

***Nosema ceranae* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies**

Gajda A., Laboratory of Bee Diseases, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

*Nosema ceranae* is a new emergent protozoan parasite of *Apis mellifera*, which seems to be more pathogenic than *Nosema apis*. In Poland this parasite has been present since, at least, 1995 and now is an agent of very prevalent honeybee infection. It was found as one of most probable causes of bee colonies collapse world wide. OIE Terrestrial Manual describes a few diagnostic methods: simple nonquantitative, standardized quantitative, and a method which distinguishes *Nosema ceranae* from *Nosema apis*. Control of nose-mosis in honeybee colonies in Europe mainly depends on hygienic management practices.

**Keywords:** *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*, nose-mosis, signs, diagnosis, control.

**N**osemoza pszczół (*nosemosis apium*) znana jest dobrze pszczelarzom, a także lekarzom weterynarii, jako choroba pszczół miodnej (*Apis mellifera*) powodowana przez wewnątrzkomórkowe pasożyty gatunku *Nosema apis* (Eucaryota, Fungi, Microsporea). Obecnie znacznie większy problem w pasiekach europejskich stanowi nowy pasożyt z rodzaju *Nosema*, tzn. *Nosema ceranae*.

**Zarażenie pszczół przez *Nosema apis***

W środowisku zewnętrznym *Nosema apis* występuje w postaci spor, natomiast postać wegetatywna występuje wyłącznie w organizmie pszczoły. Pasożyty te atakują zarówno robotnice i trutnie, jak i matkę (matka otrzymuje spory wraz z pokarmem od karmicielek). Do zarażenia dochodzi *per os*, z pokarmem oraz wodą zawierającymi spory. Warunki fizykochemiczne panujące w jelicie środkowym pszczoły pozwalają sporom kiełkować. Wypuszczają one nić biegunową, przez którą do wnętrza komórki nabłonka jelita środkowego wnika postać wegetatywna pasożyta (1). Tam następuje namnażanie oraz dojrzewanie. Nowo powstałe spory po zniszczeniu komórki nabłonka przedostają się do światła jelita. Wraz z kałem wydalone są na zewnątrz. W jelicie środkowym odbywa się trawienie i wchłanianie pokarmu, dlatego zniszczenie komórek nabłonka prowadzi do upośledzenia tych procesów. Długość życia pszczół może być skrócona, ograniczone jest wytwarzanie mleczka gardzielowego służącego do karmienia larw, produkcja wosku oraz miodu (2). Siła rodziny maleje. Uszkodzenia nabłonka jelita

***Nosema ceranae* w rodzinach pszczoły miodnej**

Anna Gajda

z Pracowni Chorób Owadów Użytkowych Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

często stają się wrotami wnikania wirusów pszczelich, takich jak: wirus choroby czarnych mateczników, wirus Y pszczół i wirus włókienkowy. Pogarszają one znacznie przebieg choroby. Bardzo chore pszczoły zamierają wczesną wiosną, zanim wychowają nowe, młode pszczoły, dlatego w tym okresie dochodzi do ginięcia rodzin. Na wiosnę można również zaobserwować pobrudzenie kałem plastrów lub przedniej ściany ula, co określane jest jako biegunka. Słabsze zarażenie rodzin powoduje jedynie ograniczenie produktywności. W okresie późnej wiosny i lata stopień zarażenia spada. Bardziej szczegółowe informacje dotyczące *N. apis* zostały opisane przez Topolską i Hartwig (3).

**Zarażenie pszczół przez *Nosema ceranae***

W 2005 r. po raz pierwszy stwierdzono u *Apis mellifera* naturalne zarażenie przez *Nosema ceranae*. Wkrótce okazało się, że ten nowy pasożyt, pochodzący od występującej w Azji pszczoły wschodniej (*Apis cerana*) był już wcześniej obecny w rodzinach pszczoły miodnej (4), jednak zarażenie nie było diagnozowane. W Polsce po raz pierwszy został stwierdzony w 2006 r., ale badania próbek zebranych w 1995 r. wykazało, że już wtedy występował w rodzinach pszczelich (5). Obecnie *N. ceranae* jest bardziej rozpowszechniony w Europie niż *N. apis*.

*Nosema ceranae* jest bardziej patogeny dla *A. mellifera* niż *N. apis*. W Hiszpanii stwierdzony był jako główna przyczyna zamierania rodzin pszczelich w komercyjnych pasiekach (6). Duża szkodliwość pasożyta dla pszczoły miodnej wynika z szeregu czynników. Cykl rozwojowy *N. ceranae* trwa jedynie 3 dni (*N. apis* – 5 dni). Aby doszło do rozwoju choroby, wystarczy jedna zarażona komórka nabłonka jelita, przy czym nie jest konieczne ciągłe pobieranie spor przez pszczołę, wystarczy jednorazowa dawka spor.

Meana (7) donosi, iż z jednej zarażonej komórki nabłonka jelita środkowego już po 3 dniach inwazja potrafi się rozprzestrzenić na wszystkie pozostałe komórki nabłonka. Namnażanie pasożyta zachodzi nie tylko w komórkach nabłonka palisadowego, ale także w komórkach krypt regeneracyjnych, co uniemożliwia regenerację

nabłonka i prowadzi do nieodwracalnych uszkodzeń przewodu pokarmowego (8). We wszystkich zarażonych komórkach nabłonka jelita pojawiają się zmiany patologiczne, zaznacza się zwyrodnienie oraz rozległa liza komórek – w efekcie komórki nabłonka są uszkodzone lub obumarłe. Prowadzi to do wczesnej śmierci pszczoły – już ósmego dnia od zarażenia, podczas gdy przy zarażeniu *N. apis* długość życia pszczoły może być skrócona o połowę, a według niektórych autorów pozostaje niezmienną. Śmierć jest wynikiem powstałego w organizmie stanu głodu prowadzącego do stresu energetycznego. Z głodowaniem tym ściśle związane jest rozprzestrzenianie się choroby wewnątrz rodziny. Pszczoły głodne szukają kontaktu z innymi osobnikami, które potencjalnie podzielą się z nimi pokarmem. Kontakty takie znacznie przyspieszają rozprzestrzenianie się spor między pszczołami.

Najnowsze badania wykazują (9), że *N. ceranae* wykształciła lepsze mechanizmy adaptacji do temperatury otoczenia niż *N. apis*. W skrajnych dla rozwoju tego pasożyta temperaturach (25 i 37°C) *N. ceranae* potrafi zamknąć cykl życiowy, podczas gdy u *N. apis* zostaje on zahamowany. W temperaturze optymalnej natomiast (33°C) *N. ceranae* jest w stanie zniszczyć 2–3 razy więcej komórek niż *N. apis*, co jasno dowodzi większej patogenności tej pierwszej. Jednocześnie *N. ceranae* powoduje chorobę trwającą cały rok, natomiast choroba powodowana przez *N. apis* zanika w ciepłych miesiącach. Przy zarażeniu *N. ceranae* nie obserwuje się jednak biegunki, która występuje przy zarażeniu *N. apis*, dlatego nosemoza ta zwana jest „suchą”.

Oznaki choroby nie są widoczne dopóki matka jest w stanie wyrównać straty pszczół poprzez intensywne składanie jaj – czerwienie. Po długim okresie braku objawów choroby następuje gwałtowny spadek liczebności pszczół w rodzinie. Pszczoły często giną poza ulem, co, jak uważają naukowcy z USA, może być wynikiem tego, że pszczoły chore mają gorszą pamięć oraz podejmują większe ryzyko w poszukiwaniu pokarmu, ponieważ odczuwają głód (10). Udowodniono, że procent zarażonych pszczół w przypadku *N. ceranae* jest znacznie wyższy niż przy nosemozie powodowanej przez *N. apis*.

Tabela 1. Przebieg zarażenia *N. ceranae* w rodzinie pszczoły miodnej (4)

Pora roku faza choroby	Wiosna – wczesna jesień faza bezobjawowa	Późna jesień – zima faza wyrównywania siły	Kolejna wiosna – lato fałszywe ozdrowienie	Jesień – wiosna depopulacja
Zmiany w liczbie pszczół	pszczoły w normalnej ilości	pszczoły w normalnej ilości	bardzo dużo pszczół	pozostaje garstka pszczół z matką
Zmiany w ilości czerwiu	czerw w normalnej ilości	zwiększona ilość czerwiu w stosunku do pory roku	prawie każda ramka pełna czerwiu	obecna nieduża ilość czerwiu
Inne cechy choroby	brak objawów choroby	matka czerwi w ziemie	mimo znacznej siły rodziny pszczoły się nie roją	obecne zapasy pokarmu
Procent zarażonych zbieraczek	<65%	≥65%	<65%	≥65%
Procent zarażonych pszczół w ulu	<40%	<40%	<40%	≥40%
Liczba spor na pszczołę	<10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup>	<10 <sup>6</sup>	>10 <sup>6</sup> jesienią 1 <sup>6</sup> –2 <sup>6</sup> wiosną

Tę samą prawidłowość zaobserwowano w przypadku jednoczesnego zarażenia pszczół obu gatunkami *Nosema*.

#### Cztery fazy zarażenia *N. ceranae*

Naukowcy hiszpańscy, którzy pierwsi wykryli obecność *N. ceranae* w Europie i dotychczas opublikowali najwięcej prac dotyczących tego pasożyta, wyodrębnili cztery fazy w przebiegu inwazji (6).

Faza 1 (tab. 1) jest bezobjawowa. Zarażone rodziny wyglądają podobnie jak zdrowe (przynajmniej od wiosny do wczesnej jesieni). Liczba stwierdzanych spor nie przekracza 10<sup>6</sup> na pszczołę. Liczba zarażonych pszczół zbieraczek nie przekracza 65%.

Faza 2 została nazwana fazą wyrównywania siły rodziny. Ma ona miejsce jesienią i zimą, kiedy liczba czerwiu powinna osiągać minimum. Jednak w chorej rodzinie matka, chcąc wyrównać straty pszczół, zaczyna intensywnie czerwić. Liczba czerwia jest podwyższona w stosunku do pory roku. Fakt, że faza ta ma miejsce zimą, kiedy jest mało młodych, niezarażonych pszczół, może tłumaczyć, dlaczego liczba spor na pszczołę oraz procent zarażonych zbieraczek jest zawsze wyższy niż w fazie 1 (≥65%).

Faza 3 (fałszywe ozdrowienie) zaczyna się z kolejną wiosną, kiedy liczba pszczół w rodzinie szybko rośnie, a matka zaczyna prawie każdą ramkę. Duża liczba pszczół sugerowałaby, że dojdzie do ich wyrojenia, jednak to nigdy nie następuje. Obraz mikroskopowy oraz procent zarażonych zbieraczek przedstawia się podobnie jak w fazie 1, czyli poziom zarażenia jest relatywnie niewielki.

Faza 4 – „gorączka” czerwienia, którą obserwujemy w fazie 3 kończy się nagle jesienią lub kolejną wiosną, kiedy chora rodzina się osypuje. W ulu pozostaje garstka pszczół i prawie nietkniętymi zapasami pokarmu. Jeśli depopulacja nastąpi jesienią, wtedy, podobnie jak w fazie 2, stopień zarażenia jest bardzo wysoki (≥65%

zbieraczek jest zarażonych, a liczba spor na pszczołę przekracza 10<sup>6</sup>), natomiast, jeśli dojdzie do tego wiosną, liczba spor oraz procent zarażonych pszczół będzie znacznie niższy (w związku z dużą liczbą młodych niezarażonych pszczół).

W efekcie często się zdarza, że rodziny, które rozwijają się według pszczelarza normalnie i są wręcz silne, zupełnie niespodziewanie słabną i zamierają. Wymienione objawy, towarzyszące utracie rodzin, są takie jak przy zespole ginięcia rodzin pszczelich (colony collapse disorder – CCD), który był bardzo często obserwowany w USA, gdzie w ostatnich 3 latach co roku ginęło 30–36% rodzin pszczelich.

#### Przebieg zarażenia *N. ceranae* w pasiece

Zdrowe rodziny przebywające w pobliżu chorych mogą łatwo zostać zarażone. Prócz tradycyjnych dróg transmisji pasożyta (skażone plasty, rabunki, miód, syrop, pyłek, pierzga, błędnie pszczoł, matki z zarażonych hodowli) może on być również rozprzestrzeniany przez samego pszczelarza pomiędzy ulami na nieodkażonym sprzęcie oraz przez nieprzemysłane przenoszenie plastrów itp. Materiał genetyczny *N. ceranae* stwierdzono w gruczołach gardzielowych pszczoły, w których wytwarzane jest mleczko pszczele służące do karmienia larw oraz wydzielina zawierająca enzymy biorące udział w powstawaniu miodu z nektaru. Być może stwarza to dodatkowe drogi transmisji pasożyta z wydzieliną tychże gruczołów.

Przebieg nosemozy powodowanej przez *N. ceranae* nie wszędzie jest równie drastyczny. W niektórych krajach Europy choroeba ta przebiega łagodnie i nie powoduje tak ogromnych strat rodzin pszczelich, jak w Hiszpanii (11). Jest to prawdopodobnie spowodowane odmiennymi warunkami klimatycznymi w różnych częściach kontynentu. W Polsce jednak pasożyt ten powoduje znaczne straty pszczół (9), tak jak na przykład zimą 2007/2008 roku, kiedy

w kraju zginęło około 15,3% rodzin pszczelich. Wówczas w 32% badanych pasiek, z których nadesłano do badania pszczoły z zamarych rodzin, stwierdzono silne i bardzo silne zarażenie *Nosema* spp., przy czym głównie był to pasożyt *N. ceranae*. Zimą 2008/2009 r., upadki były już znacznie mniejsze (8,7%), jednak wciąż *N. ceranae* pozostawał jedną z głównych ich przyczyn. W 60% pasiek stwierdzono wówczas ciężkie zarażenie przez *Nosema* spp., z czego w 87% pasiek odnotowano obecność *N. ceranae* (12).

#### Diagnostyka zarażenia *Nosema* spp.

Opis metod diagnostycznych wydany, przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt – OIE (13) w celu różnicowania zarażenia *N. ceranae* i *N. apis*, zaleca **łańcuchową reakcją polimerazy (PCR)**. W celu przygotowania próbki do badania należy rozetrzeć 10–20 odwłoków starszych pszczół z 10 ml wody destylowanej (PCR grade). Zawiesinę filtruje się i odwirowuje w 800 g przez 6 minut. Aby możliwa była ekstrakcja DNA, należy wywołać kielkowanie spor w 200 µl świeżo przygotowanego buforu (0,5M NaCl i 0,5M NaHCO<sub>3</sub> o pH 6 osiągniętym przez dodanie kwasu ortofosforowego). Mieszaninę należy inkubować w 37°C przez 15 minut. Ekstrakcję DNA można z łatwością przeprowadzić, używając rutynowych procedur lub komercyjnych zestawów do tego przeznaczonych, takich jak High Pure Template Preparation Kit (nr kat. 1796828, Roche Diagnostic).

Multiplex PCR przeprowadza się w 50 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 5 µl badanego DNA, 25 µl High Fidelity PCR Master Mixture (nr kat.: 12140314001, Roche Diagnostic), 0,4 µM każdego primera, 0,4 mM każdego dNTP, 3 mM chloroku magnezu, 0,2 mg/ml albuminy surowicy bydłowej, 0,1% Tritonu X-100. Warunki, w jakich przebiega amplifikacja są następujące: wstępny krok aktywujący w 94°C przez 2 minuty, następnie 10 cykli



Ryc. 1. Obraz mikroskopowy preparatów sporządzonych z próbek pszczół zarażonych (A) *Nosema apis* i (B) *Nosema ceranae* (pow. 1000×)

o następujących parametrach – 15 s w 94°C, 30 s w 61,8°C i 45 s w 72°C. Kolejne 20 cykli przebiega w następujących warunkach: 15 s w 94°C, 30 s w 61,8°C oraz 50 s (plus pięciosekundowe przedłużenie dla każdego kolejnego cyklu) w 72°C. Końcowe wydłużanie produktów odbywa się w 72°C przez 7 min. Należy zawsze pamiętać o kontroli negatywnej dla każdego badania. Elektroforezę produktów PCR przeprowadza się w 2% żelu agarozowym z dodatkiem TAE (Tris-Acetate EDTA) oraz bromku etydyny w standardowym buforze TAE. Do przeprowadzenia reakcji PCR potrzebne są następujące startery: dla *N. ceranae* – 218MITOC FOR (5'-CGGCGACGATGTGATATGAAA-ATATTAA-3') oraz 218MITOC REV (5'-CCCGGTCATTCTCAAACA-AAA-AACCG-3') amplifikujące produkt o długości 218–219 bp, a dla *N. apis* – 321APIS FOR (5'-GGGGGCATGTCTT-TGACGTACTATGTA-3') oraz 321APIS REV (5'-GGGGGGCGTTTAAAATGT-GAAACAATATG-3') amplifikujące produkt o długości 321 bp.

W celu wykrycia zarażenia *Nosema* spp. wystarczy metoda jakościowa. Materiałem do badania są również pszczoły zbieraczki powracające do ula. Pszczoły należy utrwalić w 4% formalinie lub 70% spirytusie przemysłowym, ewentualnie zamrozić. Odwłoki 60 pszczół rozciera się w moździerzu z 2–3 ml wody (podana ilość wody wydaje się zbyt mała w przypadku pszczół zamrożonych<sup>1</sup>). Następnie należy nanieść 3 krople zawiesiny na szkiełko podstawowe i przykryć

nakrywkowym. Preparat oglądać należy pod powiększeniem 400 razy. Spory *N. apis* są długości 5–7 µm i szerokości 3–4 µm. Spory *N. ceranae* są nieco mniejsze i delikatniejsze, mają cygarowaty kształt i cieńszą ścianę (ryc. 1). Różnice między sporami obu gatunków są widoczne, jednak tylko dla osób bardzo wprawnych w badaniu, i nie dają pewności prawidłowego rozpoznania. Dlatego w celu różnicowania gatunków zalecana jest jednak metoda PCR.

Do oceny stopnia zarażenia sporami *Nosema* spp. zalecana jest standaryzowana metoda ilościowa. 10 odwłoków starszych zbieraczek (powracających do ula) należy rozetrzeć w moździerzu z pięcioma mililitrami wody. Zawiesinę następnie filtruje się przez 2 warstwy muślinu bawełnianego. Moździerz oraz tłuczek należy przepłukać kolejnymi pięcioma mililitrami wody, a popłuczyny przefiltrować przez ten sam materiał. Uzyskany filtrat wiruje się przez 6 min w 800 g. Po zlanii supernatantu do pozostałego osadu dodaje 10 ml wody. Za pomocą pipety Pasteura należy rozprowadzić osad w wodzie aż do ujednoczenia barwy roztworu. 2–3 krople zawiesiny nanosi się na hemocytometr, przykrywa szkiełkiem nakrywkowym i ogląda pod powiększeniem 400 razy. Spory liczyć należy w każdym kwadracie. Jedna spora w dużym kwadracie (przy użyciu hemocytometru 25×16 kwadratów) odpowiada 10 000 spor w pszczole. Obecnie przeważa pogląd, że liczba pszczół pobierana do badania w tej

metodzie jest zbyt niska. Hiszpańscy badacze zalecają, aby do oceny stopnia zarażenia przez *N. ceranae* pobierać około godziny 12. 30 pszczół zbieraczek powracających do ula.

Najnowsze badania wykazały, że stopień zarażenia przez *N. ceranae* nie może być wiarygodnie określony na podstawie badania liczby spor przypadających na pszczołę, ponieważ badanie to nie uwzględnia form rozwojowych pasożyta, które w bardzo dużej ilości występują w komórkach nabłonka jelitowego (6). Dlatego bardziej wskazane jest określenie udziału zarażonych pszczół w próbce złożonej z przynajmniej 30 pszczół zbieraczek (na podstawie badania indywidualnego pszczół).

### Zwalczanie zarażenia

Przez kilka dziesięcioleci do zwalczania nosemozy u pszczół stosowano preparaty antybiotyczne oparte na fumagilinie. Od kilku lat w Europie obowiązuje całkowity zakaz stosowania fumagiliny. Jest to spowodowane faktem, że brak ustalonych wartości MRL dla pozostałości fumagiliny w produktach pszczelich. Fumagilina hamuje rozwój pasożytów z rodzaju *Nosema*. Liczba spor *N. ceranae* w pszczołach z leczonych rodzin spada o około 70%, jednak po kilku miesiącach wraca do poziomu wyjściowego (14, 15). Jeszcze w ubiegłym roku fumagilina była stosowana w Hiszpanii.

Metody zwalczania zarażenia *N. ceranae*, podobnie jak przy zarażeniu przez *N. apis*, opierają się głównie na zabiegach higieniczno-hodowlanych (3). Wiosną należy przesiedlić pszczoły do czystego, dezynfekowanego, wyraźnie oznakowanego ula (co ogranicza błędzenie pszczół). W ciągu sezonu pszczelarskiego natomiast należy wymieniać stopniowo wszystkie plastry tak, aby jesienią nie było w ulu żadnych plastrów z poprzedniej zimy. Należy też bezwzględnie pamiętać o tym, że nie wolno przenosić plastrów z rodzin chorych do zdrowych oraz należy dezynfekować sprzęt pszczelarski używany w rodzinie zarażonej (3). Inne polecane zabiegi wspomagające zdrowienie rodziny to wymiana na młodą i zdrową matkę, ustawienie ula w nasłonecznionym i osłoniętym od wiatru miejscu.

Na polskim rynku ukazały się dwa niebędące lekami preparaty wspomagające zdrowie pszczół. Według niektórych doniesień (14, 16, 17) w przypadku zastosowania w rodzinach z *N. ceranae* ich skuteczność w ograniczaniu zarażenia jest porównywalna (nieco mniejsza) ze skutecznością fumagiliny. Są to: Api Herb (Biofaktor) – preparat ziołowy i Nozevit (Nozevit

1 Uwaga autorki.

International) – preparat na bazie wyciągów z kory drzew. W podsumowaniu należy dodać, że jak na razie walka z zarażeniem jest trudna i często nie daje oczekiwanych efektów.

Badacze włoscy (18) zainteresowali się zastosowaniem tymolu przy zwalczaniu nosemozy. Z dotychczasowych badań wynika, że pomaga on ograniczać zarażenie, jednak, aby uzyskać bardziej precyzyjne dane, potrzebne są dalsze badania.

## Piśmiennictwo

- Chen Y., Evans J., Smith I., Pettis J.: *Nosema ceranae* is a long-present and wide spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invert Pathol.* 2008, **97**, 186-188.
- Topolska G., Kasprzak S.: Pierwsze przypadki zarżenia pszczół w Polsce przez *Nosema ceranae*. *Medycyna Wet.* 2007, **63**, Suplement.
- Topolska G., Hartwig A.: Choroby pszczół objęte wytycznymi Międzynarodowego Urzędu do spraw Epizootii. Część V. Nosemoza. *Życie Wet.* 2003, **78**, 335-338
- Paxton R., 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* 2007, **38**, 558-565.
- Topolska G., Gajda A.: Presence of *Nosema apis* in honeybee colonies in Poland. Proc. *COLOSS Workshop: New Molecular Tools*, Bern, May 2009.
- Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Garrido-Bailón E., González-Porto A., Barrios L., del Nozal M., Bernal J., Jimenez J., García-Palencia P., Meana A.: How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environm. Microbiol.* 2008, **10**, 2659-2669.
- Meana A.: Histopathology of *Nosema* infected bees. *COLOSS Workshop: Nosema disease: Lack of knowledge and work standardization*. Guadalajara, 19-22 October, 2009.
- Kasprzak S., Topolska G.: *Nosema ceranae* (Eukaryota: Fungi: Microsporea) – nowy pasożyt pszczoły miodnej *Apis mellifera*; *Wiad. Parazyt.* 2007, **53**, 281-284.
- Fenoy S., Rueda C., Higes M., Martín-Hernández R., del Aguila C.: High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environm. Microbiol.* 2009, **75**, 6886-6889.
- Naug D.: Physiological and behavioral changes in *Nosema* infected bees: a model to understand colony collapse. *COLOSS Workshop: Nosema disease: Lack of knowledge and work standardization*. Guadalajara, 19-22 October, 2009.
- Higes M., Martín R., Meana A.: *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invert. Pathol.* 2006, **92**, 93-95.
- Topolska G., Gajda A., Pohorecka K., Bober A., Kasprzak S., Skubida M., Semkiw P.: Winter colony losses in Poland. *J. Apic. Res.* 2010, **49**, 126-128.
- OIE *Manual For Terrestrial Animals* 2008; Chapter 2. 2. 4.: Nosemosis of honeybees.
- Nanetti A.: Api Herb as an alternative product to treat *Nosema* infection. *COLOSS Workshop: Nosema disease: Lack of knowledge and work standardization*. Guadalajara, 19-22 October, 2009.
- Williams G., Sampson M., Shutler D., Rogers R.: Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)?. *J. Invert. Pathol.* 2008, **99**, 342-344..
- Thrasivoulou A., Geirgios G., Chrysoula T., Elisavet L.: Attempts to control *Nosema ceranae* in Greece. *41 Kongres Apimondii*, Montpellier 2009.
- Topolska G., Gajda A., Hartwig A.: Polish honey bee colony-loss during the winter of 2007/2008. *J. Apicult. Sci.* 2008, **52**, 95-104.
- Costa C.: Thymol: an alternative treatment for control of *Nosema ceranae*? *COLOSS Workshop: Nosema disease: Lack of knowledge and work standardization*. Guadalajara, 19-22 October, 2009.

Anna Gajda, Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa