



## The Most Important Etiological Agent of Nosema Disease in Honey Bees: *Nosema ceranae*

Mehmet Nuri AÇIK<sup>1\*</sup>

### Article info:

Received: 24.01.2023  
Accepted: 07.03.2023

Article type: Review

### Keywords:

*Nosema ceranae*, Honey bee,  
Nosema disease

### Abstract

Microsporidia are a group of obligate intracellular fungi that infect many vertebrates and invertebrates, including bees. *Nosema ceranae* and *Nosema apis* are the two most common types of microsporidia that infect honey bees and cause Nosema disease. Although both *Nosema* species infect the intestines of honey bees, they differ in morphological and genetic characteristics and show different epidemiological, clinical and pathological effects in natural environments. Currently, *N. ceranae* is the most important and common etiologic agent of Nosema disease worldwide. This agent can cause the bees to lose their mobility, decrease the honey yield in the hive, shorten the life span of the bees, decrease the ability of the sick bees to raise offspring, increase the winter losses due to the shortened life span of the worker bees, decrease the egg laying rate of the seriously ill queen and even die within a few weeks. Presenting current data on *N. ceranae*, which is the primary cause of Nosema disease, which causes great economic losses in beekeeping, is of great importance in terms of planning effective fight and control strategies against this pathogen.

**Citation:** Açıık, M.N. 2023. The most important etiological agent of Nosema disease in honey bees: *Nosema ceranae*. International Journal of Food Agriculture and Animal Sciences, 3 (1): 24-39.

## Bal Arılarında Nosema Hastalığının En Önemli Etiyolojik Ajanı: *Nosema ceranae*

### Makale Bilgileri:

Geliş Tarihi: 24.01.2023  
Kabul Tarihi: 07.03.2023

Makale türü: Derleme

### Anahtar kelimeler

*Nosema ceranae*, Bal  
arısı, Nosema hastalığı

### Öz

Mikrosporidia'lar, arılar da dâhil olmak üzere birçok omurgalı ve omurgasız hayvanı enfekte eden zorunlu hücre içi mantar grubudur. *Nosema ceranae* ve *Nosema apis* bal arılarını enfekte ederek Nosema hastalığına neden olan en yaygın iki Mikrosporidia türüdür. Her iki *Nosema* türü de bal arılarının bağırsaklarını enfekte etse de, morfolojik ve genetik özellikler bakımından farklılık gösterirler ve doğal ortamlarda farklı epidemiyolojik, klinik ve patolojik etkiler gösterirler. Şuanda *N. ceranae* bütün dünyada Nosema hastalığının en önemli ve en yaygın etiyolojik ajanıdır. Bu etken, arıların hareket yeteneklerinin kaybına, kovadaki bal veriminin azalmasına, arıların yaşam sürelerinin kısılmasına, hasta arıların yavru yetiştirme yeteneğinin azalmasına, işçi arıların ömür uzunluğu kısaltıldığından kış kayıplarının artmasına, ağır şekilde hasta olan ana arının yumurtlama hızının azalmasına hatta birkaç hafta içinde ölmesine neden olabilmektedir. Arıcılıkta büyük ekonomik kayıplara neden olan Nosema hastalığının primer etkeni olan *N. ceranae* ile ilgili güncel verilerin ortaya konması, bu patojen ile etkili mücadele ve kontrol stratejilerinin planlanması açısından büyük önem arz etmektedir.

**Atf:** Açıık, M.N. 2023. Bal arılarında Nosema hastalığının en önemli etiyolojik ajanı: *Nosema ceranae*. Uluslararası Gıda Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi, 3 (1): 24-39.

<sup>1</sup> Corresponding author, <https://orcid.org/0000-0002-1908-5898>, Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 12000, Bingöl-Türkiye, mehmetnuriacik@bingol.edu.tr.

## Giriş

Son yıllarda dünyanın birçok ülkesinde, habitatların tahrip edilmesi, yoğun pestisit kullanılması, küresel iklim değişiklikleri ve hastalıklara bağlı olarak arı popülasyonunda ciddi düşüşler söz konusudur (Neov vd., 2019). Meydana gelen bu azalma ciddi çevresel, agronomik ve ekonomik sonuçların yanı sıra farklı bitki ve mahsullerin tozlaşmasını da riske atmaktadır (Klatt vd., 2014). Arı popülasyonunun azalmasında bakteri, virüs, parazit ve mantarların neden olduğu enfeksiyöz hastalıklar önemli rol oynamaktadır (Chantawannakul vd., 2015; Kalayci vd., 2020). Günümüzde bal arılarını etkileyen en yaygın enfeksiyöz hastalıkların başında, tek hücreli fungal mikrosporidian parazitlerin iki farklı türü olan *Nosema apis* ve *Nosema ceranae*'nin neden olduğu Nosema hastalığı gelmektedir (Fries, 1993, 2010; Cengiz ve Yazıcı, 2018). Son zamanlara kadar hastalığın primer etkeni olarak bilinen ve Nosema tip A'dan sorumlu olan *N. apis*, orta derecede virülansa sahip olup, arı kolonileri genellikle uygun çevresel koşullar altında herhangi bir tedaviye gerek kalmadan iyileşebilmektedirler (Fries, 1993; Paxton vd., 2007). Ancak 2006 yılında *N. apis*'e göre daha ciddi zararlara hatta ölümlere ve koloni çökmelerine sebep olabilen *N. ceranae* türü tanımlanmıştır (Higes vd., 2006). Nosema tip C'den sorumlu olan *N. ceranae*, bal üretiminde azalma, güçsüzlük ve herhangi bir semptomun görülmediği kolonilerde mortalite artışı ile ilişkilendirilmiştir (Paxton, 2010; Holt ve Grozinger, 2016). Ayrıca *N. ceranae*; bağırsak absorpsiyonunu bozarak karbonhidrat ve lipid metabolizmasının bozulmasına, yiyecek arama davranışlarının değişmesine, hareket yeteneği kaybına, arıların yaşam sürelerinin kısalmasına, immün sistemin baskılanmasına hatta hastalığın ilerleyen dönemlerinde koloni çöküşlerine neden olabilmektedir (Antúnez vd., 2009; Macías-Macías vd., 2020). Bu etkenin üreme döngüsü, konakçı sindirim sistemine girdikten kısa bir süre sonra başlar. Orta bağırsak lümeninde çimlenmeyi takiben meydana gelen sporoplazma, konakçı hücre sitoplazmasına girer. Hücre içinde çoğalan ve gelişimini tamamlayan etkenler hücre lizis yoluyla orta bağırsak lümenine salınarak olgun sporlara dönüşürler. Bu aşamada olgun sporlar, ya bağırsak hücrelerine girerek üreme döngüsü tekrar eder ya da dışkıyla çevreye atılırlar (Gisder vd., 2010b; Texier vd., 2010). *Nosema ceranae* hakkında daha fazla bilgi elde etmek için son yıllarda büyük çaba harcanmasına rağmen, hastalığın epidemiyolojisi, patolojisi, profilaksi ve tedavisi için daha yoğun bilimsel çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu derlemede son güncel veriler ışığında *N. ceranae* ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmektedir.

## Tarihçe ve Taksonomi

İpekböceklerinde patojen olarak ilk keşfedilmelerinden bu yana Mikrosporidia'lar, insan, balık ve böcekler dahil olmak üzere omurgalı ve omurgasızlarda birçok bulaşıcı hastalığın kaynağı olarak tanımlanmıştır (Wasson ve Peper, 2000; Schuster vd., 2022). Entomopatojenik Mikrosporidia'ların büyük çoğunluğu *Nosema* cinsi içerisinde yer almaktadır (Becnel ve Andreadis, 1999). Şuana kadar tanımlanan 40 *Nosema* türü olmasına rağmen bal arılarında hastalıklara neden olan üç önemli *Nosema* türü bulunmaktadır (Fries, 1993; Fries vd., 1996; Chemurot vd., 2017). Bunlardan biri olan *N. apis* sporları, Avrupa bal arılarında 19. yüzyılın ortalarında keşfedildi ve parazit resmi olarak 1909 yılında Zander tarafından tanımlandı (Zander, 1909). Son yıllara kadar bal arılarında Nosema hastalığının tek etkenin *N. apis* olduğu ve bütün dünyada yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir (Fries, 1993). Ancak 1994 yılında Asya bal arılarında Nosema hastalığına neden olan diğer bir tür olan *N. ceranae*, Fries vd. (1996) tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra bu etkenin Avrupa bal arılarında varlığı 2006 yılında bildirilmiştir (Higes vd., 2006). Üçüncü bir Mikrosporidia türü olan *N. neumannii* ise yakın zamanda

Uganda bal arılarında keşfedilmiştir (Chemurot vd., 2017). Bu etkenin dünyadaki dağılımı, arılarda meydana getirdiği patolojik değişiklikler, morbidite ve mortalite oranları ile ilgili henüz yeterli bilgi söz konusu değildir.

### Morfoloji

*Nosema ceranae*'nin moleküler ve morfolojik özellikleri, ilk olarak Fries vd. (1996) tarafından tarif edilmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan birçok çalışmada genel olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir (Chen vd., 2009). Işık mikroskobu ile yapılan incelemeler, taze *N. ceranae* sporlarının oval veya çubuk şeklinde olduğu,  $4,4 \pm 0,41$  µm uzunluğunda ve  $2,2 \pm 0,09$  µm genişliğinde olduğu belirlenmiştir (Fries vd., 1996; Chen vd., 2009). *Nosema apis* sporları (6µm x 3µm) ile karşılaştırıldığında, *N. ceranae* sporlarının boyutu daha küçüktür (Mazur ve Gajda, 2022).

Elektron mikroskobu ile yapılan ultrastrüktürel incelemeler *N. ceranae*'nin, *Nosema* cinsinin tüm yapısal özelliklerini taşıdığını göstermektedir (Ptaszyńska vd., 2014a). Yapılan incelemeler *N. ceranae*'nin gelişim aşamalarının tümünde sporoplazmanın merkezinde diplokaryotik bir çekirdeğe sahip olduğunu göstermektedir. Hücre membranı tarafından sarılan sporoplazmanın en dış katmanında elektron-yoğun ekzospor ve elektron-saydam endospordan oluşan iki katlı bir hücre duvarı bulunmaktadır. Ekzospor granüler proteinlerden, endospor alfa kitin ve proteinlerden meydana gelmiştir. Ribozom, polar tüp, arka vakuol, polaroplast gibi iç yapılar sporun ön kısmında bulunmaktadır (Chen vd., 2009; Ptaszyńska vd., 2014a). Polaroplastın arka kısmı ön kısımdan daha gevşek düzenlenmiştir ve veziküler polaroplast olarak adlandırılır. Enfeksiyonla ilişkili en belirgin organel polar tüptür. Polar tüpün üçte biri ya da yarısı düz, geri kalanı sporoplazmanın etrafında bir spiral şeklinde bükülmüştür. Spirallerin sayısı ve düzeni ve spirallerin eğim açısı, *Nosema* türlerini ayırt etmek için önemli bir taksonomik kriterdir. *Nosema ceranae* sporlarındaki spiral sayısının 18-21, *N. apis*'te ise bu sayının 30'dan fazla olduğu rapor edilmiştir (Chen vd., 2009; Hatjina vd., 2011).

### Bulaşma

*Nosema* bir mide-bağırsak hastalığı olduğundan, fekal-oral yolla indirekt bulaşma, hastalık bulaşmasının en yaygın kabul gören hipotezi haline gelmiştir (Smith, 2012). Ayrıca *Nosema* sporları ağızdan ağıza besinlerin alınmasıyla oral-oral yolla bulaşabildiği gibi, kontamine vücut tüylerinin ya da peteklerin temizlenmesi esnasında trofalaksis yoluyla da bulaşabilir (Smith, 2012; Huang ve Solter, 2013). *Nosema apis* bal arılarında ishale neden olduğundan fekal-oral yolla yayılma eğilimi daha yüksekken, *N. ceranae* dışkılamayı tetiklemediğinden, bunun yerine oral-oral yolla bulaşma çok daha yaygındır (Smith, 2012). Ayrıca *Nosema* sporlarına erkek arıların semenlerinde rastlanması, bu etkenlerin cinsel yolla bulaşabildiğini göstermektedir (Peng vd., 2016). Kraliçe arıların pupalarına vertikal yolla enfeksiyon bulaştırabileceğine dair bir kanıt yoktur. Son yıllarda *N. ceranae* sporlarının hava yolu ile bulaştığına dair yapılan çalışmalar bu yolla bulaşmanın mümkün olmadığını ancak etkenlerin rüzgarlarla uzaklara taşınabildiğini göstermektedir (Sulborska vd., 2019). *Nosema ceranae* ile enfekte bal arıları dışkıyla kovani kontamine ettikleri gibi dış ortamda su ve polen başta olmak üzere birçok besin kaynağını kontamine ederek enfeksiyonun yayılmasına neden oldukları bildirilmiştir (MacInnis vd., 2021; Formato vd., 2022). Ayrıca kontamine bal, balmumu, polen ve arı sütü gibi fomitler enfeksiyonun yayılmasında önemli rol oynar (Botías vd., 2012). Arıcular, kraliçe arıyı enfekte bir kraliçe arıyla değiştirerek ya da farklı kovanları birleştirerek enfeksiyonun yayılmasına neden olabilirler (Galajda vd., 2021).

## ***N. ceranae*'nin Üreme Döngüsü**

*Nosema ceranae*'nin üreme döngüsü, konakçı sindirim sistemine girdikten kısa bir süre sonra başlar. Arılar tarafından yutulan sporlar ventriküler lümene ulaşır. Burada çimlenmeyi takiben, çevresel ozmotik basınç, polar tüp adı verilen özel bir organelin spordan çıkmasına ve sporoplazmanın (bulaşıcı materyal) konakçı sitoplazmasına enjekte edilmesine neden olur. Sporoplazma, iki çekirdekli merontlara dönüşür ve ikiye bölünerek çoğalır (Merogonik faz). Çoğalan merontlar plazma zarının dış yüzeyinde elektron yoğun materyal biriktirilerek sporontlara dönüşür (Sporogoniyal faz). Bu fazda sporontlar bölünerek birincil sporlar meydana gelir. Birincil sporlar, hücre lizis yoluyla orta bağırsak lümenine salınarak olgun sporlara dönüşürler. Bu aşamada ya üreme döngüsü tekrar eder ya da serbest sporlar dışkılama ile atılır (Gisder vd., 2010b).

## **Klinik Belirtiler**

*Nosema ceranae* ile bal arılarının enfekte edilmesiyle oluşturulan ilk deneysel çalışmalar, bu parazitin oldukça patojenik olduğunu ve *N. apis*'e kıyasla önemli ölçüde daha yüksek arı ölümlerine neden olduğunu açıkça göstermiştir (Hatjina vd., 2011; Matthijs vd., 2020). Ayrıca son yıllarda yapılan birçok saha ve deneysel çalışma, *N. ceranae*'nin bal arılarında bağışıklığın baskılanması, yiyecek arama davranışı, feromon ve hormon üretimi ile karbonhidrat ve lipid sentezi dahil olmak üzere birçok metabolik ve fizyolojik bozukluklara neden olduğunu ortaya koymuştur (Kralj ve Fuchs, 2009; Goblirsch vd., 2013). *Nosema ceranae* bal arılarının mide bağırsak sistemine tropizm gösterdiği için çoğu çalışma bu organa odaklanmıştır (García-Palencia vd., 2010). *Nosema* enfeksiyonun ilk haftası boyunca hücre sitoplazmasında vakuollerin varlığı, hücre zarının bozulması ve çekirdek yoğunlaşması (piknoz) gibi epitelyal ventriküllerde belirgin bir dejenerasyon tablosunun göstermektedir (Mazur ve Gajda, 2022). Hastalığın ilerleyen dönemlerinde *N. ceranae* ile yoğun olarak enfekte olan hücreler lizise uğradığı için yeterli besin absorpsiyonu şekillenmez ve bunun sonucu olarak açlık nedeni ile erken ölümler meydana gelmektedir (Higes vd., 2007). *Nosema ceranae* enfeksiyonunun patolojik özellikleri *N. apis*'in neden olduğu enfeksiyonlara çok benzese de, *N. apis*'in neden olduğu kovan önünde sürünen ve ölü arılar, kovan etrafında dışkı lekelerinin oluşmasına neden olan dizanteri belirtileri *N. ceranae* enfeksiyonlarında gözlenmez (Higes vd., 2008; Botías vd., 2013a). Bal arılarında *N. ceranae* enfeksiyonları genelde herhangi bir klinik belirti göstermeden sinsi ilerler (Botías vd., 2013a). Her iki *Nosema* türü aynı dokuyu enfekte etmesine ve benzer lezyonlara neden olmasına rağmen, enfekte arılardaki bu farklılıkların altında yatan mekanizma henüz aydınlatılmamıştır.

*Nosema ceranae*, bağırsak absorpsiyonunu bozarak, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında değişikliklere neden olur ve bal arıların beslenme davranışını önemli oranda değişikliğe uğratar. Bağırsak absorpsiyonunun bozulmasına bağlı olarak şekillenen açlık ve yağ asidi sentezinin inhibisyonu, bal arılarının yaşamlarının daha erken dönemlerinde yiyecek aramaya başlamasına ve koloni içinde enerji stresi yaşayan arıların önce aktivitelerini ardından yiyecek arama davranışlarının değişmesine yol açabilir (Li vd., 2018). Ayrıca, enerji stresine giren arıların yiyecek arama sırasında daha yüksek ölüm oranlarına sahip oldukları bildirilmiştir (Martín-Hernández vd., 2018). Bal arıları nektar ve poleni karbon ve nitrojen kaynağı olarak tüketirler. Bal arıları aldıkları bu gıdaları bağırsaklardaki enzimler aracılığıyla parçalayarak elde edilen maddeleri karbonhidrat metabolizmasında kullanırlar. *Nosema ceranae* ile enfekte olmuş arılarda karbonhidrat metabolizmasındaki değişiklikler sıklıkla rapor edilmiştir (Kralj ve Fuchs, 2009). Karbonhidrat metabolizmasındaki bozukluklar dolaylı olarak vücudun

enerji rezervlerinin mobilizasyonunu kontrol eden mekanizmaların bozulmasına neden olmaktadır (Aliferis vd., 2012). Bu bozuklukların bir sonucu olarak *N. ceranae* ile enfekte arılarda daha güçlü bir şeker talebi ve daha yüksek bir tüketim davranışı görülmektedir. *Nosema* enfeksiyonlarında gözlenen bir diğer etki de bal arılarının besinlerle alınan proteinlerinden tam olarak yararlanamamasıdır. Protein eksikliği, bal arılarında faringeal bezlerin körelmesine ve işçi arıların, larvaları ve kraliçeyi besleyememesine neden olarak popülasyonun erken yaşlanmasına neden olur (Vidau vd., 2014).

*Nosema ceranae* ile oluşturulan deneysel enfeksiyonundan yedi gün sonra bal arıların immun sisteminde görev yapan abaecin, hymenoptaecin, glukoz, dehidrojenaz ve vitellogenin genlerinin ekspresyonu önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Chaimanee vd., 2012; Li vd., 2018). Bu veriler *N. ceranae*'nin bal arılarında humoral ve hücrel savunma mekanizmalarını kısmen bastırdığı ve sekonder enfeksiyonların oluşmasına da zemin hazırladığını göstermektedir. Ayrıca bal arılarında iş bölümü ve yiyecek arama uzmanlığı üzerindeki pleiotropik etkileri yoluyla sosyal organizasyonun bütünleşmesine yardımcı olan vitellogenin üzerindeki negatif etki, enfekte olmuş kolonilerin davranışında değişikliğe neden olabilir. Şöyle ki vitellogenin baskılanması kovanda arı-toplayıcı geçişini ve erken yiyecek arama davranışını etkileyerek arıların yaşam sürelerinin kısalmasına neden olmaktadır (Antúnez vd., 2013).

*Nosema ceranae* asemptomatik bir seyir seyrettiği için koloni bazında meydana getirdiği hasarı tespit etmek oldukça zordur. Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda *N. ceranae*'nin arı kovanlarında koloni kaybında rolü ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmiştir. İspanya, Türkiye, İsrail, Yunanistan gibi Akdeniz ülkelerinde yapılan çalışmalarda *N. ceranae*'nin profesyonel arı kovanlarında koloni kaybında önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Higes vd., 2008; Antúnez vd., 2009; Oguz vd., 2017; Jabal-Uriel vd., 2022). Ancak Kuzey Avrupa'da yapılan çalışmalarda koloni çöküşü ile *N. ceranae* arasında bir ilişki tespit edilmemiştir (Fries ve Forsgren, 2008; Martín-Hernández vd., 2018). Özellikle iki *Nosema* türünün virülensiyle ilişkili karşılaştırmalı çalışmalar, *N. ceranae*'nin neden olduğu ölüm oranının *N. apis*'inkinden daha yüksek olmadığını göstermektedir (Gisder vd., 2010a; Bollan vd., 2012). Bu çelişkili sonuçlar, *N. ceranae*'nin farklı haplotiplerinin bir göstergesi olabilir (Maside vd., 2015). Ayrıca *N. ceranae*'nin koloni üzerindeki olası etkilerindeki farklılıkların olması, coğrafik dağılım, iklim koşulları ve arıcılık yönetim rejimleri gibi birçok çevresel faktörden etkilendiğini göstermektedir (Martín-Hernández vd., 2018).

## Epidemiyoloji

*Nosema ceranae*'nin konakçı aralığı, yeni konakçılara potansiyel olarak yüksek uyum sağlama kapasitesinden dolayı sürekli genişlemektedir. İlk olarak *Apis cerana*'da tespit edilen *N. ceranae* daha sonra *A. florea*, *A. dorsata* ve *A. koschevnikovi* dahil olmak üzere diğer birçok Asya arı türünde tespit edilmiştir (Chaimanee vd., 2011). Daha sonra *N. ceranae* dünya çapında yayılarak Avrupa bal arıları (*Apis mellifera*) ve *Bombus*, *Osmia*, *Andrena*, *Melipona*, *Tetragonisca* ve *Scaptotrigona* gibi çok sayıda sosyal ve yalnız arı türünde varlığı rapor edilmiştir (Martín-Hernández vd., 2018).

*Nosema ceranae*'nin neredeyse dünya çapında yaygınlığı, özellikle bal arısı popülasyonlarındaki son düşüşlerle birlikte arıcılık endüstrisinde büyük endişelere yol açmıştır. Özellikle sıcak ülkelere *N. apis*'in yerini *N. ceranae*'nin aldığı ve hastalığın baskın türü olduğunu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Higes vd., 2006; Ansari vd., 2017). İklim, *Nosema* türlerinin yayılmasında ana faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Daha sıcak iklimlerde *N. ceranae*, *N. apis*'ten daha rekabetçidir; aksine,

soğuk iklimlerde, *N. ceranae* sporları, *N. apis* sporlarından çok daha dayanaksız görünmektedir (Fries, 2010). Ayrıca laboratuvar verileri, *N. ceranae* sporlarının yüksek sıcaklıklara ve kuruluğa dayanabilme yeteneğine sahip olmalarına karşın soğuğa karşı hassas olmaları nedeniyle, daha soğuk mevsimlerde *N. ceranae*'nin dünyaya yayılımının azaldığını göstermektedir (Mazur ve Gajda, 2022). *Nosema* türlerinin sıcaklıklara karşı farklı hassasiyeti, ılıman iklimlerde daha yaygın olan *N. apis*'e kıyasla daha sıcak iklimlere sahip ülkelerde *N. ceranae* prevalansının daha yüksek olmasının potansiyel nedenini de açıklamaktadır. Bir Akdeniz ülkesi olan Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan birçok çalışmada *N. ceranae*'nin yüksek bir prevalansa sahip olduğunu göstermektedir. Hatay'da 450 farklı arılıkta yapılan bir çalışmada *N. ceranae*'nin prevalansı % 45 olarak tespit edilirken, *N. apis* tespit edilmemiştir (Zerek vd., 2021). Doğu Karadeniz bölgesinde yapılan diğer bir araştırmada, ilkbahar döneminde işletmelerin % 89'unda, sonbahar döneminde %39'unda *Nosema* hastalığı tespit edildiği ve elde edilen sporların tamamının *N. ceranae* olduğu bildirilmiştir (Yılmaz vd., 2018). Bulgaristan'da yapılan bir çalışmada ise bal arılarının % 77,2'sinde *N. ceranae*, % 13,9'unda ise *N. apis* tespit edildiği rapor edilmiştir (Shumkova vd., 2018). Hırvatistan, İtalya, İran, Yunanistan ve Suudi Arabistan gibi dünyanın diğer birçok ülkesinde de *N. ceranae*, *N. apis*'in yerini almışken, Kuzey Avrupa'da (İrlanda, İsveç, Norveç ve Almanya) böyle bir durum gözlemlenmemiştir (Higes vd., 2006; Ansari vd., 2017; Martín-Hernández vd., 2018). İsveç'te, 2007 baharında, *Nosema* pozitif arı kolonilerinin %89'unda *N.apis* ve %10'unda *N.apis/N.ceranae* karışık koloniler tespit edilmiştir (Forsgren ve Fries, 2012). İskoçya'da *Nosema* pozitif arı kolonilerinin % 86,2'sinde karışık enfeksiyonlar bildirilmiştir (Bollan vd., 2012). Almanya'da bal arılarında % 48,5 *N. apis*, % 33,8 *N. ceranae* ve % 17,6 karışık enfeksiyon tespit edilmiştir (Gisder vd., 2010a). Literatürlerde bildirilen prevalans değerlerindeki farklılıkta iklim dışında incelenen arılık sayısı, örnekleme yöntemleri, bal arısı popülasyonunun özellikleri, teşhis yöntemleri ve diğer biyotik ve abiyotik faktörlerdeki farklılıklardan da kaynaklanması muhtemeldir (Martín-Hernández vd., 2018).

## Teşhis

*Nosema* türleri, zorunlu hücre içi patojenler olarak yaşayan ve konakçı hücrenin dışında metabolik olarak aktif olmayan sporlar olarak bulunan oldukça gelişmiş mantarlardır. *Nosema* türlerinin hücre dışında ürediklerine dair şüana kadar bir kanıt gösterilmemiştir. Son yıllarda *Nosema* sporlarının laboratuvarda üretimi için *Lymantria dispar* (Çingene güvesi)'dan elde edilen IPL-LD-65Y hücre kültürleri geliştirilmiştir (Gisder vd., 2010b). Bu hücre kültürleri *Nosema* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonundan ziyade bu türlerin yaşam döngüsüne ilişkin bilgiler elde edilmesi amacıyla araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Gisder vd., 2010b).

*Nosema*'nın laboratuvar teşhisi mikroskopik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Mikroskopik inceleme için bal arılarının ventriküllerindeki içerik kullanılabileceği gibi çok sayıda arının karın kısmı çıkarılıp bir havanda ezilerek elde edilen süspansiyon da kullanılmaktadır. Dışkı ya da arı havuzundan hazırlanan süspansiyon bir lam ya da hemositometre üzerine koyularak üzerine bir lamel kapatılır ve 40x büyütme objektifte incelenir (OIE, 2018). Sporların mikroskop altında görülmesi ve tanınması, sporların diğer mikroorganizmalara göre daha büyük olması ve oval morfolojilerinden dolayı nispeten basittir. Buradaki en önemli problem *Nosema*'nın mikroskopik olarak tür bazında ayırımının yapılmasındaki zorluktur. *Nosema ceranae* ile kıyaslandığında *N. apis* daha büyük ve oval olmasına

rağmen özellikle karışık enfeksiyonlarda bu türlerin bir birinden ayırımında oldukça güçlük yaşanmaktadır (Chen vd., 2009).

Enfekte arılardan elde edilen doku örneklerinde *Nosema* sporlarının varlığını ortaya koymak için Giemsa ve Toluidin mavisi kullanılarak *Nosema* sporlarının varlığını ortaya koyan yöntemlerde mevcuttur (Fries vd., 2013). Bu boyama yöntemleri *Nosema* sporlarını diğer mikroorganizmalardan güvenilir bir şekilde ayırımını da sağlar.

Mikroskopik yöntemlerle birleştirilmiş flöresan boyalar kullanılarak geliştirilen yeni teknikler olgun sporların olgunlaşmamış sporlardan ayırma imkânı sağlamaktadır (Snow, 2016). Örneğin flöresan bir boya olan Calcofluor White, olgun *N.ceranae* sporlarının hücre duvarında bulunan kitine bağlanabilme kapasitesine sahiptir. Olgunlaşmamış sporlar kitin içermediğinden, bu yöntem konakçı hücrelerindeki olgun sporların lokalizasyon çalışmaları için önemli bir katkı sağlamaktadır (Chen vd., 2017). *Nosema* türlerinin boyanmasında Fungi-Flour, Cellufluor Fungiquial A ve Uvitex 2B gibi flöresan maddeler de kullanılmaktadır (Garcia, 2002). Ancak yukarıda bahs edilen diğer mikroskopik yöntemlerde olduğu gibi bu yöntemde de türler arasında ayırım yapmak mümkün değildir. *Nosema* türlerini ve yaşam aşamalarını ayırt etmek için, spesifik monoklonal antikolar kullanılarak yapılan immunohistokimyasal yöntemler son yıllarda araştırmacılar tarafından kullanılmış ve oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir (Goblirsch, 2017).

Transmisyon elektron mikroskobu, dışkı numunelerinde veya arı bağırsağı numunelerinde *Nosema* sporlarının ayrıntılı incelenmesi ve morfolojik özelliklerine dayalı olarak tür düzeyinde ayırım yapılmasında kullanılmaktadır (Ptaszyńska vd., 2014b; Higes vd., 2019). Ancak pahalı bir alet olan elektron mikroskobuna ulaşımın sınırlı olması, yetişmiş personele ihtiyaç duyulması, numune hazırlama ve diğer aşamalarının zahmetli olması gibi problemler bu yöntemin rutin laboratuvar teşhis aracı olarak kullanılmasını sınırlandırmaktadır.

Yukarıda açıklanan mikroskopik tekniklere ek olarak, bal arılarında *Nosema* türlerinin teşhisinde PCR tabanlı moleküler yöntemler geliştirilmiştir (Hamiduzzaman vd., 2010; Ütük ve Pişkin, 2010; Truong vd., 2021). Bu yöntemler diğer yöntemlere göre daha hassas olup türe özgüdür. Moleküler yöntemler numunede çok az patojen olduğunda ya da konakçı üzerinde patolojik hiçbir değişiklik meydana gelmediği durumlarda dahi kullanılabilen oldukça önemli tekniklerdir. *Nosema* türlerinin teşhisinde bu yöntemlerin kullanılması için yeterli laboratuvar donanımı ve kaliteli bilgi birikimi ön koşuldur. *Nosema* türlerinin 16S rRNA genine spesifik primerler kullanılarak PCR, mütipleks PCR, Real time PCR, PCR-RFLP gibi birçok moleküler yöntem araştırmacılar tarafından kullanılmış ve bu yöntemin spesifitesinin ve sensitivitesinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Giersch vd., 2009; Stevanovic vd., 2011; Oguz vd., 2017; Truong vd., 2021). Son yıllarda *Nosema* türlerinin teşhisi için Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), immunodiffüzyon ve kromatografik yöntemler de geliştirilerek kullanılmıştır (Aliferis vd., 2012; Aronstein vd., 2012; Ptaszyńska vd., 2014b).

### **Kontrol ve Tedavi**

Bal arılarında *Nosema* enfeksiyonunu kolaylaştıran birçok predispoze faktör söz konusudur. *Nosema* hastalığının kontrol altına alınabilmesi için predispoze faktörlerin ortadan kaldırılması ya da düzeltilmesi oldukça önem arz etmektedir. Bu predispoze faktörlerden biri olan kovan sıcaklığı, bal arılarının *Nosema* sporlarına karşı direncini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden birisidir. Kovan içi sıcaklığın en az

35 °C olması dirençliliğin artması için oldukça önemlidir. Soğuk mevsimlerde bu sıcaklığa ulaşılması pek mümkün olmadığından enfeksiyon meydana gelme olasılığı daha yüksektir (Chen vd., 2009). Nosema enfeksiyon riskini artıran diğer önemli bir faktör de kovanlardaki arı popülasyonunun normalden fazla olmasıdır. Aşırı kalabalık, arılarda strese neden olabileceği gibi kovan içindeki *Nosema* sporlarının horizontal yolla yayılmasını kolaylaştıran bir faktördür (Galajda vd., 2021). Yapılan çalışmalar bal arılarının kış uykusundan çıkıp kovanın dışına çıkmasıyla kovandaki arı popülasyonunun düştüğü ve enfeksiyonun herhangi bir tedaviye gerek kalmadan sonlandığını göstermektedir. Ayrıca bal arılarının kışlaması için uygun habitat seçimi, arıların daha erken ve daha sık uçmasını sağlayarak kovan içinin tekrar kalabalıklaşmasını ve aynı zamanda enfeksiyonun yayılmasını önleyebilir. Kışlık malzemelerin ikmali, hijyenik besleme ve sulama, kovanların düzenli olarak dezenfekte edilmesi, ölü bireylerin yakılması, hayvanların tedavisi ve yıl boyunca genel olarak uygun bakım işlemleri, Nosema'nın kontrolünde uygulanması gereken diğer etkili yöntemlerdir (Muñoz vd., 2014; Galajda vd., 2021).

*Aspergillus fumigatus* mantarlarından izole edilen fumagillin, Nosema hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılan onaylı tek kimyasal ajandır (Higes vd., 2008). İlk zamanlar *N. apis* enfeksiyonları için kullanılan ve çok etkili olduğu bildirilen fumagillin, daha sonra ortaya çıkan ve tüm dünyaya yayılan *N. ceranae* enfeksiyonlarına karşı etkinliğinin sınırlı olduğu bildirilmiştir (Pajuelo vd., 2008; Mendoza vd., 2016). Mendoza vd. (2016) *N. ceranae* ile enfekte arılara farklı dozlarda verilen fumagillinin herhangi bir etkinliğinin olmadığını ve bu ilacın tedavi de kullanılmaması gerektiğini bildirmişlerdir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda ise fumagillinin, Nosema sporlarını kontrol etmekten ziyade üremesini tetiklediğini göstermiştir (Higes vd., 2011). Arı kovanlarında *N. ceranae* enfeksiyonlarının oluşumunu engellemek için mevsimsel olarak tekrarlanan fumagillin tedavisinin, gelecek nesilde oluşan bal arılarının düşük seviyelerde fumagiline maruz kalmasını neden olmaktadır (Williams vd., 2008). Kovandaki bu sabit düşük miktardaki fumagillin seviyesinin, *Nosema* türlerinin hiperproliferasyonuna elverişli koşullar oluşturduğu varsayılmaktadır. Fumagillin, *Nosema* türlerinin hücre içi replikasyonunu durduğu için sadece üreme döneminde etkili bir ilaçtır. Ancak spor adı verilen dirençli formlar bu ilaçtan etkilenmez ve bu da arı sağlığı olumsuz yönde etkiler (Holt ve Grozinger, 2016). Ayrıca, antibiyotiklerin neden olduğu bağırsak mikrobiyotasının disbiyozu, bal arılarının *N. ceranae* enfeksiyonlarına duyarlılığını artırabilir (Li ve vd., 2017).

Fumagillin hedef hücrede yer alan metionin aminopeptidaz (MetAP) tip 2 enzimine geri dönüşümsüz olarak bağlanarak bu enzimi inaktif hale getirir (van den Heever vd., 2015a, 2015b). Çoğu ökaryotik hücre MetAP1 ve MetAP2 enzimlerini üreten genlere sahip olup, hücrelerin canlı kalabilmeleri için bu enzimlerden en az birine ihtiyaç bulunmaktadır (Upadhyaya vd., 2006). MetAP1 genine sahip olmayan Mikrosporidia'ların neden olduğu enfeksiyonların kontrol ve tedavi stratejilerinin çoğu MetAP2 genini inhibe etmeye yönelik olarak geliştirilmiştir (Upadhyaya vd., 2006). MetAP'lar protein sentezlenmesi esnasında gerekli olan ilk metiyonun hidrolizi için gerekli olduğundan, MetAP2'nin fumagillin tarafından inhibisyonu hücredeki birçok proteinin sentezinin engellenmesine ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Ancak MetAP2, Mikrosporidia'lar dışında birçok memeli hayvanda ve insanlarda da bulunan bir enzimdir. Bal arılarında Nosema'nın kontrolünde kullanılan fumagillin, balda kalıntı bırakarak bu besini tüketen insanlara geçer ve MetAP2 enzimini inhibe ederek toksisiteye neden olmaktadır (van den Heever vd., 2014, 2015a). Bu nedendir ki Avrupa'da birçok ülkede insan sağlığına verdiği zarardan dolayı fumagillin 2012 yılından itibaren kullanımı yasaklanmıştır. Bu ilacı kullanan USA gibi diğer bazı ülkelerde ise bal üretimi esnasında ve öncesinde



fumagillin kullanılması engellenerek balda kalıntı ve toksisitenin minimize edilmesi stratejisi uygulanmaktadır (Reybroeck vd., 2012).

Avrupa Birliği'nde bal arıları gıda üreten hayvanlar olarak sınıflandırıldığından, tıbbi ürünlerin piyasada kullanılabilmesi için balda Maksimum Kalıntı Limitinin (MRL) belirlenmesi gereklidir. Şimdiye kadar, balda antibiyotikler ve sülfonamidler için MRL oluşturulduğuna dair bir kanıt olmadığından AB'de bu kimyasalların bal arılarında kullanılmasına izin verilmemektedir (Commission Regulation (EU) No. 37/2010).

Bal arısı mikrobiyotası esas olarak *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Lactobacillus Firm-4*, *Lactobacillus Firm-5* ve *Bifidobacterium asteroidetes* bakterilerini içeren çekirdek bir gruptan oluşur (Tola vd., 2020). Bağırsak mikrobiyotası, arıları bağırsak patojenlerinin kolonizasyonundan koruyan, bağışıklık sistemini dengede tutan, besinlerin sindirimi ve vitamin, yağ asidi ve amino asit sentezleyen biyolojik savunma sistemi olarak kabul edilmektedir. Bağırsak mikrobiyotasında disbiyozu neden olan pestisit ve antimikrobiyal ilaç kullanımı, çeşitli bağırsak patojenleri ve birçok çevresel faktör bal arısı sağlığını olumsuz yönde etkileyebilir. Bozulan mikrobiyotanın probiyotik ve prebiyotiklerle desteklenerek hastalıklara karşı arıların dirençli hale gelmesi ve tedavi edilmesi stratejileri birçok enfeksiyöz hastalıkta olduğu gibi *Nosema*'ya karşı da araştırılmıştır (Baffoni vd., 2016). *Nosema* hastalığına karşı etkinliği araştırılan en yaygın probiyotikler, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerdir (Baffoni vd., 2016; Fiorella vd., 2017; Zhang vd., 2019). *Lactobacillus*, bağırsak üzerinde olumlu sağlık etkileri olan Gram pozitif, sporsuz ve anaerobik bakterilerin bir cinsidir (Fiorella vd., 2017). Probiyotiklerin bal arısı parazitlerini kontrol etmeye yardımcı olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır. Tejerina vd. (2020), *L. salivarius* A3iob suşunu nispeten düşük bir miktarda arılara verildiğinde *Nosema* spor sayısının önemli derecede azaldığını ve bu hastalığın kontrolünde takviye bir ürün olarak verilmesinin yararlı olacağını bildirmişlerdir. Ancak yapılan bazı çalışmalar *Parasaccharibacter apium* ve *Bacillus* spp. gibi bazı bakterilerin ve probiyotiklerin (Bactocell ve Levucell SB) enfekte arıların canlı kalma oranlarını artırdığını ancak spor yüklerini azaltmada etkisiz olduğunu göstermiştir (Snyder, 2016; El Khoury vd., 2018). *Nosema*'nın tedavisi ve kontrolü amacıyla propolis ekstraktları, kitosan, flavonoidler, *Cryptocarya alba* yapraklarından elde edilen uçucu yağ hidrodistilasyon ekstraktları, monoterpenler gibi birçok organik ekstrakt ile doğal ve ticari besin takviyeleri, *N. ceranae* enfeksiyonları üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Burnham, 2019; Kunat-Budzyńska vd., 2022). Bu ürünlerin spor yükünü azaltma ve arıların sağkalımı üzerindeki etkileri ile çelişkili veriler söz konusudur. Bravo vd. (2017) *Cryptocarya alba* yapraklarından elde edilen uçucu yağ ekstraktları ve bazı monoterpenlerin ( $\beta$ -felandrene, okaliptol ve *a*-terpineol), *N. ceranae*'yi inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Diğer yandan Botías vd. (2013b) *Nosestat*® ve *Vitafeed Gold*® gibi ticari takviye ürünlerinin *Nosema* spor seviyeleri üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını rapor etmiştir. Doğal ve ticari takviye ürünlerin kimyasal ilaçlara göre insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri oldukça az olduğundan arıcılar tarafından tercih edilmektedir. Ancak doğal ürün ve ekstraktların kimyasal yapısı karmaşıktır ve çoğunlukla içeriği tam olarak bilinmemektedir. Üstelik sahada tedavi amacıyla kullanılabilmesi için bu ekstraktların üretiminin yüksek oranda standardize edilmesi gerekmektedir.

## Sonuç

*Nosema ceranae* arı popülasyonunun azalmasında rol oynayan önemli bir patojen olmasına rağmen koloni kayıplarındaki rolünü tam olarak belirlemek zordur. *Nosema ceranae*'nin teşhisinde birçok farklı

yöntem geliştirilmiş olsa da mikroskopik ve PCR tabanlı moleküler yöntemler araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. *Nosema ceranae*'nin patogenezi oldukça karışık olup bal arılarının birçok metabolik ve fizyolojik yapısında değişikliğe neden olabilmektedir. *Nosema ceranae*'nin sıcaklığa gösterdiği toleranstan dolayı özellikle sıcak ülkelerde daha geniş bir yayılım göstermektedir. *Nosema* sporlarının neden olduğu hastalığın kontrolü ve tedavisinde kullanılan fumagillinin birçok ülkede yasaklanmasından dolayı alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması elzem görülmektedir. Probiyotikler, bitki ekstraktları gibi alternatif tedavi yöntemlerinin *Nosema* hastalığının kontrolünde başarılı olduğuna dair veriler söz konusudur. Ancak bu tedavi yöntemlerinin güvenilir ve etkili olduğuna dair tam bir fikir birliği olmadığından sistematik olarak hastalıkların kontrolü ve tedavisinde bu ürünlerin kullanılması yakın zamanda pek mümkün görülmemektedir. Bu nedenle *Nosema* hastalığını önlemek için arılarda yan etkisi olmayan ve balda kalıntı bırakmayacak yeni ajanların araştırılmasına acilen ihtiyaç bulunmaktadır.

## Kaynaklar

- Aliferis, K. A., Copley, T., & Jabaji, S. (2012). Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Insect Physiology*, 58 (10), 1349-1359. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.07.010
- Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Nuru, A., Khan, K. A., & Alattal, Y. (2017). Geographical distribution and molecular detection of *Nosema ceranae* from Indigenous honey bees of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24 (5), 983-991. doi:10.1016/j.sjbs.2017.01.054
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., & Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11 (9), 2284-2290. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x
- Antúnez, K., Mendoza, Y., Santos, E., & Invernizzi, C. (2013). Differential expression of vitellogenin in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apicultural Research*, 52 (5), 227-234. doi:10.3896/ibra.1.52.5.09
- Aronstein, K., Webster, T., & Saldivar, E. (2012). A serological method for detection of *Nosema ceranae*. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (3), 621-625. doi:10.1111/jam.12066
- Baffoni, L., Gaggia, F., Alberoni, D., Cabbri, R., Nanetti, A., Biavati, B., & Di Gioia, D. (2016). Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. *Beneficial Microbes*, 7 (1), 45-51. doi:10.3920/bm2015.0085
- Becnel, J. J. & Andreadis, T. G. 1999. Microsporidia in insect. In: M. Wittner & L. M. Weiss (ed.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC. pp. 447-501.
- Bollan, K. A., Hothersall, J. D., Moffat, C., Durkacz, J., Saranzewa, N., Wright, G. A., .....& Connolly, C.N. (2012). The microsporidian parasites *Nosema ceranae* and *Nosema apis* are widespread in honeybee (*Apis mellifera*) colonies across Scotland. *Parasitology Research*, 112(2), 751-759. doi:10.1007/s00436-012-3195-0
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A., De La Rúa, P., & Higes, M. (2012). The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science*, 93 (1), 150-155. doi:10.1016/j.rvsc.2011.08.002
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., ...& Higes, M. (2013a). *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*, 44 (1), 25. doi:10.1186/1297-9716-44-25

- Botías, C., Martín-Hernández, R., Meana, A., & Higes, M. (2013b). Screening alternative therapies to control Nosemosis type C in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 1041-1045. doi:10.1016/j.rvsc.2013.09.012
- Bravo, J., Carbonell, V., Sepúlveda, B., Delporte, C., Valdovinos, C., 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. doi:10.1016/j.jip.2017.08.012
- Burnham, A. J. (2019). Scientific advances in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infections in honey bees (*Apis mellifera*). *Frontiers in Veterinary Science*, 6. doi:10.3389/fvets.2019.00079
- Cengiz, M.M. & Yazıcı, K. (2018). Ardahan Yöresinde Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Kolonilerinde kışlama kayıpları ve muhtemel sebepleri üzerine bir anket. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 18 (2), 111-122.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J. D., & Pettis, J. S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, 58 (8), 1090-1095. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.04.016
- Chaimanee, V., Chen, Y., Pettis, J. S., Scott Cornman, R., & Chantawannakul, P. (2011). Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107 (3), 229-233. doi:10.1016/j.jip.2011.05.012
- Chantawannakul, P., De Guzman, L. I., Li, J., & Williams, G. R. (2015). Parasites, pathogens, and pests of honeybees in Asia. *Apidologie*, 47 (3), 301-324. doi:10.1007/s13592-015-0407-5
- 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. doi:10.1016/j.ejop.2017.07.002
- Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D., & Pettis, J. S. (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(2), 142-147. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x
- Chen, J., Guo, W., Dang, X., Huang, Y., Liu, F., Meng, X., ..... & Pan, G. (2017). Easy labeling of proliferative phase and sporogonic phase of microsporidia *Nosema bombycis* in host cells. *Plos One*, 12 (6), e0179618. doi:10.1371/journal.pone.0179618
- Commission Regulation (EU) No. (2009). 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Union 2010 (L15) 1-72.
- El Khoury, S., Rousseau, A., Lecoœur, A., Cheaib, B., Bouslama, S., Mercier, P., .... & Derome, N. (2018). Deleterious interaction between honeybees (*Apis mellifera*) and its Microsporidian intracellular parasite *Nosema ceranae* was mitigated by administrating either endogenous or allochthonous gut microbiota strains. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6. doi:10.3389/fevo.2018.00058
- Fiorella, G., Maggi, M., Pellegrini, M. C., Cugnata, N. M., Szawarski, N., Buffa, F., ..... & Ruffinengo, S.R. (2017). Effects of *Lactobacillus johnsonii* AJ5 metabolites on nutrition, *Nosema ceranae* development and performance of *Apis mellifera* L. *Journal of apicultural science*, 61(1), 93-104
- Formato, G., Rivera-Gomis, J., Bubnic, J., Martín-Hernández, R., Milito, M., Croppi, S., & Higes, M. (2022). Nosemosis prevention and control. *Applied Sciences*, 12 (2), 783. doi:10.3390/app12020783
- Forsgren, E., & Fries, I. (2012). Temporal study of *Nosema* spp., in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports*, 5 (1), 78-82. doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00386.x
- Fries, I. (1993). *Nosema Apis* A parasite in the honey bee colony. *Bee World*, 74 (1), 5-19. doi:10.1080/0005772x.1993.11099149
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S73-S79. doi:10.1016/j.jip.2009.06.017

- Fries, I., Chauzat, M., Chen, Y., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., .....& Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-28. doi:10.3896/ibra.1.52.1.14
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniasek, N. J. (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 (3), 356-365. doi:10.1016/s0932-4739(96)80059-9
- Fries, I., & Forsgren, E. (2008). Undersökning av spridningen av *Nosema ceranae* i Sverige. *Investigation of the distribution of Nosema ceranae in Sweden Bitidningen*, 107, 26-27.
- Galajda, R., Valenčáková, A., Sučík, M., & Kandráčová, P. (2021). *Nosema* disease of European honey bees. *Journal of Fungi*, 7(9), 714. doi:10.3390/jof7090714
- Garcia, L. S. (2002). Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of clinical microbiology*, 40 (6), 1892-190
- García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., González-Porto, A. V., Marin, P., Meana, A., & Higes, M. (2010). Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 49 (3), 278-283.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., & Hornitzky, M. (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*, 40(2), 117-123. doi:10.1051/apido/2008065
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M., Linde, A., & Genersch, E. (2010a). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (9), 3032-3038. doi:10.1128/aem.03097-09
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., & Genersch, E. (2010b). 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 (2), 404-413. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x
- Goblirsch, M. (2017). *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 49(1), 131-150. doi:10.1007/s13592-017-0535-1
- Goblirsch, M., Huang, Z. Y., & Spivak, M. (2013). Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *Plos One*, 8(3), e58165. doi:10.1371/journal.pone.0058165
- 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. doi:10.1016/j.jip.2010.06.001
- Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., Evangelou, V., Avtzis, D., .....& De Graaf, D. C. (2011). Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108 (2), 131-134. doi:10.1016/j.jip.2011.07.003
- 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(3), 211-217. doi:10.1016/j.jip.2006.11.001
- Higes, M., García-Palencia, P., Urbietta, A., Nanetti, A., & Martín-Hernández, R. (2019). *Nosema apis* and *Nosema ceranae* tissue tropism in worker honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Pathology*, 57(1), 132-138. doi:10.1177/0300985819864302
- 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. doi:10.1016/j.jip.2006.02.005
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., ....& Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2659-2669. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x

- Higes, M., Nozal, M. J., Alvaro, A., Barrios, L., Meana, A., Martín-Hernández, R., .....& Bernal, J. (2011). The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie*, 42 (3), 364-377. doi:10.1007/s13592-011-0003-2
- Holt, H. L., & Grozinger, C. M. (2016). Approaches and challenges to Managing *Nosema* (Microspora: Nosematidae) parasites in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*, 109 (4), 1487-1503. doi:10.1093/jee/tow103
- Huang, W., & Solter, L. F. (2013). Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113 (1), 35-41. doi:10.1016/j.jip.2013.01.001
- Jabal-Uriel, C., Barrios, L., Bonjour-Dalmon, A., Caspi-Yona, S., Chejanovsly, N., Erez, T., ...& Martín-Hernández, R. (2022). Epidemiology of the Microsporidium *Nosema ceranae* in four Mediterranean countries. *Insects*, 13(9), 844. doi:10.3390/insects13090844
- Kalayci, G., Cagırgan, A.A., Kaplan, M., Pekmez, K., Beyazıt, A., Ozkan, B., .....& Arslan, F. (2020). Koloni kaybından etkilenen türk arılıklarında viral ve paraziter patojenlerin Rolü. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. doi:10.9775/kvfd.2020.24154
- Klatt, B. K., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E., & Tschardtke, T. (2014). Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281 (1775), 20132440. doi:10.1098/rspb.2013.2440
- Kralj, J., & Fuchs, S. (2009). *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*, 41 (1), 21-28. doi:10.1051/apido/2009046
- Kunat-Budzyńska, M., Budzyński, M., Schulz, M., Strachecka, A., Gancarz, M., Rusinek, R., & Ptaszyńska, A. A. (2022). Natural Substances, Probiotics, and Synthetic Agents in the Treatment and Prevention of Honeybee Nosemosis. *Pathogens*, 11 (11), 1269.
- Li, J. H., Evans, J.D., Li, W. F., Zhao, Y.Z., DeGrandi-Hoffman, G., Huang, S. K., .....& Chen, Y.P. (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 (11), e0187505.
- Li, W., Chen, Y., & Cook, S.C. (2018). Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. *International Journal for Parasitology*, 48(6), 433-444. doi:10.1016/j.ijpara.2017.11.004
- MacInnis, C. I., Keddie, B. A., & Pernal, S. F. (2021). Honey bees with a drinking problem: Potential routes of *Nosema ceranae* spore transmission. *Parasitology*, 1-8. doi:10.1017/s0031182021001827
- Macías-Macías, J.O., Tapia-Rivera, J.C., De la Mora, A., Tapia-González, J.M., Contreras-Escareño, F., Petukhova, T., .....& Guzman-Novoa, E. (2020). *Nosema ceranae* causes cellular immunosuppression and interacts with thiamethoxam to increase mortality in the stingless bee *Melipona colimana*. *Scientific Reports*, 10 (1). doi:10.1038/s41598-020-74209-3
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., .....& Higes, M. (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: A 12 years post detection perspective. *Environmental Microbiology*, 20 (4), 1302-1329. doi:10.1111/1462-2920.14103
- Maside, X., Gómez-Moracho, T., Jara, L., Martín-Hernández, R., De la Rúa, P., Higes, M., & Bartolomé, C. (2015). Population genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: One host (*Apis mellifera*) and two different histories. *Plos One*, 10(12), e0145609. doi:10.1371/journal.pone.0145609
- Matthijs, S., De Waele, V., Vandenberge, V., Verhoeven, B., Evers, J., Brunain, M., .....& De Regge, N. (2020). Nationwide screening for bee viruses and parasites in Belgian honey bees. *Viruses*, 12 (8), 890. doi:10.3390/v12080890
- Mazur, E. D., & Gajda, A.M. (2022). Nosemosis in honeybees: A review guide on biology and diagnostic methods. *Applied Sciences*, 12 (12), 5890. doi:10.3390/app12125890

- Mendoza, Y., Diaz-Cetti, S., Ramallo, G., Santos, E., Porrini, M., & Invernizzi, C. (2016). *Nosema ceranae* Winter control: Study of the effectiveness of different Fumagillin treatments and consequences on the strength of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*, tow228. doi:10.1093/jee/tow228
- Muñoz, I., Cepero, A., Pinto, M.A., Martín-Hernández, R., Higes, M., & De la Rúa, P. (2014). Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee Queen introductions. *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 161-168. doi:10.1016/j.meegid.2014.02.008
- Neov, B., Georgieva, A., Shumkova, R., Radoslavov, G., & Hristov, P. (2019). Biotic and abiotic factors associated with colonies mortalities of managed honey bee (*Apis mellifera*). *Diversity*, 11 (12), 237. doi:10.3390/d11120237
- Oguz, B., Karapınar, Z., Dinçer, E., & Değer, M. S. (2017). Molecular detection of *Nosema* spp. and Black Queen-cell virus in honeybees in van province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41, 221-227. doi:10.3906/vet-1604-92
- Pajuelo, A. G., Torres, C., & Bermejo, F.J.O. (2008). Colony losses: a double blind trial on the influence of supplementary protein nutrition and preventative treatment with fumagillin against *Nosema ceranae*. *Journal of Apicultural Research*, 47 (1), 84-86.
- Paxton, R. J. (2010). Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony collapse disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research*, 49 (1), 80-84. doi:10.3896/ibra.1.49.1.11
- Paxton, R. J., 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(6), 558-565. doi:10.1051/apido:2007037
- Peng, Y., Grassl, J., Millar, A. H., & Baer, B. (2016). Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infections of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283 (1823), 20151785. doi:10.1098/rspb.2015.1785
- Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Mułenko, W., & Demetraki-Paleolog, J. (2014a). Differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores under scanning electron microscopy (SEM). *Journal of Apicultural Research*, 53 (5), 537-544. doi:10.3896/ibra.1.53.5.02
- Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Woźniakowski, G., Gnat, S., & Małek, W. (2014b). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 357 (1), 40-48. doi:10.1111/1574-6968.12521
- Reybroeck, W., Daeseleire, E., De Brabander, H. F., & Herman, L. (2012). Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary microbiology*, 158 (1-2), 1-11.
- Schuster, C. J., Sanders, J. L., Couch, C., & Kent, M. L. (2022). Recent Advances with Fish Microsporidia. In *Microsporidia* (pp. 285-317). Springer, Cham.
- Shumkova, R., Georgieva, A., Radoslavov, G., Sirakova, D., Dzhebir, G., Neov, B., .....& Hristov, P. (2018). The first report of the prevalence of *Nosema ceranae* in Bulgaria. *Peer J*, 6, e4252. doi:10.7717/peerj.4252
- Smith, M. L. (2012). The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? *Plos One*, 7 (8), e43319. doi:10.1371/journal.pone.0043319
- Snow, J. W. (2016). A fluorescent method for visualization of *Nosema* infection in whole-mount honey bee tissues. *Journal of Invertebrate Pathology*, 135, 10-14. doi:10.1016/j.jip.2016.01.007
- Snyder, L. (2016). *Parasaccharibacter apium*, Gen. nov., sp. nov., improves honey bee (Hymenoptera: Apidae) resistance to *Nosema*. *2016 International Congress of Entomology*. doi:10.1603/ice.2016.94339
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, S. R., Ljubenkovic, J., Radakovic, M., & Aleksic, N. (2011). Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, 42 (1), 49-58. doi:10.1051/apido/2010034

- Sulborska, A., Horecka, B., Cebrat, M., Kowalczyk, M., Skrzypek, T. H., Kazimierczak, W., .....& Borsuk, G. (2019). Microsporidia *Nosema* spp., obligate bee parasites are transmitted by air. *Scientific Reports*, 9 (1). doi:10.1038/s41598-019-50974-8
- Tejerina, M. R., Benítez-Ahrendts, M. R., & Audisio, M. C. (2020). *Lactobacillus salivarius* A3iob reduces the incidence of *Varroa destructor* and *Nosema* spp. in commercial apiaries located in the northwest of Argentina. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12 (4), 1360-1369. doi:10.1007/s12602-020-09638-7
- Texier, C., Vidau, C., Viguès, B., El Alaoui, H., & Delbac, F. (2010). Microsporidia: A model for minimal parasite host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 13 (4), 443-449. doi:10.1016/j.mib.2010.05.005
- Tola, Y.H., Waweru, J.W., Hurst, G.D., Slippers, B., & Paredes, J.C. (2020). Characterization of the Kenyan honey bee (*Apis mellifera*) gut microbiota: A first look at tropical and sub-saharan African bee associated microbiomes. *Microorganisms*, 8 (11), 1721. doi:10.3390/microorganisms8111721
- Truong, A., Sevin, S., Kim, S., Yoo, M., Cho, Y. S., & Yoon, B. (2021). Rapidly quantitative detection of *Nosema ceranae* in honeybees using ultra-rapid real-time quantitative PCR. *Journal of Veterinary Science*, 22(3). doi:10.4142/jvs.2021.22.e40
- Upadhy, R., Zhang, H. S., & Weiss, L. M. (2006). System for expression of Microsporidian methionine amino peptidase type 2 (MetAP2) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(10), 3389-3395. doi:10.1128/aac.00726-06
- Ütük, A. E., & Pişkin, Ü. (2010). Türkiye’de *Nosema ceranae*’nın ilk moleküler tanısı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 57 (4), 275-278. doi:10.1501/vetfak00000002439
- Van den Heever, J. P., Thompson, T. S., Curtis, J. M., Ibrahim, A., & Pernal, S. F. (2014). Fumagillin: An overview of recent scientific advances and their significance for apiculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (13), 2728-2737. doi:10.1021/jf4055374
- Van den Heever, J. P., Thompson, T. S., Otto, S. J., Curtis, J. M., Ibrahim, A., & Pernal, S. F. (2015a). Evaluation of Fumagilin-B® and other potential alternative chemotherapies against *Nosema ceranae*-infected honeybees (*Apis mellifera*) in cage trial assays. *Apidologie*, 47 (5), 617-630. doi:10.1007/s13592-015-0409-3
- Van den Heever, J. P., Thompson, T. S., Otto, S. J., Curtis, J. M., Ibrahim, A., & Pernal, S.F. (2015b). The effect of dicyclohexylamine and fumagillin on *Nosema ceranae*-infected honey bee (*Apis mellifera*) mortality in cage trial assays. *Apidologie*, 47 (5), 663-670. doi:10.1007/s13592-015-0411-9
- Vidau, C., Panek, J., Texier, C., Biron, D. G., Belzunces, L. P., Le Gall, M., .....& El Alaoui, H. (2014). Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 121, 89-96. doi:10.1016/j.jip.2014.07.002
- Wasson, K., & Peper, R. L. (2000). Mammalian Microsporidiosis. *Veterinary Pathology*, 37 (2), 113-128. doi:10.1354/vp.37-2-113
- Williams, G. R., Sampson, M. A., Shutler, D., & Rogers, R. E. (2008). Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology*, 99 (3), 342-344. doi:10.1016/j.jip.2008.04.005
- World Organization of Animal Health (OIE). Nosemosis of Honey Bees. In *Manual of diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE: Paris, France, 2018; pp. 744-749.
- Yılmaz, F., Öztürk, H., Kuvancı, S., Kayaboynu, A., Karatas, Ü., Kaya, S., .....& Buldağ, M. (2018). Doğu Karadeniz Bölgesi’nde *Nosema apis* ve *Nosema ceranae*’nin Epidemiyolojisi. *Aricılık Araştırma Dergisi*, 10 (2), 34-44.
- Zander E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der BieneMünch. Bienenztg. 31, pp. 196-204

- Zerek, A., Yaman, M., & Dik, B. (2021). Prevalence of nosemosis in honey bees (*Apis mellifera* L., 1758) of the Hatay province in Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 61(3), 368-374. doi:10.1080/00218839.2021.2008706
- Zhang, Y., Lu, X., Huang, S., Zhang, L., Su, S., & Huang, W. F. (2019). *Nosema ceranae* infection enhances *Bifidobacterium* spp. abundances in the honey bee hindgut. *Apidologie*, 50 (3), 353-362.