní	c	d

- a**... počet včelstev s pozitivním výsledkem při vyšetření živých i mrtvých včel
- b**... počet včelstev s pozitivním výsledkem při vyšetření živých včel a negativním v případě mrtvolek
- c**... počet včelstev s negativním výsledkem při vyšetření živých včel a pozitivním v případě mrtvolek
- d**... počet včelstev s negativním výsledkem při vyšetření živých i mrtvých včel

5.2.1 Stanoviště č. 5 (Zámek Veltrusy)

Tabulka 6 Výskyt *Nosema* spp. na stanovišti č. 5

n = 24		mrtvé včely	
		pozitivní	negativní
živé včely	pozitivní	7	2
	negativní	8	7

stupeň volnosti: 1

testovací kritérium (χ^2): 3,6

kritická hodnota ($\chi^2_{0,05}$): 3,84

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$\chi^2 = 3,6 < \chi^2_{0,05} = 3,84$$

Nezamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.2.2 Stanoviště č. 6 (Neuměřice)

Tabulka 7: Výskyt *Nosema* spp. na stanovišti č. 6

n = 27		mrtvé včely	
		pozitivní	negativní
živé včely	pozitivní	2	1
	negativní	9	15

stupeň volnosti: 1

testovací kritérium (χ^2): 6,4

kritická hodnota ($\chi^2_{0,05}$): 3,84

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$\chi^2 = 6,4 > \chi^2_{0,05} = 3,84$$

Zamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.2.3 Stanoviště č. 7 (Palpost)

Tabulka 8 Výskyt *Nosema spp.* na stanovišti č. 7

n = 31		mrtvé včely	
		pozitivní	negativní
živé včely	pozitivní	18	1
	negativní	11	1

stupeň volnosti: 1

testovací kritérium (χ^2): 8,33

kritická hodnota ($\chi^2_{0,005}$): 7,88

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$\chi^2 = 8,33 > \chi^2_{0,005} = 7,88$$

Zamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,005$.

5.2.4 Stanoviště č. 8 (Hoštice)

Tabulka 9 Výskyt *Nosema spp.* na stanovišti č. 8

n = 30		mrtvé včely	
		pozitivní	negativní
živé včely	pozitivní	14	0
	negativní	12	4

stupeň volnosti: 1

testovací kritérium (χ^2): 12

kritická hodnota ($\chi^2_{0,005}$): 7,88

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$\chi^2 = 12 > \chi^2_{0,005} = 7,88$$

Zamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,005$.

5.2.5 Stanoviště č. 9 (Malá Bučina)

Tabulka 10 Výskyt *Nosema spp.* na stanovišti č. 9

n = 23		mrtvé včely	
		pozitivní	negativní
živé včely	pozitivní	0	3
	negativní	7	13

stupeň volnosti: 1

testovací kritérium (χ^2): 1,6

kritická hodnota ($\chi^2_{0,05}$): 3,84

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$\chi^2 = 1,6 < \chi^2_{0,05} = 3,84$$

Nezamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.2.6 Výsledky všech směsných vzorků

Tabulka 11 Výskyt *Nosema spp.* ve všech směsných vzorcích

n = 135		mrtvé včely	
		pozitivní	negativní
živé včely	pozitivní	41	7
	negativní	47	40

stupeň volnosti: 1

testovací kritérium (χ^2): 29,63

kritická hodnota ($\chi^2_{0,005}$): 7,88

Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$\chi^2 = 29,63 > \chi^2_{0,005} = 7,88$$

Zamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,005$.

5.3 Celkové shrnutí výsledků vyšetření

Pro celkové shrnutí výsledků byla použita data získaná jak z vyšetření jednotlivých včel, tak směsných vzorků, jedná se tedy o výsledky ze všech testovaných včelstev. Při individuálním vyšetření bylo pro tyto účely označeno včelstvo za pozitivní při nálezů minimálně jedné pozitivní včely ve vzorku.

5.3.1 Vyhodnocení výsledků všech vyšetřených včelstev

Tabulka 12 Výskyt *Nosema spp.* ve všech vyšetřených včelstev

n = 207		mrtvé včely	
		pozitivní	negativní
živé včely	pozitivní	84	9
	negativní	70	44

V Tabulce 12 jsou shrnuty výsledky vyšetření jednotlivých včelstev na přítomnost spor *Nosema spp.* Z výsledku testu vyplývá, že výsledek vyšetření velmi významně závisí na typu vzorku, tedy na použití živých včel nebo zimních mrtvolek. Z celkem 207 vyšetřených včelstev se výsledky shodovaly ve 128 případech. V 79 případech výsledky nebyly shodné, z toho v 70 případech vyšla pozitivita pouze u vzorku zimních mrtvolek, v 9 případech tomu bylo naopak.

McNemarův test:

stupeň volnosti: 1

testovací kritérium (χ^2): 47,10

kritická hodnota ($\chi^2_{0,005}$): 7,88

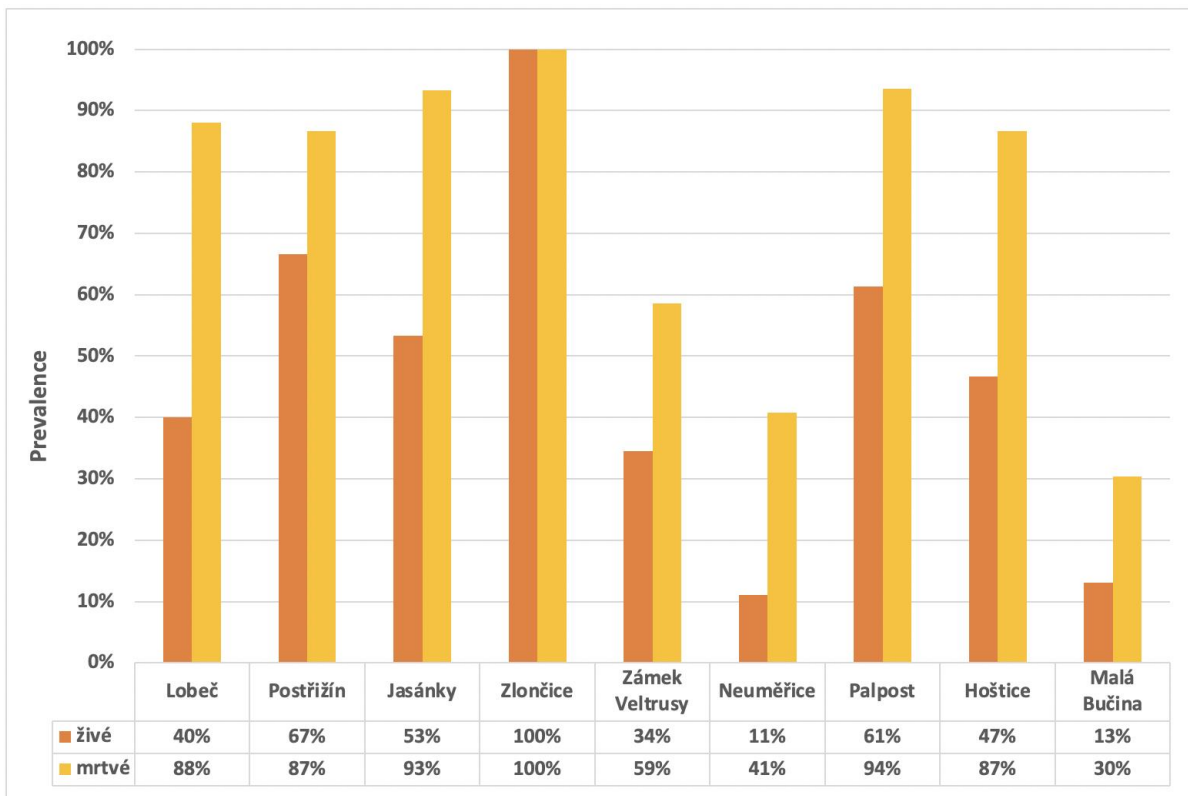
Porovnání testovacího kritéria a kritické hodnoty:

$$\chi^2 = 47,10 > \chi^2_{0,005} = 7,88$$

Zamítáme H_0 na hladině významnosti $\alpha = 0,005$.

5.3.2 Prevalence na jednotlivých stanovištích

Na základě výsledků je nejvyšší prevalence noseμόzy ze všech zkoumaných stanovišť ve Zlončicích (stanoviště č. 4), kde při výpočtu z dat získaných vyšetřením živých i mrtvých včel vychází prevalence 100 %. Na všech ostatních stanovištích je prevalence shodně vyšší v případě vyšetření zimních mrtvolek.



Graf 1 Prevalence noseμόzy na jednotlivých stanovištích

6 Diskuse

Výsledky pokusu diplomové práce ukazují, že při vyšetření včelstev *Apis mellifera* na přirovnost původce noseμόzy se relativní počet pozitivních jedinců ve vzorku liší v případě vyšetření zimních mrtvolek a živých včel a že výsledek vyšetření velmi významně závisí na typu odebraného vzorku včel.

Z celkového počtu 207 testovaných včelstev vyšel u obou typů vzorků ve 128 případech (62 %) shodný výsledek a v 79 (38 %) rozdílný výsledek. V 70 případech (34 %) byl pozitivní pouze vzorek mrtvých včel a v 9 (4 %) vyšla pozitivita pouze u živých včel. Vyšší záchytnost původce noseμόzy je tedy ze vzorků zimních mrtvolek, pozitivních bylo 154 vzorků (75 %) zatímco u živých včel 25 vzorků (45 %). Současně ale výsledky ukazují, že vyšetřením zimních mrtvolek nezískáme příliš přesný obraz o aktuálním stavu včelstva.

Výsledky provedené v rámci předložené diplomové práce jsou podobné s výsledky Fries et al. (1984), který porovnával směsné vzorky vyšetřené kvantitativní metodou. Shodný výsledek vyšetřením mrtvolek a živých včel prokázal u 65 % vzorků, rozdílný výsledek ve 35 % případů. Ve 30 % případů byl pozitivní pouze vzorek mrtvých včel a v 5 % případů pouze u vzorku živých jedinců. Celkem bylo pozitivních vzorků zimních mrtvolek bylo 74 %, v případě živých včel 49 %.

Pohorecka et al. (2018) naopak zjistila shodnou prevalenci při vyšetření živých i mrtvých včel (46 %). Shodné bylo také procento případů, kdy u jednoho včelstva vyšly rozdílné výsledky (18 %). Podle těchto výsledků lze oba typy diagnostického materiálu považovat za stejně vhodné pro vyšetření noseμόzy. Gisder et al. (2010) došel ke shodnému závěru, že se kvalitativní detekce spor *Nosema* neliší v případě živých včel a zimních mrtvolek.

Rozdílnost výsledků by mohla být způsobená odlišnou dobou odběru vzorků. Fries et al. (1984) odebíral vzorky ze včelstev ve Švédsku v polovině dubna krátce po prvních jarních proletech, oba vzorky z úlu byly odebrané v jednu chvíli. Podobně tomu bylo i v případě pokusu v této diplomové práci, kdy byly oba vzorky z jednoho včelstva odebrané taktéž v jednu chvíli, a to od konce ledna do poloviny února. V případě studie Pohorecka et al. (2018) se jednalo o včelstva v Polsku, vzorky z jednoho včelstva však byly odebírány v jinou dobu. Zimní mrtvolky odebírali včelaři během března a dubna, vzorky živých včel poté během dubna nebo na začátku května odebírali veterináři. V tuto dobu jsou však ve včelstvu také nově vylíhnuté dělnice, ne pouze dlouhověké zimní včely, a míra infekce u živých včel se v mezidobí mohla zvýšit. Díky této metodice mohlo dojít k nesprávným výsledkům a jejich interpretaci.

Možným pokusem, kterým by se dalo návazat na tuto práci, je vzájemné porovnání výsledků vyšetření při použití vzorku 60 živých včel a 30 zimních mrtvolek. Pravděpodobnost detekce patogenu je vypočítána pro různě velké vzorky živých včel létavek, pro praxi je nejčastěji doporučováno vyšetření 60 jedinců. V případě zimních mrtvolek však tito jedinci prošli již určitou selekcí, a tak by pravděpodobnost záchytu noseμόzy mohla být dostatečně vysoká i z menšího vzorku.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo praktické vyhodnocení vhodnosti vzorkování pro vyšetření včely medonosné na přítomnost původce noseμόzy včel. Celkem byly odebrány vzorky 30 živých včel a 30 zimních mrtvolek z 207 včelstev na 9 stanovištích.

Ve výsledcích získaných při individuálním vyšetření včel byl zjištěn statisticky významně vyšší relativní počet pozitivních jedinců v případě vzorků zimních mrtvolek oproti živým včelám. Z výsledků vyšetření individuálních včel i směsných vzorků odebraných v zimním období vyplývá, že vyšší pozitivita je u vzorků zimních mrtvolek v porovnání se živými včelami.

V České republice je vyšetření včel na noseμόzu povinné pro šlechtitelské chovy včelích matek Uzaného chovatelského sdružení včely medonosné kraňské. Každý chovatel musí odebrat v průběhu podzimu nebo zimy vzorek zimních včel, může se jednat o zimní mrtvolky z úlového dna, případně o živé včely. Z každého včelstva se odebírá asi 30 včel, vzorky jsou poté odeslány do akreditované laboratoře. Výsledky vyšetření slouží chovateli jako jeden z parametrů při výběru plemenných a chovných včelstev. Jelikož skutečnost, zda se pro vyšetření použijí živé nebo mrtvé včely ovlivní výsledky vyšetření, je pro vzájemné porovnání včelstev mezi sebou důležité odebrat ze všech včelstev buď živé nebo mrtvé včely. Protože vychází vyšší pozitivita při vyšetření zimních mrtvolek, může být výsledek jejich vyšetření brán jako přísnější kritérium. Tato skutečnost je vhodná pro výběr plemenného materiálu při snaze o šlechtění *Nosema* rezistentních jedinců a také při výběru chovných včelstev, jelikož ta jsou během sezóny vystavena velkému stresu. Výhodou je také skutečnost, že se nemusí utrácet živí jedinci. Pokud je ale cílem zjistit aktuální stav infekce ve včelstvu, vhodnějším typem vzorku jsou živé včely.

8 Literatura

- Adl SM et al. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**:399–451.
- Alaux C, Folschweiller M, McDonnell C, Beslay D, Cousin M, Dussaubat C, Brunet J-L, Conte Y Le. 2011. Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **106**:380–385.
- Ansari MJ, Al-Ghamdi A, Nuru A, Khan KA, Alattal Y. 2017. Geographical distribution and molecular detection of *Nosema ceranae* from indigenous honey bees of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* **24**:983–991.
- Arismendi N, Vargas M, López MD, Barría Y, Zapata N. 2018. Promising antimicrobial activity against the honey bee parasite *Nosema ceranae* by methanolic extracts from Chilean native plants and propolis. *Journal of Apicultural Research* **57**:522–535.
- Bailey L. 1955. The epidemiology and control of nosema disease of the honey-bee. *Annals of Applied Biology* **43**:379–389.
- Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M. 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research* **44** (25) DOI:10.1186/1297-9716-44-25.
- Botías C, Martín-Hernández R, Días J, García-Palencia P, Matabuena M, Juarranz Á, Barrios L, Meana A, Nanetti A, Higes M. 2012. The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology* **14**:845–859.
- Bravo J, Carbonell V, Sepúlveda B, Delporte C, Valdovinos CE, Martín-Hernández R, Higes M. 2017. Antifungal activity of the essential oil obtained from *Cryptocarya alba* against infection in honey bees by *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **149**:141–147.
- Breed M, Cook C, McCreery H, Rodriguez M. 2015. Nestmate Recognition in Eusocial Insects: The Honeybee as a Model System. Pages 147-164 in Aquiloni L, Tricarico N, editors. *Social Recognition in Invertebrates*. Springer International Publishing, Switzerland.
- Burgher-MacLellan KL, Williams GR, Shutler D, MacKenzie K, Rogers REL. 2010. Optimization of duplex real-time PCR with melting-curve analysis for detecting the microsporidian parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*. *The Canadian Entomologist* **142**:271–283.

- Burnham AJ. 2019. Scientific Advances in Controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) Infections in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Frontiers in Veterinary Science* **6** (79) DOI: 10.3389/fvets.2019.00079.
- Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P. 2007. Social Immunity. *Current Biology* **17**:R693–R702.
- Český svaz včelařů, z.s. 2019. Příručka plemenářské práce pro chovatele včelích matek Uzaného chovatelského sdružení včely medonosné kraňské. Praha.
- Damiani N, Fernández NJ, Porrini MP, Gende LB, Álvarez E, Buffa F, Brascesco C, Maggi MD, Marcangeli JA, Eguaras MJ. 2014. Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. *Parasitology Research* **113**:701–709.
- de la Roque S, Rioux JA, Slingenbergh J. 2008. Climate change: effects on animal disease systems and implications for surveillance and control. *Revue Scientifique et Technique* **27**:339–354.
- Dhooria MS. 2016. *Fundamentals of Applied Acarology*. Springer, Singapore.
- Doull KM. 1965. The effects of time of day and method of sampling on the determination of nosema disease in beehives. *Journal of Invertebrate Pathology* **7**:1–4.
- Duquesne V, Gastaldi C, Del Cont A, Cougoule N, Bober A, Brunain M, Chioveanu G, Demicoli N, Paulus PD, Somalo PF, Filipova M, Forsgren E, Granato A, Gurgulova K, Heinikainen S, Kärssin A, Kinduriene I, Köglberger H, Oureilidis K, Ozolina Z, Pijacek M, Ocepek MP, Schäfer MO, Gajger IT, Valerio MJ, Wakefield M, Franco S. 2021. An international inter-laboratory study on *Nosema* spp. spore detection and quantification through microscopic examination of crushed honey bee abdomens. *Journal of Microbiological Methods* **184** (106183) DOI: 10.1016/j.mimet.2021.106183.
- Eiri DM, Suwannapong G, Endler M, Nieh JC. 2015. *Nosema ceranae* Can Infect Honey Bee Larvae and Reduces Subsequent Adult Longevity. *PLoS One* **10** (e0126330) DOI: 10.1371/journal.pone.0126330.
- El-Seedi HR, El-Wahed AAA, Naggar YA, Saeed A, Xiao J, Ullah H, Musharraf SG, Boskabady MH, Cao W, Guo Z, Daglia M, El Wakil A, Wang K, Khalifa SAM. 2022. Insights into the Role of Natural Products in the Control of the Honey Bee Gut Parasite (*Nosema* spp.). *Animals* **12** (3062) DOI: 10.3390/ani12213062.
- El-Shemy AAM, Pickard RS. 1989. *Nosema Apis* Zander Infection Levels in Honeybees of Known age. *Journal of Apicultural Research* **28**:101–106.

- Emsen B, De la Mora A, Lacey B, Eccles L, Kelly PG, Medina-Flores CA, Petukhova T, Morfin N, Guzman-Novoa E. 2020. Seasonality of *Nosema ceranae* Infections and Their Relationship with Honey Bee Populations, Food Stores, and Survivorship in a North American Region. *Veterinary Sciences* **7** (131) DOI: 10.3390/vetsci7030131.
- Ferroglio E, Zanet S, Peraldo N, Tachis E, Trisciuglio A, Laurino D, Porporato M. 2013. *Nosema ceranae* has been infecting honey bees *Apis mellifera* in Italy since at least 1993. *Journal of Apicultural Research* **52**:60–61.
- Formato G, Rivera-Gomis J, Bubnic J, Martín-Hernández R, Milito M, Croppi S, Higes M. 2022. Nosemosis Prevention and Control. *Applied Sciences* **12** (783) DOI: 10.3390/app12020783.
- Forsgren E, Fries I. 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* **170**:212–217.
- Fries I. 1989. Observations on the Development and Transmission of *Nosema Apis* Z. in the Ventriculus of the Honeybee. *Journal of Apicultural Research* **28**:107–117.
- Fries I. 1993. *Nosema Apis* —A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World* **74**:5–19.
- Fries I. 2014. Microsporidia, Honeybees, and Colony Collapse Disorder. Pages 571–578 in Weiss LM, Becnel JJ, editors. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Fries I, Ekbohm G, Villumstad E. 1984. *Nosema Apis*, Sampling Techniques and Honey Yield. *Journal of Apicultural Research* **23**:102–105.
- Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* **32**:356–365.
- Fries I, Chauzat MP; Chen YP, Doublet V, Genersch E, Gisder S, Higes M, McMahon DP, Martín-Hernández R, Natsopoulou M, Paxton RJ, Tanner G, Webster TC, Williams GR. 2013. Standard methods for *Nosema* research. In Dietemann V, Ellis JD, Neumann P, editors. *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. International Bee Research Association, Treforest.
- Fries I, Martín R, Meana A, García-Palencia P, Higes M. 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research* **45**:230–233.
- Fuenfhaus A, Ebeling J, Genersch E. 2018. Bacterial pathogens of bees. *Current Opinion in Insect Science* **26**:89–96.

- Gage SL, Kramer C, Calle S, Carroll M, Heien M, DeGrandi-Hoffman G. 2018. *Nosema ceranae* parasitism impacts olfactory learning and memory and neurochemistry in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology* **221** (jeb161489)
DOI: 10.1242/jeb.161489.
- Gaggia F, Baffoni L, Stenico V, Alberoni D, Buglione E, Lilli A, Di Gioia D, Porrini C. 2015. Microbial investigation on honey bee larvae showing atypical symptoms of European foulbrood. *Bulletin of Insectology* **68**:321–327.
- Genersch E, Aubert M. 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research* **41** (54) DOI: 10.1051/vetres/2010027.
- Gisder S, Genersch E. 2015. Special Issue: Honey Bee Viruses. *Viruses* **7**:5603–5608.
- Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz M-C, Linde A, Genersch E. 2010. Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology* **76**:3032–3038.
- Gisder S, Möckel N, Linde A, Genersch E. 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology* **13**:404–413.
- Gisder S, Schüler V, Horchler LL, Groth D, Genersch E. 2017. Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp. Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7** (301) DOI: 10.3389/fcimb.2017.00301.
- Goblirsch M. 2018. *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* **49**:131–150.
- Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M. 2013. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *PLoS ONE* **8** (e58165) DOI: 10.1371/journal.pone.0058165.
- Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* **94**:211–217.
- Higes M, García-Palencia P, Urbietta A, Nanetti A, Martín-Hernández R. 2020. *Nosema apis* and *Nosema ceranae* Tissue Tropism in Worker Honey Bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Pathology* **57**:132–138.
- Higes M, Martín R, Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**:93–95.

- Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* **10**:2659–2669.
- Holt HL, Grozinger CM. 2016. Approaches and Challenges to Managing *Nosema* (Microspora: Nosematidae) Parasites in Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Journal of Economic Entomology* **109**:1487–1503.
- Hristov P, Shumkova R, Palova N, Neov B. 2020. Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Veterinary Sciences* **7** (166) DOI: 10.3390/vetsci7040166.
- Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RFA. 2012. Survival and immune response of drones of a *Nosemosis* tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**:297–302.
- Huang W-F, Jiang J-H, Chen Y-W, Wang C-H. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* **38**:30–37.
- Huang W-F, Solter LF, Yau PM, Imai BS. 2013. *Nosema ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. *PLoS Pathogens* **9** (e1003185) DOI: 10.1371/journal.ppat.1003185.
- Huang W-F, Solter LF. 2013. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **113**:35–41.
- Hung K-LJ, Kingston JM, Albrecht M, Holway DA, Kohn JR. 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **285** (20172140) DOI: 10.1098/rspb.2017.2140.
- Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS. 2014. Effects of host age on susceptibility to infection and immune gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae*. *Apidologie* **45**:451–463.
- Chemurot M, De Smet L, Brunain M, De Rycke R, de Graaf DC. 2017. *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *European Journal of Protistology* **61**:13–19.
- Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gundencen-Rindal D, Pettis JS. 2009. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**:142–147.
- Joseph J, Santibanez F, Fabiana Laguna M, Abramson G, Kuperman MN, Garibaldi LA. 2020. A spatially extended model to assess the role of landscape structure on the pollination service of *Apis mellifera*. *Ecological Modelling* **431** (109201) DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2020.109201.

- Kába B. 1973. Statistika. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Kamler M, Titěra D. 2015. Monitoring parazitů *Nosema* sp. u včely medonosné v chovech v České republice. Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol.
- Keeling PJ, Fast NM. 2002. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology* **56**:93–116.
- Klee J et al. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**: 1-10.
- Kurze C, Le Conte Y, Dussaubat C, Erler S, Kryger P, Lewkowski O, Muller T, Widder M, Moritz RFA. 2015. *Nosema* Tolerant Honeybees (*Apis mellifera*) Escape Parasite Manipulation of Apoptosis. *PLoS One* **10** (e0140174) DOI: 10.1371/journal.pone.0140174.
- Li JH, Evans JD, Li WF, Zhao YZ, DeGrandi-Hoffman G, Huang SK, Li ZG, Hamilton M, Chen YP. 2017. New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. *PLoS One* **12** (e0187505) DOI: 10.1371/journal.pone.0187505.
- Lourenço AP, Guidugli-Lazzarini KR, de Freitas NHA, Message D, Bitondi MMG, Simões ZLP, Teixeira ÉW. 2021. Immunity and physiological changes in adult honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*: The natural colony environment. *Journal of Insect Physiology* **131** (104237) DOI: 10.1016/j.jinsphys.2021.104237.
- Lüder CGK, Gross U, Lopes MF. 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite–host interactions. *Trends in Parasitology* **17**:480–486.
- Martín-Hernández R et al. 2018. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology* **20**:1302–1329.
- Martín-Hernández R, Higes M, Sagastume S, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Budge GE, Meana A, Boonham N. 2017. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS One* **12** (e0170183) DOI: 10.1371/journal.pone.0170183.
- Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E, Higes M. 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:6331–6338.
- Mattila HR, Harris JL, Otis GW. 2001. Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Sociaux* **48**:88–93.
- Mayack C, Naug D. 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* **100**:185–188.

- Mazur ED, Gajda AM. 2022. Nosemosis in Honeybees: A Review Guide on Biology and Diagnostic Methods. *Applied Sciences* **12** (5890) DOI:10.3390/app12125890.
- Milbrath MO, van Tran T, Huang W-F, Solter LF, Tarpay DR, Lawrence F, Huang ZY. 2015. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **125**:9–15.
- Mrkvička T, Petrášková V. 2006. Úvod do statistiky. Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Mura A, Pusceddu M, Theodorou P, Angioni A, Floris I, Paxton RJ, Satta A. 2020. Propolis Consumption Reduces *Nosema ceranae* Infection of European Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects* **11** (124) DOI: 10.3390/insects11020124.
- Naree S, Ellis JD, Benbow ME, Suwannapong G. 2021. The use of propolis for preventing and treating *Nosema ceranae* infection in western honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1787) workers. *Journal of Apicultural Research* **60**:686–696.
- Natsopoulou ME, McMahon DP, Doublet V, Bryden J, Paxton RJ. 2015. Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282** (20141896) DOI: 10.1098/rspb.2014.1896.
- Naudi S, Raimets R, Jürison M, Liiskmann E, Mänd M, Salkova D, Karise R. 2022. Effect of *Nosema apis* and *N. ceranae* on honey bee *Apis mellifera* queen development. *Acta Morphologica et Anthropologica* **29**:178–182.
- Naug D, Camazine S. 2002. The Role of Colony Organization on Pathogen Transmission in Social Insects. *Journal of Theoretical Biology* **215**:427–439.
- Page RE, Peng CY-S. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology* **36**:695–711.
- Papa G et al. 2022. The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. *Biology* **11** (233) DOI: 10.3390/biology11020233.
- Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I. 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.
- Peng Y, Baer-Imhoof B, Harvey Millar A, Baer B. 2015. Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports* **5** (10565) DOI: 10.1038/srep10565
- Pirk CWW, de Miranda JR, Kramer M, Murray TE, Nazzi F, Shutler D, van der Steen JJM, Van Dooremalen C. 2013. Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. In Dietemann

- V, Ellis JD, Neumann P, editors. The COLOSS BEEBOOK: Volume I: Standard methods for *Apis mellifera* research. International Bee Research Association, Treforest.
- Pohorecka K, Bober A, Skubida M, Zdańska D. 2018. The Spring Assessment of *Nosema* Spp. Infection in Honey Bee Colonies (*Apis mellifera* L.) - Sampling as an Important Aspect of a Reliable Diagnosis. *Journal of Apicultural Science* **62**:61–66.
- Porrini MP, Fernández NJ, Garrido PM, Gende LB, Medici SK, Eguaras MJ. 2011. In vivo evaluation of antiparasitic activity of plant extracts on *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Apidologie* **42**:700–707.
- Ptaszynska AA, Borsuk G, Mullenko W, Demetraki-Paleolog J. 2014. Differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores under Scanning Electron Microscopy (SEM). *Journal of Apicultural Research* **53**:537–544.
- Roberts KE, Evison SEF, Baer B, Hughes WOH. 2015. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports* **5** (10982) DOI: 10.1038/srep10982.
- Roussel M, Villay A, Delbac F, Michaud P, Laroche C, Roriz D, El Alaoui H, Diogon M. 2015. Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydrate Polymers* **133**:213–220.
- Ryba S, Titera D, Schodelbauerova-Traxmandlova Iva and Kindlmann P. 2012. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia* **67**:590–595.
- Sammataro D, Gerson U, Needham G. 2000. Parasitic Mites of Honey Bees: Life History, Implications, and Impact. *Annual Review of Entomology* **45**:519–548.
- Sánchez Collado JG, Higes M, Barrio L, Martín-Hernández R. 2014. Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitology Research* **113**:1695–1701.
- Schmid-Hempel P. 1995. Parasites and social insect. *Apidologie* **26**:255–271.
- Sidor E, Džugan M. 2020. Drone Brood Homogenate as Natural Remedy for Treating Health Care Problem: A Scientific and Practical Approach. *Molecules* **25** (5699) DOI: 10.3390/molecules25235699.
- Simeunovic P, Stevanovic E, Cirkovic D, Radojicic S, Lakic N, Stanisic L, Stanimirovic Z. 2014. *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *Journal of Apicultural Research* **53**:545–554.
- Sinpo C, Paxton RJ, Disayathanoowat T, Krongdang S, Chantawannakul P. 2018. Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis*

- cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *Journal of Insect Physiology* **105**:1–8.
- Smart MD, Sheppard WS. 2012. *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **109**:148–151.
- Smith ML. 2012. The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? *PLoS One* **7** (e43319) DOI: 10.1371/journal.pone.0043319.
- Taric E, Glavinic U, Stevanovic J, Vejnovic B, Aleksic N, Dimitrijevic V, Stanimirovic Z. 2019. Occurrence of honey bee (*Apis mellifera* L.) pathogens in commercial and traditional hives. *Journal of Apicultural Research* **58**:433–443.
- Titěra D. 2017. Včely zdravé a nemocné. Nakladatelství Brázda, s. r. o., Praha.
- Tokarev YS, Huang W-F, Solter LF, Malysh JM, Becnel JJ, Vossbrinck CR. 2020. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *Journal of Invertebrate Pathology* **169** (107279) DOI: 10.1016/j.jip.2019.107279.
- Topolska G, Hartwig A. 2005. Diagnosis of *Nosema apis* infection by investigations of two kinds of samples: dead bees and live bees. *Journal of Apicultural Science* **49**:75–79.
- Traver BE, Fell RD. 2011. *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **107**:234–236.
- Traver BE, Fell RD. 2012. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology* **110**:408–410.
- Truong A-T, Sevin S, Kim S, Yoo M-S, Cho YS, Yoon B. 2021. Rapidly quantitative detection of *Nosema ceranae* in honeybees using ultra-rapid real-time quantitative PCR. *Journal of Veterinary Science* **22** (e40). DOI: 10.4142/jvs.2021.22.e40.
- Vávra J, Larsson JIR. 2014. Structure of Microsporidia. Pages 1–70 in Weiss LM, Becnel JJ, editors. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Wang Y, Ma L-T, Xu B-H. 2015. Diversity in life history of queen and worker honey bees, *Apis mellifera* L. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **18**:145–149.
- World Organisation for Animal Health. 2018. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Chapter 3.2.4. - Nosemosis of honey bees. Available from https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf (accessed January 2023).
- Yadav S, Kumar Y, Jat BL. 2017. Honeybee: Diversity, Castes and Life Cycle. Pages 5–34 in Omkar, editor. *Industrial Entomology*. Springer Nature, Singapore.

Zanet S, Battisti E, Alciati R, Trisciuoglio A, Cauda C, Ferroglio E. 2019. *Nosema ceranae* contamination in bee keeping material: the use of ozone as disinfection method. *Journal of Apicultural Research* **58**:62–66.