

KOMPARACIJA METODA ZA DETEKCIJU MIKROSPORIDIA IZ RODA *Nosema* KOD MEDONOSNE PČELE (*Apis mellifera*)

Uroš Glavinic^{1*}, Aleksandar Stankovic¹, Jevrosima Stevanovic¹,
Predrag Simeunovic¹, Nevenka Aleksić², Zoran Stanimirovic¹

¹ Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

² Katedra za parazitske bolesti, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

Dve vrste mikrosporidija roda *Nosema* uzročnici su nozemoze kod odrasle medonosne pčele: *N. apis* i *N. ceranae*. Za postavljanje dijagnoze i utvrđivanje stepena infekcije koristi se nekoliko mikroskopskih i molekularno-bioloških metoda. Cilj našeg rada bilo je poređenje pouzdanosti tradicionalne mikroskopske metode i dve PCR metode: simplex- i duplex-PCR. Pregledano je ukupno 150 uzoraka pčela. Mikroskopskim pregledom, obavljenim prema preporukama OIE, prisustvo spora *Nosema* utvrđeno je u 68,7% uzoraka. Međutim, simplex-PCR metodom dobijeni su pozitivni rezultati u svih 150 uzorka (100,0%). Sa druge strane, primenom duplex-PCR metode infekcija je ustanovljena kod 84,0 %; u svim slučajevima determinisana je vrsta *N. ceranae*. Veća pouzdanost simplex-PCR metode u odnosu na mikroskopski pregled, kako u otkrivanju infekcije malog intenziteta, kao i mogućnost detekcije vegetativnih oblika nozeme, navodi nas da preporučimo uvođenje simplex-PCR metode kao obavezne za praćenje stanja pčelinjih društava na terenu; time bi se postigla rano utvrđivanje prisustva infekcije i blagovremena prevencija njenog širenja. Specijska identifikacija mikrosporidija roda *Nosema* najjednostavnija je i najisplativija metodom duplex-PCR. Međutim, simplex-PCR ima veću pouzdanost, te preporučujemo da se uzorci koji su negativni na osnovu mikroskopskog pregleda i duplex-PCR analize ispituju i simplex-PCR metodom.

Ključne reči: *Apis mellifera*, *Nosema* sp., mikroskopski pregled, simplex-PCR, duplex-PCR.

^{1*} E-mail: zoran@vet.bg.ac.rs

COMPARISON OF METHODS FOR DETECTION OF MICROSPORIDIA SPECIES OF THE GENUS *NOSEMA* IN HONEY BEES (*APIS MELLIFERA*)

Uroš Glavinić¹, Aleksandar Stanković¹, Jevrosima Stevanović¹,
Predrag Simeunović¹, Nevenka Aleksić², Zoran Stanimirović¹

¹Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

²Department of Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

Abstract

Two microsporidia species of the *Nosema* genus cause nosemosis in the adult honeybee: *N. apis* and *N. ceranae*. For diagnostic purposes and the determination of infection level various microscopic and molecular biological methods are used. The aim of this research was to compare the reliability of the traditional microscopic assessment and two PCR techniques: simplex- and duplex-PCR. Honey bee samples were taken from 150 colonies. Microscopic examination, performed according to the recommendations of the OIE, revealed *Nosema* spores in 68.67% samples analysed, whilst with the simplex-PCR method all samples (100.0%) proved positive. On the other hand, duplex-PCR method used for the identification of *Nosema* species resulted in 84.0% positive samples, all of which were *N. ceranae*. Our recommendation of the simplex-PCR method for the monitoring of honey bees in field conditions is based on its higher reliability than the microscopic assessment in the detection of low-level infections, as well as its potential for the detection of vegetative *Nosema* sp. stages; thus the early detection and timely prevention of *Nosema* infection would be possible. *Nosema* species identification is simplest and most cost-effective if performed with the duplex-PCR analysis. However, the simplex-PCR is more reliable, thus, it is suggested that samples that were negative when assessed with microscopy and duplex-PCR analysis undergo simplex-PCR.

Key words: *Apis mellifera*, *Nosema* sp., microscopic examination, simplex-PCR duplex-PCR.

UVOD

Mikrosporidije roda *Nosema* predstavljaju česte parazite odraslih pčela (Higes i sar. 2010). Do danas su opisane dve vrste koje napadaju medonosne pčele: *Nosema apis* Zander (1909) i *N. ceranae* Fries (1996). Kod evropske me-

donosne pčele (*Apis mellifera*) parazitiraju obe vrste, a kod azijske (*Apis ceranae*) samo *N. ceranae* (Fries i sar., 1996). Tokom poslednjih nekoliko godina otkriveno je da *N. ceranae* dominira u odnosu na *N. apis* kod *A. mellifera* kako u Srbiji (Stevanovic i sar., 2011) i susednim zemljama (Tapasztai i sar., 2009; Tlak-Gajger i sar., 2010; Bacandritsos i sar., 2010), tako i širom sveta (Fries i sar., 2006; Klee i sar., 2007; Paxton i sar., 2007; Williams i sar., 2008; Giersch i sar., 2009; Chen i Huang, 2010). Obe vrste inficiraju epitelne ćelije srednjeg creva pčela, mada izvesni podaci ukazuju da se *N. ceranae* može naći i u drugim tkivima (Chen i Huang, 2010).

Pre otkrića *N. ceranae* smatralo se da je jedini uzročnik nozemoze vrsta *N. apis* (*Office International des Epizooties* - OIE, 2004). U akutnoj fazi bolesti koju ona prouzrokuje karakteriše podrhtavanje pčela radilica, dilatacija abdomena, prisustvo fecesa na saću i ispred košnice, bolesnih ili uginulih pčela u njenoj blizini, zatim smanjenje produkcije legla i veličine pčelinjeg društva, naročito u proleće (Bailey, 1955). Nedavno je ovo oboljenje nazvano „nozemoza tipa A”, a ono koje izaziva *N. ceranae* „nozemoza tipa C” (COLOSS, 2009). Utvrđeno je da se *N. ceranae* i *N. apis* bitno razlikuju po epizootologiji infekcije i patogenosti (Higes i sar., 2010). Karakteristike nozemoze tipa C jesu odsustvo sezonalnosti (uzročnik može da se dokaže tokom cele godine) i kontinuirano uginjavanje pčela (uglavnom izletnica) sa visokim intenzitetom infekcije, što dovodi do očiglednih posledica: depopulacija društva i smanjena produktivnost, a zatim odsustvo kliničkih simptoma pre uginuća, što se objašnjava dugim periodom inkubacije (Higes i sar., 2008).

Prema rezultatima nekih istraživanja, *N. ceranae* može biti uzrok kolapsa pčelinjih društava (colony collapse disorder - CCD), pojave u kojoj jaka društva neobjašnjivo, naizgled iznenada oslabe i najčešće uginu bez ikakvih vidljivih znakova bolesti (Higes i sar., 2008, 2009). Infekcija vrstom *N. ceranae* može da bude uzrok velikih gubitaka u pčelinjem društvu (Martin-Hernandez i sar. 2007; Higes i sar. 2008, 2009). Iz tih razloga značajno je kontinuirano praćenje i blagovremeno otkrivanje uzročnika (pre nego što se primete bilo kakvi problemi), tim pre što za kontrolu nozemoze za sada nema efikasnog preparata (Higes i sar. 2010).

U ovom radu upoređivana je pouzdanost standardnog mikroskopskog pregleda i dveju molekularno-bioloških metoda u detekciji mikrosporidija roda *Nosema*. Molekularne metode detekcije podrazumevaju *in vitro* kloniranje specifičnih sekvenci DNK putem reakcije lančane polimerizacije (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Ispitivana je efikasnost dveju varijanti PCR metode: simplex-PCR (omogućava utvrđivanje prisustva uzročnika) i duplex-PCR (osim detekcije omogućava i određivanje vrste nozeme).

MATERIJAL I METODE RADA

Materijal

Istraživanjem je obuhvaćeno 150 uzoraka pčela *Apis mellifera*, prikupljenih sa pčelinjaka na teritoriji Srbije. Uzorkovanje je obavljeno u skladu sa uputstvima OIE-a (OIE, 2008). Svaki uzorak je sadržao 60 odraslih pčela izletnica sakupljenih sa leta košnice.

Mikroskopska detekcija spora nozeme i kvantifikacija stepena infekcije

Mikroskopski pregled uzoraka pčela u cilju utvrđivanja prisustva spora nozeme obavljen je prema preporukama OIE (2008). Iz svakog uzorka, abdomeni 60 pčela macerirani su u 2-3 ml vode i suspenzija zatim pregledana pod mikroskopom (x400).

Detekcija i determinacija vrste mikrosporidija roda *Nosema* putem PCR metoda

Za izolaciju DNK 1 ml homogenizovane suspenzije spora centrifugiran je 5 min. na 16100 g. Dobijeni talog je tretiran tečnim azotom, zatim izdrobljen sterilnim tučkom i obrađen pomoću seta za izolaciju DNK "DNeasy Plant Mini Extraction Kit" (Qiagen, Cat. No. 69104).

Korišćene su dve PCR metode, simplex-PCR (Stevanović i sar., 2011) i duplex-PCR (Martín-Hernández i sar., 2007). Za spravljanje PCR mešavine i programiranje termalnog PCR režima korišćeni su protokoli detaljno opisani u radu Stevanović i sar. (2011).

PCR amplifikacije obavljene su u aparatu Mastercycler Personal (Eppendorf) i MultiGene Gradient (Labnet International Inc.). Elektroforetska analiza PCR produkata (4 µl amlifikovane DNK) izvedena je na 1,4% agaroznom gelu (1xTBE), nakon čega je obavljeno bojenje etidijum-bromidom i vizuelizacija pod UV svetlošću. Kao marker za određivanje veličine traka izražene u baznim parovima (bp) korišćen je komercijalni O'RangeRuler™ 50bp DNK ladder (Fermentas).

REZULTATI I DISKUSIJA

Od ukupnog broja analiziranih uzoraka (N=150) mikroskopskim pregledom utvrđeno je prisustvo spora roda *Nosema* u 103 uzorka (68,7%), dok je metodom simplex-PCR (Tabela 1, Slika 1) prisustvo mikrosporidija roda *Nosema* utvrđeno u svim uzorcima (100,0%), kako u onima koji su na mikroskopskom pregledu bili pozitivni, tako i u onima koji su bili negativni (Tabela 1). Međutim, duplex-PCR analizom istih uzoraka, obavljenom radi determi-

nacije vrste nozeme, infekcija je dokazana u 126 uzoraka (84,0%), a u preostala 24 (16,0%) rezultat je bio negativan (Tabela 1, Slika 2). Uzorci u kojima je metodom duplex-PCR potvrđena infekcija (N=126) dali su amplikone veličine 218-219 bp, što znači da bili zaraženi samo vrstom *N. ceranae*, dok ni u jednom nisu dobijeni fragmenti dužine 321 bp, što ukazuje na odsustvo *N. apis*. Osim toga, nije zabeležen ni jedan slučaj mešovite infekcija vrstama *N. apis/N. ceranae* (Tabela 1).

Za postavljanje dijagnoze infekcije mikrosporidijama iz roda *Nosema* OIE nalaže mikroskopski pregled suspenzije dobijene maceriranjem najmanje 60 pčelinjih abdomena u 2-3 ml vode, što predstavlja relativno malo razblaženje i omogućava otkrivanje 5% obolelih pčela sa 95% sigurnosti (OIE, 2008). S obzirom da je ova tehnika relativno jeftina i istovremeno veoma pouzdana, može da se smatra metodom izbora za postavljanje dijagnoze nozemoze.

U poslednje vreme sve se češće koriste PCR metode za pregled pčela na prisustvo vrsta mikrosporidija roda *Nosema*. Međutim, prema važećim preporukama OIE-a (2008), PCR tehnika se preporučuje samo za utvrđivanje vrste uzročnika (ispitivanje da li je u pitanju *N. apis* ili *N. ceranae*) u uzorcima kod kojih su mikroskopiranjem dokazane spore. Zbog toga je u ovom radu upoređena pouzdanost mikroskopskog pregleda i dveju PCR metoda u dijagnostici nozemoze. Svi uzorci pčela pregledani su svim trima metodama. Korišćene su dve varijante PCR metode: duplex-PCR (Martín-Hernández i sar., 2007) i simplex-PCR sa prajmerima nos-16S-fw/rv (Stevanović i sar., 2011).

S obzirom da je simplex-PCR tehnikom otkriveno prisustvo mikrosporidija roda *Nosema* u svih 150 analiziranih uzorka, uključujući 47 u kojima mikroskopskom pregledom nije uočena nijedna spora, može se zaključiti da se ovom varijantom PCR metode detektuju i vegetativni oblici nozeme; ovo je od naročitog značaja u prvim danima infekcije, kada nema eliminacije spora, ili je ona vrlo oskudna (Higes i sar., 2007, 2008). Osim toga, simplex-PCR tehnika korišćena u ovom radu pokazala je veću efikasnost od real-time PCR (Bourgeois i sar., 2010) za koju se tvrdi da je veoma senzitivna, jer omogućava dokazivanje infekcije nozemom i kada je u uzorku prisutna makar jedna spora. Osim toga, simplex-PCR je daleko brža i manje skupa od real-time PCR tehnike. Simplex-PCR je pokazao višu efikasnost (100,0%) u poređenju sa duplex-PCR metodom, čija je efikasnost bila 84,0%, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Stevanović i sar., 2011) prema kojima je efikasnost duplex-PCR-a bila 82%. Determinacija vrste primenom simplex-PCR nije moguća bez dalje analize koja podrazumeva digestiju amplikona restrikcionim endonukleazama (PCR-RFLP), čime se dobijaju species-specifični restrikcioni fragmenti (Stevanović i sar., 2011). Međutim, PCR-RFLP je skuplja i zahteva

više vremena i rada u poređenju sa metodom duplex-PCR. Uprkos tome, ukoliko je neophodno da tačnost rezultata diferencijalne dijagnostike *N. apis*/*N. ceranae* bude 100 %, PCR-RFLP predstavlja metodu izbora.

Zaključak

Tradicionalna mikroskopska metoda za utvrđivanje prisustva mikrosporidija roda *Nosema* (protokol OIE) pokazala je znatno manju pouzdanost (68,7%) od molekularno-bioloških metoda detekcije korišćenih u ovom radu, čija je efikasnost bila 84,0% (duplex-PCR), odnosno 100,0% (simplex-PCR). Dobijeni rezultati navode nas da preporučimo da se simplex-PCR uvede kao obavezna metoda za praćenje stanja pčelinjih društava na terenu sa ciljem što ranije detekcije i blagovremene prevencije širenja infekcije nozemom (pre pojave bilo kakvih simptoma). Za potrebe diferencijalne dijagnostike između infekcije vrstom *N. apis* i *N. ceranae* jednostavnija i isplativija metoda je duplex-PCR, ali je pouzdanija simplex-PCR posle koje sledi obrada ampikona restrikcijom enzimima (RFLP).

Zahvalnica

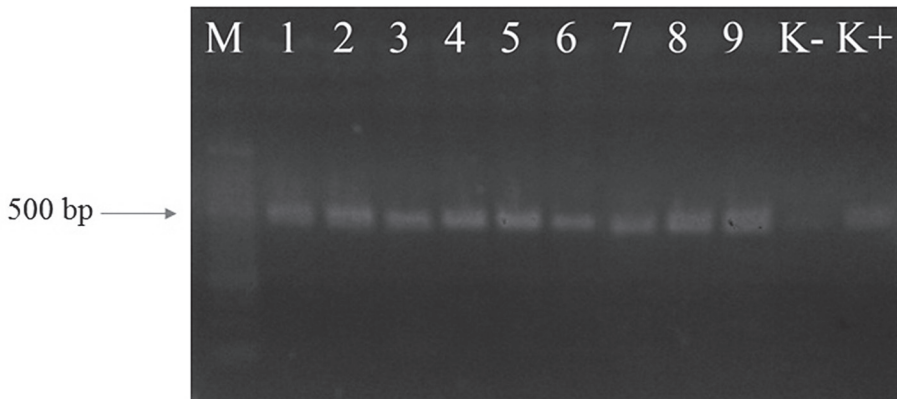
Rad je realizovan u okviru Projekta III46002 koji finansira Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

1. Bacandritsos N., Granato A., Budge G., Papanastasiou I., Roinioti E., Caldon M., Falcaro C., Gallina A., Mutinelli F.: Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105, 335-340, 2010.
2. Bailey L.: The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honeybee. *Annals of Applied Biology*, 43, 379-389, 1955.
3. Bourgeois AL., Rinderer ET., Beaman DL., Danka GR.: Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 53-58, 2010.
4. Chen YP., Huang ZY.: *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie*, 41, 364-374, 2010.
5. COLOSS workshop Conclusions, Proc. Workshop: "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" (COST Action FA0803) 2009; Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

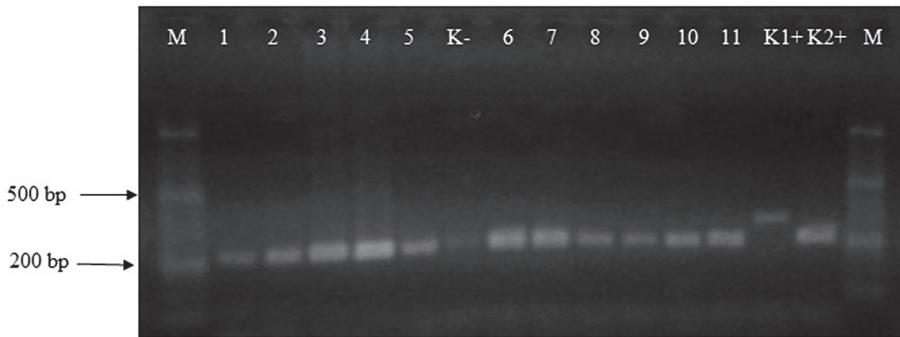
6. Fries I., Feng F., Da Silva A., Slemenda SB., Pieniasek NJ.: *Nosema ceranae* n .sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32, 356–365, 1996.
7. Fries I., Martín R., Meana A., García-Palencia P., Higes M.: Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45, 230–233, 2006.
8. Giersch T., Berg T., Galea F., Hornitzky M.: *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*, 40, 117–123, 2009.
9. Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Garrido-Bailón E., González-Porto AV., Barrios L., Del Nozal MJ., Bernal JL., Jiménez JJ., García-Palencia P., Meana A.: How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659–2669, 2008.
10. Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., González-Porto AV., García-Palencia P., Meana A., del Nozal MJ., Mayo R., Bernal JL.: Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 110-3, 2009.
11. Higes M., Martín-Hernández R., Meana A.: *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41, 375–392, 2010.
12. Klee J., Besana AM., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam DQ., Chinh TX., Puerta F., Ruz JM., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries I., Paxton RJ.: Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 1–10, 2007.
13. Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador AM., Garrido-Bailón E., Higes M.: Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6331-6338, 2007.
14. Office International des Epizooties OIE (2004) Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00123.htm
15. Office International des Epizooties - OIE (2008) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chap. 2.2.4., Nosemosis of Honey Bees, http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSE-MOSIS.pdf.
16. Paxton RJ., Klee J., Korpela S., Fries I.: *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38, 558–565, 2007
17. Stevanovic J., Stanimirovic Z., Genersch E., Kovacevic RS., Ljubenkovic J., Radakovic M., Aleksic N.: Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in

- the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, 42, 49-58, 2011.
18. Tapaszti Z., Forgách P., Kovágó C., Békési L., Bakonyi T., Rusvai M.: First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Veterinaria Hungarica*, 57, 383–388, 2009.
 19. Tlak Gajger I.T., Vugrek O., Grilec D., Petrinc Z.: Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. *Veterinarni Medicina* 55, 457–462, 2010.
 20. Williams GR., Shafer ABA., Rogers REL., Shutler D., Stewart DT.: First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidean parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 189–192, 2008.



Slika 1. Rezultati dobijeni metodom simplex-PCR.

Legenda: Linija M, 50 bp marker; K+, pozitivna kontrola *Nosema* sp.; K-, negativna kontrola; 1-9, PCR produkti uzoraka inficiranih mikrosporidijama roda *Nosema*;



Slika 2. Rezultati dobijeni putem metode duplex-PCR.

Legenda: Linija M, 50 bp marker; K1+, pozitivna kontrola *N. apis*; K2+, pozitivna kontrola *N. ceranae*; K-, negativna kontrola; 1-11, PCR produkti uzoraka inficiranih vrstom *N. ceranae*;

Tabela 1. Rezultati ispitivanja pčela *Apis mellifera* na prisustvo mikrosporidija roda *Nosema*

Metoda	<i>Nosema</i> -pozitivni uzorci (broj i %)		<i>Nosema</i> -negativni uzorci (broj i %)
Mikroskopski pregled	103 (68,7)		47 (31,3)
Simplex-PCR	150 (100,0)		0 (0,0)
Duplex-PCR	126 (84,0)	<i>N. apis</i>	0 (0,0)
		<i>N. ceranae</i>	126 (100,0)
		<i>N. apis/N. ceranae</i>	0 (0,0)
			24 (16,0)

Primljeno: 15.01.2012.

Odobreno: 08.05.2013.