

Siirt ve Şanlıurfa'da Bulunan Bal Arılarında Nosemosis Etkenlerinin Moleküler Teşhisi

Osman Yaşar TEL¹, Songül ÖTKÜN^{2*}, Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE¹, Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK¹, Oktay KESKİN¹

¹ Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa

² Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Siirt

* Sorumlu yazar: songul.otkun@siirt.edu.tr

Geliş Tarihi: 24.04.2021 Düzeltme Geliş Tarihi: 07.09.2021 Kabul Tarihi: 13.10.2021

Öz

Nosemosis bal arılarında (*Epis mellifera*) sıkça görülen küresel bir hastalıktır. Hastalığın etkeni fungal mikroorganizmalar olan *Nosema apis* ve *Nosema ceranae*'dir. Bu çalışmada Siirt ve Şanlıurfa'da bal verimi düşük ve zayıf (popülasyonu düşük) arı kolonilerinde *Nosema* spp. sporlarının varlığının mikroskopik olarak muayene edilmesi ve pozitif bulunan örneklerden, multipleks PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ile etkenin tür düzeyinde tespiti amaçlandı. Her iki ilde toplam 8 arılıkta 44 kovandan alınan 880 arı numunesi mikroskopik olarak spor varlığı yönünden incelenmiş ve 19'unda (%43,18) nosema sporları tespit edilmiştir. Multipleks PCR ile bu sporların tamamının *N. ceranae* olduğu belirlendi. Sonuç olarak, nosemosis'in bölgede arıcılık işletmelerinde önemli bir problem olduğu, bu nedenle nosemosis yönünden gerekli tedbirlerin alınması gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Multiplex PCR, *Nosema ceranae*, nosemosis, arıcılık.

Molecular Identification of Nosemosis Agents in Honeybees Found in Siirt and Sanliurfa

Abstract

Nosemosis is a global disease seen frequently in honey bees (*Epis mellifera*). The etiologic agents of the disease are *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, which are fungal microorganisms. In this study, we aimed to detect the disease agent at species level in bee colonies in which honey production was poor (low population) in Siirt and Şanlıurfa. For this purpose, the presence of spores of *Nosema* spp. was examined microscopically and positive samples were tested by multiplex polymerase reaction. A total of 880 bee samples from 8 apiaries and 44 hives in both provinces were examined microscopically and 19 out of 44 hives (43,18%) were found as positive for the presence of spores of *Nosema*. All the spores were belong to *N. ceranae* by multiplex PCR. As conclusion, we thought that nosemosis is an important problem in honey bees apiaries in Siirt and Şanlıurfa and in this context, required prevention measures should be taken for nosemosis.

Key words: Multiplex PCR, *Nosema ceranae*, nosemosis, beekeeping.

Giriş

Arıcılık, gerek bal ve arı sütü, polen, arı zehri gibi diğer ürünlerinin ekonomik değeri, gerekse yapmış oldukları polinasyon nedeniyle büyük önem taşır (Abacı ve ark., 2020). Türkiye'de 2019 yılında arılı kovan sayısı 8.128.360 iken 2020 yılında 8.179.085'e (%0.6 artış) çıkmıştır. Ancak arılı kovan sayısına paralel olarak bal üretiminde artış olmamış aksine 2019'da 109.330 ton olan bal üretimi %4.8'lik düşüşle 104.077 ton olmuştur (Anomin, 2021). Arıların verim düşüklüğünde rol

oynayan biyotik ve abiyotik birçok faktör bulunmaktadır (Grupe ve Quandt, 2020). Türkiye'de bitki florasının çeşitli ve iklimin de uygun olmasına rağmen istenilen verim seviyesine ulaşamamasının en büyük nedenleri koloni yönetiminin ve hastalıklarla mücadelenin yeterli olmamasından kaynaklanmaktadır (Büyük ve ark., 2014).

Türkiye ve dünyada bal arılarında (*Apis mellifera*) görülen en yaygın hastalıklardan biri olan nosemosis hastalığı, bal veriminde kayda değer düşümlere ve önemli ekonomik kayıplara neden

olan ölümcül bir hastalıktır (Tosun ve ark., 2019; Sinpoo ve ark., 2018; Yaman ve ark., 2015). Nosemosis hastalığına neden olduğu tespit edilmiş etkenler *Nosema apis* ve *Nosema ceranae*'dir (Chemurot ve ark., 2017). Bu mikroorganizmalar yakın zamanda mantar olarak sınıflandırılan (moleküler filogenetik analiz) hücreiçi ökaryotik mikrosporidianlardır (Han ve Weiss, 2017). Bu türlerin spor morfolojisi, genom boyutu, sıcaklığa uyum sağlama kabiliyeti ve konakçı üzerindeki patolojik etkileri bakımından farklılık göstermekle birlikte her iki türün neden olduğu arı ölümlerinde önemli bir farklılık görülmemektedir. Ancak *N. apis*'in neden olduğu nosemosise tip A, *N. ceranae*'nin neden olduğu nosemosise tip C hastalık olarak adlandırılmaktadır (Martín-Hernández ve ark., 2018; Forsgren ve Fries, 2010; Hges ve ark., 2010).

Nosemosise neden olduğu belirlenmiş etkenlerin morfolojik yapılarında farklılıklar olmasına rağmen, bunları ışık mikroskopunda ayırt etmek zordur bu nedenle PCR tanıda önemli bir teşhis aracıdır (Chemurot ve ark., 2017; Fries ve ark., 2006; Huang ve Solter, 2013). Ayrıca mikroskopik analizler düşük yoğunluktaki sporları tespit etmede yetersiz kalmakla birlikte zaman alıcı, maliyetli ve zahmetlidir. *N. apis* ve *N. ceranae*'i tespit etmek için multipleks PCR kullanımı yüksek duyarlılık, özgüllük gibi birçok avantajından dolayı geleneksel mikroskopiye göre nosemosis tanısında daha önemlidir (Hamiduzzaman ve ark., 2010; Martín-Hernández ve ark., 2007).

Nosemosisin moleküler teşhisi, son yıllarda bal arılarında yeni nosema türlerinin tespit edilmesiyle daha da önemli hale gelmiştir (Higes ve ark., 2006; Chemurot ve ark., 2017). Hastalık dünyada ve Türkiye'nin birçok bölgesinde araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda *N. apis* ve *N. ceranae* tespit edilmiş olup (Szalanski ve ark. 2014; Whitaker ve ark. 2011), son yıllarda yapılan araştırmalarda genellikle sadece *N. ceranae* tespit edilmiştir (Kartal ve ark., 2021; Ütük ve ark., 2019; Mohammadian ve ark., 2018; Büyük ve ark., 2017).

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde nosemosis araştırılmıştır. Ancak yapılan kaynak taramasında Şanlıurfa ve Siirt bölgelerinde moleküler çalışmaya rastlanamadı. Bu araştırmada Şanlıurfa ve Siirt bölgelerinde sabit arıcılık yapan işletmelerde nosemosis yönünden tarama yapılarak mikroskopik olarak inceleme ile pozitif bulunan numunelerden multipleks PCR ile nosemosise neden olan etkenlerin tür düzeyinde (*N. apis* ve *N. ceranae*) belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Örnekler

Çalışmanın materyali 2021 yılı Mart ayında Siirt ve Şanlıurfa illeri ve çevrelerinde bulunan 1220 kovanın incelenmesi sonunda temin edilmiştir. Siirt'ten 4 arı işletmesinden hasta 26 kovanın her birinden 20 adet toplam 520 ölü arı numunesi alınmıştır. Aynı şekilde Şanlıurfa'dan 4 arı işletmesinden 18 hasta kovanın her birinden 20 adet toplam 360 ölü arı numunesi alındı. Toplanan 880 arı numunesi mikroskopik teşhis ve PCR analizi testleri yapıncaya kadar kuru ve rutubetsiz bir ortamda muhafaza edildi.

Spor Tanısı

Nosemosisin teşhisi amacıyla 20 arının abdominali ayrılarak 3 mL serum fizyolojik içerisinde ezildi.

Numune süspansiyondan preparat hazırlanarak örnekler direkt ve Giemsa boyama yapılarak incelendi. Direkt incelemede, oluşan süspansiyondan 3 damla kadar alınarak bir lam üzerine konuldu ve üzerine bir lamel kapatılarak ışık mikroskopunda (40X) sporlar araştırıldı. Giemsa boyama için örnekler oda ısısında kurutuldu ve metanolde tespit edildikten sonra Giemsa boyama yapılarak ışık mikroskopunda (40X) spor yönünden incelendi.

Nosema sporları yönünden pozitif bulunan örnekler kullanıncaya kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi

DNA Ekstraksiyonu

Örneklerden DNA ekstraksiyonu OIE (Terrestrial Manual 2008)'nin bildirdiği yöntemle yapıldı. Mikroskopide pozitif bulunan numunelerin süspansiyonunda 1 mL alındı ve filtrelenerek 1,5 mL'lik tüplere aktarıldıktan sonra 800 xg'de 6 dakika santrifüj edildi. Pelet taze hazırlanmış 200 µl germinasyon buffer (0,5 M sodyum klorür, 0,5 M sodyum hidrojen karbonat, ortofosforik asit ile pH 6.0) ile iyice karıştırılarak 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda beklenilmeden DNA ekstraksiyon aşamasına geçildi. Hedef DNA elde edilmesinde, germinasyon işlemi sonunda numune 800 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldıktan sonra dipte kalan tortudan GeneJET Genomik DNA Purifikasyon kiti (Thermo Scientific) ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bütün işlemler kit prosedürüne göre yapılarak elde edilen DNA'lar PCR'de kullanıncaya kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi

PCR Aşaması

Polimeraz zincir reaksiyonunda Martín-Hernández ve ark. (2007) tarafından bildirilen

multipleks PCR için tasarlanmış, *N. ceranae* ve *N. apis*'in 16S rRNA genine spesifik primer çiftleri kullanıldı (Çizelge 1.).

Toplam 50 µL'lik hacimde hazırlanan PCR karışımına 5 µL 10X PCR tamponu, 3 mM MgCl₂, 0,4 µM her bir primer'den, 0,4 mM DNTP, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase enzimi, 2,5 µL template DNA ve final konsantrasyonu 50 µL olacak şekilde sudan oluştu.

PCR amplifikasyonunda 95°C'de 2 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben, 10 PCR

siklusu, 94°C'de 15 saniye (sn), 61,8°C'de 30 sn, 72°C'de 45 sn ve son 20 PCR siklusu, 94 °C'de 15 sn, 61,8°C'de 30 sn, 72°C'de 50 sn. artı her ardışık döngü için 5 saniyelik uzama döngüsü şeklinde yapılmıştır. Son siklusu takiben 72°C'de 7 dakika son uzama işlemi yapıldı.

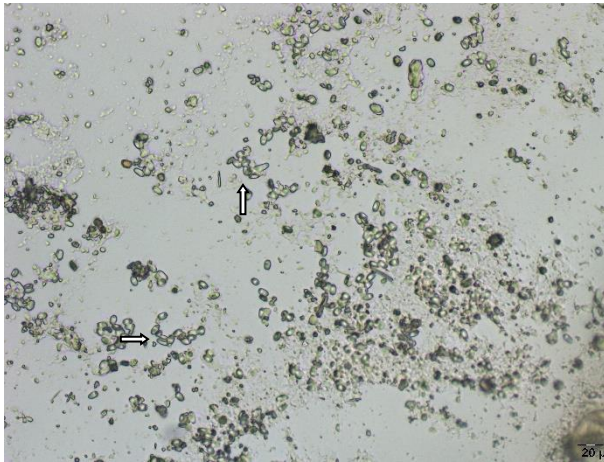
Oluşan ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek ethidium bromide ile boyanıp, UV transilluminatörde spesifik bantların varlığı izlendi.

Çizelge 1. Multipleks PCR'da kullanılan primerler ve özellikleri

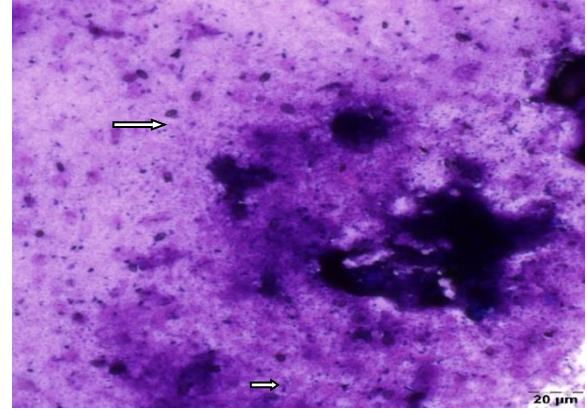
Primer	Primerin DNA dizilimi (5'-3')	Hedef gen bölgesi	Spesifite	Ürün büyüklüğü (bp)
218MITOC-FOR	CGGCGACGATGTGATATGAAAAATATTA	16S rRNA	<i>N. ceranae</i>	218-219
218MITOC-REV	CCC GGTCATTCTCAAACAAAAACCG			
321APIS-FOR	GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA	16S rRNA	<i>N. apis</i>	321
321APIS-REV	GGGGGGCGTTAAAAATGTGAAACAACATG			

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada Siirt ve Şanlıurfa'da noseiosis varlığı mikroskopik ve moleküler olarak araştırılmıştır. Siirt ilinde 4 aralığın tamamında ve Şanlıurfa ilinde 4 aralığın ikisinde Nosema sporları tespit edilmiştir (Şekil 1 ve Şekil 2).



Şekil 1. Direkt incelemede nosema sporları (40X)



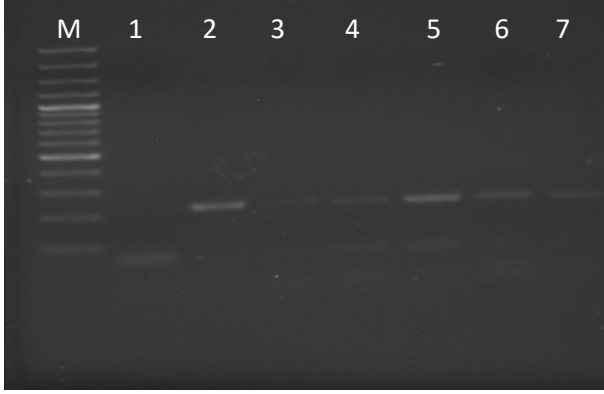
Şekil 2. Giemsa boyama ile nosema sporları (40X)

Siirt ilinde numune alınan aralıklarda hasta olan 26 kovandan alınan ölü arı numunelerinin mikroskopik ve moleküler olarak incelenmesi sonucunda %46,15 oranında noseiosis varlığı bulundu. Şanlıurfa'dan numune alınan 18 hasta kovanda noseiosis %38,88 oranında saptandı. Her iki ilde toplam 1220 kovanın incelenmesi sonucunda incelenen 44 kovanda noseiosis yoğunluğu %43,18 olarak hesaplandı (Çizelge 2).

Çizelge 2. Siirt ve Şanlıurfa bölgesindeki bazı aralıklarda noseiosis yoğunluğu

Siirt	Numune alınan kovan sayısı	Nosemalı kovan sayısı	Noseiosis oranı %	Şanlıurfa	Numune alınan kovan sayısı	Nosemalı kovan sayısı	Noseiosis oranı %
A Aralık	7	2	28.57	A Aralık	5	0	0
B Aralık	7	3	42.85	B Aralık	7	4	57.14
C Aralık	6	3	50	C Aralık	4	3	75
D Aralık	6	4	66.66	D Aralık	2	0	0
Toplam	26	12	46.15	Toplam	18	7	38.88

Mikroskopide nosema yönünde pozitif bulunan numuneler tür düzeyinde Nosema teşhisi için multipleks PCR ile incelendi ve numunelerin tamamında *N. ceranae* için pozitif bantlar (218-219 bp) tespit edildi (Şekil 3). Yapılan çalışmada Şanlıurfa ve Siirt illerinde incelenen kovanlarda *N. apis* tespit edilemedi.



Şekil 3. PCR’de *N. ceranae*’nin için 218-219 bp bantlar. (M: Marker, 1: Negatif kontrol. 2:Pozitif kontrol, 3,4,5,6,7: Pozitif örnekler)

Nosemosis bal arılarında görülen küresel bir hastalıktır (Duquesne ve ark., 2021). Hastalığın etkenleri *N. apis*, *N. ceranae* ve yine nosemosise neden olduğu düşünülen *N. neumannii* dir (Chemurot ve ark., 2017). Türkiye’de de hastalık görülmekle birlikte, bu çalışmada *N. apis* ve *N. ceranae*’nin Siirt ve Şanlıurfa ilinde moleküler olarak tespiti amaçlandı. Sunulan bu çalışmada, mikroskopide pozitif bulunan numunelerin tamamı multipleks PCR ile *N. ceranae* olarak belirlendi, numunelerin hiçbirinde *N. apis* bulunamadı.

Dünyada ve Türkiye’de nosemosis tespitine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Türkiye’de *N. ceranae*’nin ilk moleküler teşhisi Ütük ve ark. (2010) tarafından yapılmıştır. Shumkova ve ark. (2018) Bulgaristan’da yaptıkları çalışmada 3 bölgeden 108 numune nosemosis yönünden moleküler olarak incelenmiş hastalığın yoğunluğu %52,77 olarak bulunmuş olup sadece *N. ceranae* tespit edilmiştir. Benzer şekilde İran’da Mohammadian ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada farklı bölgelerden 183 arı kovanını nosemosis yönünden incelemiş ve prevalansı %46,40 oranında bulmuşlardır. Araştırmacılar tüm numunelerin *N. ceranae* yönünden pozitif olduğunu ve *N. apis*’in bulunmadığını bildirmişlerdir. Hasta kovanlardan alınan numunelerin nosemosis yönünden incelendiği çalışmada 44 kovanın 19’unda (%43,18) mikroskopik ve moleküler olarak nosemosis teşhisi konulmuştur. Bu bulgular pozitiflik oranı ve etken yönünden diğer çalışmalara benzer olarak

görülmüştür (Shumkova ve ark., 2018; Mohammadian ve ark., 2018). Ayrıca Ordu bölgesinde Yaman ve arkadaşlarının nosema prevalansı amacıyla yaptıkları çalışmada 10 bölgeden 200 arı mikroskopik olarak incelenmiş nosemosis %44 oranında bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen pozitiflik oranına yakın bir nosemosis oranı bildirilen çalışmada tür düzeyinde teşhis yapılmamıştır (Yaman ve ark., 2015).

Büyük ve ark. (2017) , Kırşehir genelinde arılıklarda yaptıkları nosema taramasında %21,56 oranında pozitiflik belirlemiş ve tür düzeyinde teşhiste sporların tamamı, bu çalışmanın sonucuna benzer olarak sadece *N. ceranae* belirlenmiştir. Bu araştırmacıların bildirdiği pozitiflik düzeyine göre yaklaşık olarak iki katı kadar nosemosis pozitiflik saptanan bu çalışmada, büyük farklılığın nedeninin çalışmada sadece hasta kovanlardan numune alınmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tunca ve ark. (2016), Türkiye’de 2011–2012 yılları arasında 11 farklı bölgeden (İzmir, Aydın, Muğla, Tekirdağ, Kırklareli, Zonguldak, Artvin, Isparta, Adana, Konya, Kırşehir) 99 arı kovanından yaptıkları çalışmada 8 bölgede nosema sporları teşhis etmişler ve sunulan bu çalışmanın sonucuna benzer olarak PCR ile tamamını *N. ceranae* bulduklarını bildirmişlerdir. Kartal ve ark. (2021) Muğla bölgesinde yaptıkları çalışmada çalışmamıza benzer olarak sadece *N. ceranae* türü tespit edilmiş olup nosemosis prevalansı %71,53 oranında bulunmuştur. Siirt ve Şanlıurfa’ya göre Muğla’da hastalık yoğunluğunun yüksek olmasında iklim ve arı popülasyonu yoğunluğundan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

Siirt ilindeki numune alınan hasta kovanlarda nosemosis %46,15 oranında, Şanlıurfa’da ise numune alınan hasta kovanlarda nosemosis oranı %38,88 olarak bulundu. Ayrıca Siirt ilinde numune alınan arılıkların tamamında Nosema sporları görülmüş olup Şanlıurfa’da numune alınan arılıkların yarısında Nosema sporları tespit edildi. Her iki il arasında Nosema hastalığı oranındaki bu farklılığın nedeninin Siirt ilinde Şanlıurfa’ya göre arıcılık faaliyetlerinin daha yoğun bir şekilde yapılması ve Siirt’teki numune alınan arı işletmelerinin birbirine yakın olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç

Bu çalışmada elde edilen verilere göre Türkiye’nin birçok bölgesinde olduğu gibi Şanlıurfa ve Siirt ilinde de nosemosisin yaygın olduğu ve *N. ceranae*’nin dünyada ve Türkiye’nin birçok bölgesinde olduğu gibi Siirt ve Şanlıurfa’da da baskın tür olduğu sonucuna varıldı.

Teşekkür: Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (HÜBAP) tarafından 18079 proje numarası ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

Abacı, N.İ., Abacı, S.H., Bıyık, S. 2020. Forecast for the Number of Colonies and Honey Yield in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(2), 464-470.

Anonim, 2021. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Hayvansal Üretim İstatistikleri, Aralık 2020. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Aralik-2020-37207> (erişim tarihi: 22.04.2021).

Büyük, M., Tunca, R.İ., Taşkın, A. 2014. Türkiye’de Nosema spp. Varlığına Yönelik Yapılmış Çalışmalar. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1(2), 234-238.

Büyük, M., Tunca, R.İ., Taşkın, A. 2017. Kırşehir İlindeki Arıliklarda Nosema Hastalığının Belirlenmesi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji dergisi*, 5(1), 1-5.

Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R., de Graaf, D.C. 2017. Nosema neumanni n. sp.(Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, Apis mellifera in Uganda. *European journal of protistology*, 61, 13-19.

Duquesne, V., Gastaldi, C., Del Cont, A., Cougoule, N., Bober, A., Brunain, 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.

Forsgren, E., Fries, I. 2010. Comparative virulence of Nosema ceranae and Nosema apis in individual European honey bees. *Veterinary parasitology*, 170(3-4), 212-217.

Fries, I., Martin, R., Meana, A., García-Palencia, P., Higes, M. 2006. Natural infections of Nosema ceranae in European honey

bees. *Journal of Apicultural Research*, 45(4), 230-233.

- Grupe, A.C., Quandt, C.A. 2020. A growing pandemic: A review of Nosema parasites in globally distributed domesticated and native bees. *PLoS pathogens*, 16(6), e1008580.
- Hamiduzzaman, M.M., Guzman-Novoa, E., Goodwin, P.H. 2010. A multiplex PCR assay to diagnose and quantify Nosema infections in honey bees (Apis mellifera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2), 151-155.
- Han, B., Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *The fungal kingdom*, 97-113.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A. 2010. Nosema ceranae in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41(3), 375-392.
- Higes, M., Martín, R., Meana, A. (2006). Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology*, 92(2), 93-95.
- Huang, W.F., Solter, L.F. 2013. Comparative development and tissue tropism of Nosema apis and Nosema ceranae. *Journal of invertebrate pathology*, 113(1), 35-41.
- Kartal, S., Tunca, R. İ., Özgül, O., Karabağ, K., Koç, H. 2021. Microscopic and molecular detection of nosema sp. in the Southwest Aegean Region. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 21(1), 8-20.
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M.A., Soroker, V., Higes, M. 2018. Nosema ceranae in Apis mellifera: a 12 years postdetection perspective. *Environmental microbiology*, 20(4), 1302-1329.7.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailón, E., Higes, M. 2007. Outcome of colonization of Apis mellifera by Nosema ceranae. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6331-6338.
- Mohammadian, B., Bokaie, S., Moharrami, M., Nabian, S., Forsi, M. 2018. Distribution of Nosema Spp. in climatic regions of Iran. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 9, No. 3, p. 259). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- OIE, Terrestrial Manual 2008. Nosemosis of honey bees. In: *Manual of Diagnostic Tests and*

- Vacines for Terrestrial Animals, Chapter 2.2.4, pp. 410-414.
- Shumkova, R., Georgieva, A., Radoslavov, G., Sirakova, D., Dzhebir, G., Neov, B., Bouga M., Hristov, P. 2018. The first report of the prevalence of *Nosema ceranae* in Bulgaria. *PeerJ*, 6, e4252.
- Sinpoo, C., Paxton, R.J., 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.
- Szalanski, A.L., Tripodi, A.D., Trammel, C.E. 2014. Molecular detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* from southwestern and south central USA feral Africanized and European honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Florida Entomologist*, 97(2), 585-589.
- Tosun, O., Bekircan, Ç., Yıldırım, H.B. 2019. The Presence and Distribution of Nosemosis Disease in Turkey. *Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 2(2), 71-84.
- Tunca, R.I., Oskay, D., Gosterit, A., Tekin, O.K. 2016. Does *Nosema ceranae* wipe out *Nosema apis* in Turkey?. *Iranian journal of parasitology*, 11(2), 259.
- Ütük, A.E., Aliyeva, R., Girisgin, A.O., Gökmen, T.G., Özüiçli, M., Aydın, L. 2019. First molecular detection of *Nosema ceranae* in Azerbaijan. *Journal of Apicultural Research*, 58(4), 559-561.
- Ütük, A.E., Pişkin, F.Ç., Kurt, M. 2010. Türkiye’de *Nosema ceranae*’nin ilk moleküler tanısı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 57, 275-278, 2010.
- Whitaker, J., Szalanski, A.L., Kence, M. 2011. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. *Apidologie*, 42(2), 174-180.
- Yaman, M., Yarılgaç, E.Ş., Güner, B.G., Ertürk, Ö. 2015. Ordu yöresi bal arılarında *Nosemosis* hastalığının varlığı ve dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39, 47-51.