

PRISOTNOST PRAŽIVALI IZ DRUŽINE TRYPANOSOMATIDAE PRI MEDONOSNI ČEBELI V OSREDNJESLOVENSKI REGIJI

Lucija ŽVOKELJ¹, Jerica VREČEK ŠULGAJ¹, Urška ZAJC¹, Metka PISLAK OCEPEK²

Izvleček

Praživali iz družine Trypanosomatidae so med bolj razširjenimi zajedavskimi mikroorganizmi v črevesju gostiteljev. Znano je, da so pogosto prisotne kot eden od patogenov pri večjih izgubah čebeljih družin. Njihova stopnja škodljivosti za medonosno čebelo še ni znana. Vendar pa se predvideva, da kadar je čebelja družina prizadeta zaradi drugih povzročiteljev bolezni, lahko prisotnost mikrobov kot so tripanosomatide, tudi če ti sami zase niso posebej škodljivi, povzroči dodatne bolezenske spremembe. Zadnje čase se povečuje število raziskav, ki izboljšujejo diagnostične metode za določanje dveh, do sedaj znanih predstavnikov družine Trypanosomatidae pri medonosni čebeli, to sta *Crithidia mellificae* in *Lotmaria passim*. Na Veterinarski fakulteti smo v preliminarni raziskavi preverili pojavnost obeh vrst iz družine Trypanosomatidae pri čebeljih družinah v Osrednjeslovenski regiji. Prisotnost *C. mellificae* in *L. passim* v vzorcih čebel smo določali s polimerazno verižno reakcijo (PCR). Poleg Trypanosomatid smo v vzorcih ugotovljali tudi prisotnost še dveh enoceličnih parazitov pri čebelah, *Apicystis bombi* in *Nosema ceranae*. S štetjem števila spor smo določili tudi stopnjo okužbe z *Nosema* spp.. Vsi vzorci medonosnih čebel so bili pozitivni na *N. ceranae*, v 85% vzorcev smo ugotovili *L. passim*, *Crithidia* spp. je bila ugotovljena v 75% vzorcev. 40% vzorcev je bilo pozitivnih na *A. bombi*. Rezultati omogočajo nadaljnje korake pri proučevanju vpliva predstavnikov družine Trypanosomatidae na zdravje in preživetveno sposobnost čebel. Izpostavljamo tudi vprašanje prenosa enega povzročitelja bolezni med različnimi vrstami čebel.

Ključne besede: *Crithidia*, *Lotmaria*, *Apicystis*, molekularna diagnostika, *Nosema*

THE PRESENCE OF TRYPANOSOMATIDAE IN HONEY BEES IN THE CENTRAL SLOVENIAN REGION

Abstract

Trypanosomatids are being recognized as common gut parasites of a wide range of insect species. They are often encountered pathogens in the cases of honey bee colony losses. Little is known about how trypanosomatids affect honey bee health. However, it is assumed the infection of honey bees with one parasite e.g. trypanosomatids may affect their susceptibility to infection by another parasite. Recently, increasing number of studies have improved diagnostic methods for identifying two well-known representatives of the family Trypanosomatidae in honey bees, *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. A preliminary study at the Veterinary faculty about the incidence of both species of the Trypanosomatidae family in the Central Slovenian region was carried out. The presence of *C. mellificae* and *L. passim* in bee samples was determined by polymerase chain reaction (PCR). We also screened bee samples for another two eukariotic unicellular parasites, *Apicystis bombi* and *Nosema ceranae*. *Nosema* spp. spores per bee were determined. All samples were found to be positive for *N. ceranae*, in 85% samples *L. passim* was present, while *Crithidia* spp. was present in 75% of samples. *A. bombi* was detected in 40% of samples. The study allows further investigation with the emphasis on the pathological impacts of the gut parasites on the health of honey bees and also expose trypanosomatids and *A. bombi* as multihost invasive parasites.

Key words: *Crithidia*, *Lotmaria*, *Apicystis*, Molecular diagnostics, *Nosema*

¹ Dr. vet. med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele

² Dr., dr. vet. med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele

UVOD

Bičkarje v črevesju medonosnih čebelah omenjajo že leta 1912 (Morse in Flottum, 1997). *C. mellifica*e so prvič opisali leta 1967 v Avstraliji (Langridge in McGhee, 1967). S prvimi biološkimi poskusi so ugotovili, da ta povzročitelj nima vpliva na zdravstveno stanje čebel in to je bil tudi razlog, da se *C. mellifica*e skoraj 40 let ni omenjalo. Strokovnjaki so postali nanjo pozorni v zadnjih letih, saj so z raziskavami potrdili, da je pogosto prisotna kot eden od patogenov pri večjih izgubah čebeljih družin, kar so lahko ugotavljali šele s sodobnimi diagnostičnimi metodami (Runckel in sod., 2011). Kar nekaj študij je v zadnjih petih letih izpostavilo, da bi lahko *C. mellifica*e, predvsem skupaj z *N. ceranae* precej pripomogla k izgubam čebeljih družin. V Belgiji so skušali povezati izgube čebel v zimskem času s prisotnostjo povzročiteljev bolezni poleti. Ugotovili so, da je v poletnem času poleg *Varroa destructor*, ravno prisotnost *C. mellifica*e, še posebej v kombinaciji z *N. ceranae*, pomemben pokazatelj kasnejših zimskih izgub čebel (Ravoet in sod., 2013).

Ugotovitev, da vrsta *C. bombi* povzroča resne težave družinam čmrljev (Brown in sod. 2000), je dodatno okrepila dvom o neškodljivosti predstavnikov rodu *Crithidia* za medonosne čebele. Leta 2015 (Schwarz in sod.) so z novimi metodami ugotovili, da pravzaprav izolati iz družine Trypanosomatidae ne pripadajo *Crithidii*, temveč novo definirani vrsti t.i. *L. passim*. Danes tako velja, da je, najmanj od leta 2010, prevladujoč predstavnik iz družine Trypanosomatidae pri čebelah, *L. passim*.

Obsežno raziskava o pojavljanju *L. passim* in *N. ceranae* v čebeljih družinah (Vejanovic in sod., 2017) je pokazala, da sta bila povzročitelja skupaj prisotna v 60% preiskanih družin. Večkrat je bilo že potrjeno, da obstaja povezava v stopnji infekcije pri obeh parazitih in tudi v Srbiji so to potrdili. Oba povzročitelja sta črevesna parazita, vendar sta v črevesju prostorsko ločena, *Nosema spp.* parazitira v srednjem črevesju, *L. passim* pa v blatniku (rectumu). Značilno je bila v tej raziskavi stopnja infekcije tako pri *L. passim* kot *N. ceranae* najnižja v poletnih mesecih in najvišja pred in takoj po zimi. To povezujejo z številom mladih čebel; v obdobju, ko se intenzivno povečuje število mladih čebel, se stopnja infekcije s črevesnimi paraziti zmanjšuje.

Nasprotno, pa je tudi precej raziskav, ki nakazujejo, da tako *C. mellifica*e, kot *L. passim* nimata škodljivega vpliva na čebele (Higes in sod., 2016; MacInnis in sod., 2018). Podobno kot pri *Crithidii spp.*, ki ima dokazan negativen učinek na razvoj družin pri čmrljih, ne pa tudi pri čebelah, velja še za enega predstavnika praživali, *Apicystis bombi* (Schmid-Hempel, 2001). Le ta spada med gregarine. O visoki prevalenci le tega pri medonosni čebeli poročajo

iz področij, kjer je povečana uporaba komercialnih družin čmrljev, predvsem vrste *Bombus terrestris* (Plischuk in sod. 2011).

V Sloveniji še nismo dokazali predstavnikov Trypanosomatid pri medonosni čebeli, zato smo najprej preverili, kakšno je stanje štirih črevesnih parazitov v naključno izbranih čebeljih družinah.

MATERIAL IN METODE DELA

V Osrednjeslovenski regiji smo določili 20 lokacij v katerih smo vzorčili pašne čebele. Mesta vzorčenja smo izbrali tako, da so bile lokacije vzorcev enakomerno porazdeljene po celotni regiji. Posamezna lokacija je predstavljala stojišče ali čebelnjak z najmanj petnajstimi čebeljimi družinami. Pred žreli smo vzorčili 60 pašnih čebel in še žive zamrznili ter jih shranili na -20°C. Vzorčili smo družine brez kliničnih znakov bolezni.

Za dokazovanje prisotnosti *A. bombi*, *Crithidia spp.*, *L. passim* in *N. ceranae* v vzorcih čebel, smo izolirali DNA s pomočjo steklenih kroglic (Glass beads, velikost $\leq 106\mu\text{m}$ in $1\mu\text{m}$, Sigma), MagnaLyser-ja (Roche Diagnostics, Nemčija) in komercialnega kompleta za izolacijo DNA »DNA isolation from complex samples« (IMMT, Slovenija).

Za dokazovanje *Crithidia spp.* in *A. bombi* smo uporabili postopek PCR opisan v Meeus in sod. (2010), za dokazovanje *L. passim* pa postopek po Xu in sod. (2018). *Nosema spp.* smo dokazovali po postopku, opisanem v Fries in sod. (2013). Za določanje števila spor *Nosema spp.* smo zadkom 30-ih čebel dodali 30 ml vode in jih zmacerirali v terilnici. Spore smo prešteli s pomočjo hemocitometra (Neubauer) v petih kvadratih s površino 1mm^2 . Število spor na čebelo smo izračunali po formuli:

Št. spor = povprečno št. spor / (4 x 1000000)

REZULTATI Z RAZPRAVO

V tabeli št.1 so prikazani rezultati prisotnosti štirih enoceličnih črevesnih parazitov pri medonosni čebeli v Osrednjeslovenski regiji. Pri vseh 20-ih čebeljih družinah smo dokazali prisotnost spor *N. ceranae*. Število spor/čebelo je znašalo od $1,75 \times 10^6$ pri vzorcu št. 4 do $28,9 \times 10^6$ pri vzorcu št. 18. Največ vzorcev je bilo pozitivnih na *L. passim* (85%), predstavniki rodu *Crithidia* so bili prisotni v 75% vzorcev. *A. bombi* smo dokazali v 40 % vzorcev. Samo 2 vzorca (Ivančna Gorica in Ljubljana Bežigrad) sta bila negativna na oba predstavnika Trypanosomatid, kot tudi vrsto gregarin, *A. bombi*.

Ti rezultati nas ne presenečajo, saj o prisotnosti Trypanosomatidae pri čebelah poročajo raziskovalci iz vseh kon-

Tabela 1: Prisotnost *Crithidia* spp., *L. passim*, *A. bombi* ter števila spor *Nosema* spp./čebelo v vzorcih klinično zdravih čebeljih družin na 20 lokacijah Osrednjeslovenske regije;

Št. vz.	Vrsta parazita	<i>Nosema</i> spp. *106	<i>Crithidia</i> spp.	<i>Lotmaria passim</i>	<i>Apicystis bombi</i>
	Občina				
1.	Lukovica	11,95	+	+	-
2.	Dol pri LJ	14,00	+	+	-
3.	Dol pri LJ2	2,90	+	+	+
4.	Litija	1,75	+	+	-
5.	Šmartno pri Litiji	22,15	+	+	-
6.	Iv. Gorica	6,15	-	-	-
7.	Grosuplje	2,70	+	+	+
8.	Kočevje	10,30	-	+	+
9.	Ribnica	26,40	+	+	+
10.	Velike Lašče	9,00	+	+	-
11.	Iv. Gorica 2	3,95	+	+	+
12.	Vrhnika	20,95	-	-	+
13.	Horjul	15,60	+	+	-
14.	Dobrova-Polhov Gradec	8,25	-	+	-
15.	Domžale	11,75	+	+	-
16.	Kamnik1	13,80	+	+	+
17.	Kamnik2	9,80	+	+	-
18.	Komenda	28,90	+	+	+
19.	Ljubljana Vič	3,60	+	+	-
20.	Ljubljana Bežigrad	7,00	-	-	-

Legenda: povzročitelj dokazan znak +, povzročitelj ni dokazan v vzorcu znak -

tinentov (VanEngelsdorp in sod., 2009; Runckel in sod., 2011; Cornman in sod., 2012; Morimoto in sod., 2013; Ravoet in sod., 2013; Hartmann in sod., 2015; Schwarz in sod., 2015; Stevanovic in sod., 2016).

Število spor *Nosema* spp. je bilo v naših vzorcih večje od 20 x 106 tako pri vzorcih, ki so bili pozitivni na vse

preostale 3 črevesne parazite (npr. vzorec 18), kot tudi pri vzorcu št.12, kjer Trypanosomatid nismo dokazali. Več avtorjev opozarja, da število spor/čebelo od začetka do konca bolezni zelo niha in zato ni bistven, niti zanesljiv, podatek o resnosti okužbe z *N. ceranae* (Higes in sod., 2010; Zheng in sod., 2014; Flemming in sod., 2015).

ZAKLJUČKI

O črevesni mikroflori (mikrobioti), kot o škodljivosti črevesnih parazitov pri čebelah je na razpolago zelo malo raziskav, le te pa so si velikokrat nasprotujoče. Pa vendar moramo poznati zdravo črevesno mikrofloro, da bi lahko govorili o vzrokih za porušenje obrambnega sistema črevesja. Slednje nas zanima, saj je ključno pri pojavu številnih trdovratnih bolezni čebelje družine, kot sta npr. huda in pohlevna gniloba čebelje zalege. Z raziskavo smo usvojili diagnostične metode in preverili pojavljanje črevesnih

parazitov v naključno izbranih čebeljih družinah, ki ne kažejo kliničnih znakov bolezni. V nadaljnjih korakih bomo preverili vlogo različnih prebivalcev črevesja na zdravje čebel in zunanje vplive, predvsem vlogo različnih pašnih virov na mikrobioto pri čebelah.

Pojavljanje istih vrst parazitov, tako pri medonosni čebeli, kot čmrlih nakazuje na pogost prenos povzročiteljev med različnimi vrstami gostiteljev.

ZAHVALA

Avtorice se zahvaljujemo vsem čebelarjem, ki so si vzeli čas, da smo lahko pri njih vzorčili čebele in izkazali pripravljenost za sodelovanje pri raziskovanju čebel in is-

kanju rešitev za izboljšanje zdravstvenega stanja čebeljih družin.

LITERATURA

- Brown M. J. F., Loosli R., Schmid-Hempel P. (2000) Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos*, 91.3: 421-427.
- Cornman R. S., Tarpy D. R., Chen Y., Jeffreys L., Lopez D., Pettis J. S., Evans J. D. (2012) Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*, 7(8): e43562.
- Evans J. D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B. K., Frazier M., ... & Tarpy D. R. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE*, 4(8), e6481.
- Fleming J. C., Schmehl D. R., & Ellis J. D. (2015) Characterizing the impact of commercial pollen substitute diets on the level of *Nosema spp.* in honey bees (*Apis mellifera L.*). *PLoS ONE*, 10(7): e0132014.
- Fries I., Chauzat M. P., Chen Y. P., Doublet V., Gensch E., Gisder S., ... & Paxton R. J. (2013) Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1-28.
- Hartmann U., Forsgren E., Charrière J. D., Neumann P., & Gauthier L. (2015) Dynamics of *Apis mellifera* Filamentous Virus (AmFV) infections in honey bees and relationships with other parasites. *Viruses*, 7(5): 2654-2667.
- Higes M., Rodríguez-García C., Gómez-Moracho T., Meana A., Bartolomé C., Maside X., ... & Martín-Hernández R. (2016) Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC® 30254™) in the presence of *Nosema ceranae*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(3): 05-02.
- Higes M., Martín-Hernández R., & Meana A. (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosmosis. *Apidologie*, 41(3): 375-392.
- Langridge D. F., & McGHEE R. B. (1967) *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. *The Journal of protozoology*, 14(3): 485-487.
- MacInnis C.L., Loung L. T., Schwarz R. S., Guarna M. M., & Pernal S. F. (2018) *Nosema ceranae* and *Lotmaria passim*: partners in crime? Program & abstract book, European Conference of Apidology, Ghent, Belgium: 105-106.
- Meeus I., De Graaf D. C., Jans K., & Smagghe G. (2010) Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *Journal of applied microbiology*, 109(1): 107-115.
- Morimoto T., Kojima Y., Yoshiyama M., Kimura K., Yang B., Peng G., & Kadowaki T. (2013) Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan. *Environmental microbiology reports*, 5(1): 74-77.
- Morse R. A., & Nowogrodzki, R. (1990) Honey bee pests, predators, and diseases (No. Ed. 2). Cornell University Press, p. 718.
- Plischuk S., Meeus I., Smagghe G., & Lange C. E. (2011) *Apicystis bombi* (apicomplexa: neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (hymenoptera: apidae) in Argentina. *Environmental microbiology reports*, 3(5): 565-568.
- Ravoet J., Maharramov J., Meeus I., De Smet L., Wenseleers T., Smagghe G., & De Graaf D. C. (2013) Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE*, 8(8), e72443.
- Runckel C., Flenniken M. L., Engel J. C., Ruby J. G., Ganem D., Andino R., & DeRisi J. L. (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE*, 6(6), e20656.
- Schmid-Hempel, P. (2001) On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften*, 88(4): 147-158.
- Schwarz R. S., Bauchan G. R., Murphy C. A., Ravoet J., de Graaf D. C., & Evans J. D. (2015) Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5): 567-583.
- Stevanovic J., Schwarz R. S., Vejnovic B., Evans

- J. D., Irwin R. E., Glavinic U., & Stanimirovic, Z. (2016) Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: a nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 139: 6-11.
- Vejnovic B., Stevanovic J., Schwarz R. S., Aleksic N., Mirilovic M., Jovanovic N. M., & Stanimirovic Z. (2018) Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*. *Journal of invertebrate pathology*, 151: 76-81.
 - Xu G., Palmer-Young E., Skyrms K., Daly T., Sylvia M., Averill A., & Rich S. (2018) Triplex real-time PCR for detection of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in honey bees. *Parasitology research*, 117(2): 623-628.
 - Zheng H. Q., Lin Z. G., Huang S. K., Sohr A., Wu L., & Chen Y. P. (2014) Spore loads may not be used alone as a direct indicator of the severity of *Nosema ceranae* infection in honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*, 107(6): 2037-2044.

