

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE
Katedra za biologiju



Predrag R. Simeunović

MOLEKULARNO-GENETIČKA
DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA
UZROČNIKA MIKROSPORIDIJALNIH I
VIRUSNIH INFEKCIJA ZASTUPLJENIH
KOD PČELINJIH DRUŠTAVA NA
TERITORIJI SRBIJE

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETRINARY MEDICINE
Department of Biology



Predrag R. Simeunović

MOLECULAR DETECTION AND
IDENTIFICATION OF MICROSPORIDIA
AND VIRUSES IN HONEY BEE
COLONIES IN SERBIA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentor 1:

Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Mentor 2:

Dr Dejan Vidanović, naučni saradnik,

Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo“

Članovi komisije:

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Jevrosima Stevanović, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Jakov Nišavić, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____ 2015.

Beograd

MOLEKULARNO-GENETIČKA DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA UZROČNIKA MIKROSPORIDIJALNIH I VIRUSNIH INFEKCIJA ZASTUPLJENIH KOD PČELINJIH DRUŠTAVA NA TERITORIJI SRBIJE

REZIME

Primena molekularno - genetičkih metoda zauzima značajno mesto u dijagnostici oboljenja kod životinja izazvanih delovanjem različitih vrsta uzročnika. Ove metode, uglavnom zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze (PCR), karakteriše zadovoljavajuća brzina izvođenja i visok stepen specifičnosti, odnosno osetljivosti.

Mikrosporidije pčela, *Nosema ceranae* i *Nosema apis*, ispoljavanjem patogenog efekta na individualnom nivou, mogu dovesti do gubitka čitavih pčelinjih društava. Umnožavanjem mikrosporidijalne DNK, PCR tehnika omogućava istovremeno utvrđivanje prisustva i identifikaciju uzročnika u uzorku u kojem mikroskopskim pregledom nije utvrđeno prisustvo spora. Pojedine vrste virusa mogu biti uzročnici poremećaja zdravstvenog stanja pčela. Među najznačajnije viruse koji mogu naneti štete pčelinjim društvima ubrajaju se virus deformisanih krila (DWV), virus akutne paralize pčela (ABPV), virus mešinastog legla (SBV) i virus hronične paralize pčela (CBPV). Pomenuti virusi često izazivaju inaparentne infekcije koje, usled delovanja nespecifičnih faktora i drugih patogena, za kratko vreme mogu prerasti u klinički manifestne i dovesti do gubitka pčelinjih društava. Primenom tehnike Real-time RT-PCR bazirane na TaqMan probama, moguće je otkriti prisustvo virusne RNK koja se

nalazi u niskoj koncentraciji u ispitanom uzorku. Ovo ima veliki značaj u dijagnostici virusnih infekcija kod pčelinjih društava koja ne ispoljavaju kliničke simptome bolesti.

Cilj ove doktorske disertacije je da se primenom molekularno-genetičkih metoda izvrši detekcija i identifikacija uzročnika četiri najčešće virusne infekcije (DWV, ABPV, SBV i CBPV) zastupljene kod pčelinjih zajednica različite jačine koje potiču iz različitih krajeva Srbije. Pored toga, istraživanje obuhvata i utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti mikrosporidija roda *Nosema* kod ispitivanih pčelinjih zajednica, kao i njihovu zastupljenost u mešovitim, mikrosporidijalno-virusnim, infekcijama.

U radu su kao uzorci korišćene pčele koje potiču iz 150 asimptomatskih pčelinjih društava. Odabrana su jaka (n=59), srednje jaka (n=32) i slaba (n=59) stacionarna pčelinja društva, raspoređena na lokalitetima i podlokalitetima severne (n=44), istočne (n=25), južne (n=21), zapadne (n=30) i centralne (n=30) Srbije. Izolacija mikrosporidijalne DNK i virusne RNK iz ispitivanog materijala izvršena je primenom komercijalnih kitova. U svrhu istovremene detekcije i identifikacije vrste mikrosporidija korišćena je duplex PCR tehnika, dok je utvrđivanje prisustva i vrste virusa u uzorcima pčela izvršeno primenom real-time RT-PCR tehnike bazirane na TaqMan probama. Izvršeno je sekvenciranje delova genoma ispitivanih virusa detektovanih u 16 odabranih RNK izolata. Nakon sekvenciranja, izvršena je „BLAST“ pretraga, deponovanje odabranih sekvenci iz Srbije u gensku bazu podataka i filogenetska analiza.

Nakon mikroskopskog pregleda analiziranih uzoraka utvrđena je zastupljenost od 72 % *Nosema* pozitivnih pčelinjih društava iz Srbije. PCR analiza pokazuje da je DNK mikrosporidije *N. ceranae* bila prisutna u 88 % uzoraka, odnosno u 18 % uzoraka u kojima mikroskopskim pregledom nije utvrđeno prisustvo spora, dok prisustvo DNK *N. apis* nije utvrđeno. Nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti ($p > 0.05$) u regionalnoj distribuciji *Nosema* pozitivnih uzoraka, kao ni pri ispitivanju uticaja jačine pčelinjeg društva na pojavu i intenzitet infekcije. Primenom real-time RT-PCR tehnike bazirane

na Taqman probama u 87,33 % uzoraka na teritoriji Srbije je utvrđeno prisustvo RNK ispitivanih pčelinjih virusa. Zastupljenost RNK DWV je utvrđena u 74 %, ABPV u 49,3 %, SBV u 24 % i CBPV u 6,7 % ispitivanih uzoraka. Odsustvo nukleinskih kiselina ispitivanih virusa pčela je zabeleženo u 12,67 % obrađenih uzoraka. Zastupljenost ABPV, SBV i CBPV značajno zavisi ($p < 0.05$) od regiona uzorkovanja, dok u slučaju DWV nije zabeležena značajnost u regionalnoj distribuciji. Jačina pčelinjeg društva ne utiče na distribuciju ispitivanih virusa, kao ni na intenzitet virusnih infekcija iskazan kroz Ct vrednost. Prisustvo RNK više od jednog ispitivanog virusa je zabeleženo u 56,67 % uzoraka. Zastupljenost mešoviti (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija značajno zavisi ($p < 0.05$) od regiona uzorkovanja. Nije utvrđen statistički značajan uticaj ($p > 0.05$) jačine pčelinjeg društva na zastupljenost i karakter mešoviti infekcija. Nakon sekvenciranja delova genoma odabranih detektovanih virusa u Srbiji, u gensku bazu podataka je deponovano 8 različitih sekvenci DWV, 1 sekvenca ABPV, 1 sekvenca CBPV i 1 sekvenca SBV. Rezultati filogenetske analize sekvenci pčelinjih virusa iz Srbije pokazuju odgovarajući stepen genetske sličnosti sa virusima utvrđenim u pčelinjim društvima širom sveta.

Dobijeni rezultati ukazuju da upotreba PCR tehnike u utvrđivanju prisustva uzročnika mikrosporidijalnih infekcija pčelinjih društava pokazuje veću osetljivost u odnosu na mikroskopski pregled. Odsustvo DNK *N. apis* i prisustvo DNK *N. ceranae* u *Nosema* pozitivnim ispitujućim uzorcima potvrđuje ranija istraživanja o dominantnosti *N. ceranae* u pčelinjim društvima u Srbiji. U ovoj doktorskoj disertaciji su izneti rezultati prve real-time RT-PCR pretrage prisustva i zastupljenosti DWV, ABPV, SBV i CBPV u pčelinjim društvima u različitim regionima Republike Srbije. Značajnost regionalnog uticaja u zastupljenosti virusa u pčelinjim društvima posledica je razlike u kvalitetu i dostupnosti pčelinje paše i primenjenim apitehničkim merama u različitim regionima Srbije. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da jačina društva nema uticaja na zastupljenost i intenzitet virusne infekcije kada su u pitanju asimptomatska pčelinja društva. Informacije o nukleotidnom sastavu sekvenci

pčelinjih virusa iz Srbije pružaju uvid u promene na posmatranim genima i upotpunjuju filogenetske analize evropskih sojeva ispitivanih virusa. Informacije su značajne i u pogledu istraživanja promena u genetskom sastavu koje bi mogle da dovedu do nastajanja novih i/ili virulentnijih sojeva.

Ključne reči: real-time RT-PCR, PCR, virusi, mikrosporidije, *Apis mellifera*.

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Veterinarska genetika

UDK broj: 577.21+57.088:616-022.1+616.993.19+57.083.2:638.1+1e(497.11)

MOLECULAR DETECTION AND IDENTIFICATION OF MICROSPORIDIA AND VIRUSES IN HONEY BEE COLONIES IN SERBIA

Summary

Molecular diagnostic in modern veterinary medicine plays an important role in diagnosis of animal health disorders. Major advantages of molecular diagnostic are quickness and high specificity and sensitivity in detection and identification of infectious and non-infectious agents. Microsporidia, *Nosema ceranae* and *Nosema apis*, as a consequence of pathogenic effects in individual bees may provoke losses of entire honey bee colonies. Amplification of microsporidial DNA using PCR allows simultaneous detection and identification of *Nosema* species in samples that appeared to be free from *Nosema* spores after microscopic examination. Honey bee viruses may have a significant impact on health status of honey bee colonies. Most common viruses considered to be able to cause damage to bee colonies include Deformed wing virus (DWV), Chronic bee paralysis virus (CBPV), Acute bee paralysis virus (ABPV) and Sacbrood virus (SBV). These viruses may exist in colonies in low infectious titres causing asymptomatic infection that due to the negative impact of non-specific factors and/or other pathogens may develop in to covert infection and lead to colony loss. High specificity and sensitivity of Real-time RT-PCR method based on TaqMan probes enables detection of very small amounts of viral RNA in bee samples originated from asymptomatic colonies which is advantage of this method compared to end point PCR.

The aim of this work is detection and identification of four most common viruses (DWV, ABPV, SBV and CBPV) in honey bee colonies of different strength originated from different Serbian regions. In addition, this investigation encompasses detection and regional distribution of microsporidia from the genus *Nosema* and their occurrence in mixed (microsporidia-virus) infections.

Samples used in this research are bees from 150 asymptomatic colonies. The selection of colonies is made in accordance to its (i) strength - strong (n=59), moderate (n=32) and weak (n=59), and (ii) regional distribution to localities and sub localities in North (n=44), East (n=25), South (n=21), West (n=30) and Central (n=30) part of Serbian territory. Total microsporidial DNA and viral RNA from previously prepared bee macerates were extracted using commercial kits. For the purpose of simultaneous detection and identification of *Nosema* species duplex PCR is used, while presence and identification of viruses was determined by Real-time RT-PCR method based on TaqMan probes. Subsequently, partial genomes of investigated viruses detected in 16 selected isolates were sequenced. Selected sequences from Serbia were identified by BLAST search and deposited in GenBank with subsequent phylogenetic analyses.

Results of microscopic examination showed presence of 72 % *Nosema* positive samples from Serbian bee colonies. *N. ceranae* DNA was detected in 88 % of samples after PCR analysis that is in 18 % of samples in which *Nosema* spores were not recorded by microscopic examination. Presence of *N. apis* were not recorded. No significance ($p>0.05$) was observed in regional distribution of *Nosema* positive samples. Also, colony strength did not influence significantly ($p>0.05$) on presence and intensity of *Nosema* infection. After Real-time RT-PCR analyses based on TaqMan probes viral RNA was found in 87,33 % samples from Serbia. Prevalence of DWV, ABPV, SBV and CBPV in investigated samples were 74 %, 49,3 %, 24 % and 6,7 %, respectively. None of the investigated

viruses was recorded in 12,67 % of samples. Prevalence of ABPV, SBV and CBPV, but no DWV is significantly depended ($p < 0.05$) upon regional distribution of investigated colonies. Distribution of bee viruses and intensity of viral infection (expressed through Ct value) proved to be under no influence of colony strength. Presence of multiple viral infection was recorded in 56,67 % of samples. Prevalence of mixed (microsporidia-virus) infections significantly depends ($p < 0.05$) on regional distribution of investigated colonies. No significant influence ($p > 0.05$) of colony strength on prevalence and nature of mixed infections was recorded. After partial genome sequencing of selected viruses from Serbia, 8 different DWV sequences, 1 ABPV, 1 CBPV and 1 SBV sequence were deposited in GenBank. The phylogenetic analyses of Serbian honeybee viruses revealed potential genetic relationships between representatives of the same virus species, detected in honeybees world-wide.

Obtained results of this investigation show the advantage of PCR compared to microscopic examination in detection of microsporidia from bee samples. The absence of *N. apis* DNA and presence of *N. ceranae* in each *Nosema* positive sample is in accordance with previous statements concerning dominance of *N. ceranae* in bee samples from Serbia.

These are the first results of Real-time RT-PCR survey concerning occurrence and distribution of DWV, ABPV, SBV and CBPV in honey bee colonies from different Serbian regions. Significant regional influence on viral prevalence in Serbian colonies is the consequence of discrepancies in forage quality and abundance, and also applied apicultural techniques from different regions of Serbia. Results obtained from this research showed no obvious influence of colony strength on prevalence and intensity of viral infection of asymptomatic honey bee colonies. Information concerning nucleotide sequences of bee viruses from Serbia provide the insight in mutations in analysed partial genes and complement results of phylogenetic analyses of

European strains. These information are significant in the terms of research of changes in genetic composition which could possibly lead to emergence of new and/or virulent strains.

Key words: real-time RT-PCR, PCR, viruses, microsporidia, *Apis mellifera*.

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Veterinary Genetics

UDC Number: 577.21+57.088:616-022.1+616.993.19+57.083.2:638.1+1e(497.11)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Mikrosporidije pčela.....	3
2.1.1. Mikrosporidija vrste <i>Nosema apis</i>	5
2.1.2. Mikrosporidija vrste <i>Nosema ceranae</i>	9
2.2. Virusi pčela.....	15
2.2.1. Opšte karakteristike virusa pčela	16
2.2.2. Virus deformisanih krila (DWV)	20
2.2.3. Virus mešinastog legla (SBV).....	23
2.2.4. Virus akutne paralize pčela (ABPV).....	25
2.2.5. Virus hronične paralize pčela (CBPV).....	28
2.2.6. Izraelski virus akutne paralize pčela (IAPV).....	31
2.2.7. Kašmirski pčelinji virus (KBV).....	34
2.2.8. Virus crnih matičnjaka (BQCV)	36
2.3. Udruženo delovanje mikrosporidija i virusa.....	38
2.4. Pregled metoda koje se koriste u detekciji i identifikaciji uzročnika mikrosporidijalnih i virusnih infekcija pčela.....	39
2.5. Istraživanja prisustva uzročnika mikrosporidijalnih i virusnih infekcija pčelinjih društava na teritoriji Srbije.....	43
3. CILJ I ZADACI RADA.....	44
4. MATERIJAL I METODE	45
4.1. Materijal.....	45
4.1.1. Odabir reprezentativnih lokaliteta i pčelinjih društava po lokalitetu.....	45
4.1.1.1. Odabir lokaliteta i podlokaliteta	45
4.1.1.2. Odabir pčelinjih društava po lokalitetu	47
4.1.2. Uzorkovanje materijala za pregled.....	47
4.2. Metode	49

4.2.1.	Ispitivanje prisustva mikrosporidija roda <i>Nosema</i> u uzorkovanom materijalu.....	49
4.2.1.1.	Mikroskopski pregled.....	49
4.2.1.2.	Izolacija mikrosporidijalne DNK.....	50
4.2.1.3.	Amplifikacija mikrosporidijalne DNK koristeći duplex-PCR metodu.....	50
4.2.1.4.	Elektroforeza dobijenih produkata i vizuelizacija pod UV svetlosti	52
4.2.2.	Ispitivanje prisustva pčelinjih virusa u uzorkovanom materijalu.....	52
4.2.2.1.	Priprema materijala za izolaciju virusne RNK	52
4.2.2.2.	Izolacija virusne RNK.....	52
4.2.2.3.	Amplifikacija virusne RNK primenom real time RT-PCR metode	53
4.2.3.	Sekvenciranje dela virusnog genoma.....	54
4.2.3.1.	Amplifikacija nuklinskih kiselina izabranih virusa putem RT-PCR tehnike	55
4.2.3.2.	Prečišćavanje PCR proizvoda iz gela radi sekvenciranja.....	57
4.2.3.3.	Primena metode sekvenciranja za potvrdu identifikacije nuklinskih kiselina virusa čije je prisustvo potvrđeno u uzorcima pčela.....	57
4.2.3.4.	Analiza rezultata sekvenciranja	58
4.3.	Statistička obrada.....	59
5.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	60
5.1.	Prisustvo i zastupljenost uzročnika mikrosporidijalnih infekcija u uzorcima pčela	60
5.2.	Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela	72
5.2.1.	Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija	

	u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije	74
5.2.2.	Prisustvo i zastupljenost mešovutih virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije	78
5.2.3.	Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava	84
5.2.4.	Prisustvo i zastupljenost mešovutih virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava	88
5.2.5.	Uticaj jačine pčelinjeg društva na intenzitet virusne infekcije	94
5.2.6.	Uticaj jačine pčelinjeg društva na odnos visine Ct vrednosti virus deformisanih krila/virus akutne paralize pčela u mešovitim virusnim infekcijama.....	99
5.2.7.	Uticaj jačine pčelinjeg društva na odnos visine Ct vrednosti virus deformisanih krila/virus mešinastog legla u mešovitim virusnim infekcijama.....	101
5.3.	Prisustvo i zastupljenost mešovutih (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija u uzorcima pčela	102
5.3.1.	Prisustvo i zastupljenost mešovutih (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije.....	105
5.3.2.	Prisustvo i zastupljenost mešovutih (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava	107
5.4.	Genetska identifikacija i filogenetska analiza virusa pčela iz Srbije	110

6. DISKUSIJA.....	116
6.1. Prisustvo i zastupljenost uzročnika mikrosporidijalnih infekcija u uzorcima pčela	116
6.2. Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela	122
6.2.1. Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije	125
6.2.2. Prisustvo i zastupljenost mešovutih virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije	129
6.2.3. Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava	130
6.2.4. Uticaj jačine pčelinjeg društva na intenzitet virusne infekcije	131
6.2.5. Prisustvo i zastupljenost mešovutih (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija u uzorcima pčela	133
6.2.6. Genetska identifikacija i filogenetska analiza virusa pčela iz Srbije.....	136
7. Zaključak.....	142
8. Zahvalnica.....	144
9. Spisak literature	145

UVOD

Medonosna pčela, *Apis mellifera*, vekovima je predstavljala predmet proučavanja istraživača iz različitih naučnih oblasti. Oduvek zanimljiva naučnoj javnosti sa stanovišta jedinstvene biološke i biološko-sociološke strukture, medonosna pčela zauzima mesto kao značajan ekološki i ekonomski faktor na globalnoj sceni. Njena uloga, kao jednog od najkorisnijih insekta na planeti je velika, kako ekonomski, tako i u pogledu očuvanja ukupnog biodiverziteta. Danas se medonosna pčela smatra jednim od najznačajnijih oprašivača ne samo gajenih biljaka, već i velikog broja biljaka divlje flore, te sa ekološkog aspekta predstavlja nezaobilaznog činioca u oprašivanju entomofilnih biljaka. Na taj način, ona oblikuje prirodni ekosistem omogućavajući protok gena skrivenosemenica (Magnoliophyta, Angiospermae), najrasprostranjenijeg i najraznovrsnijeg biljnog taksona. Sa ekonomske tačke gledišta, pčela je značajna kao oprašivač useva i gajenih biljaka, s jedne, odnosno kao proizvođač meda i drugih pčelinjih proizvoda, s druge strane. Imajući u vidu podatak da je oprašivanje 84% evropskih useva entomofilno, a vrednost useva koje pčele oprašuju u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) iznosi oko 15 milijardi dolara, možemo zaključiti da je ipak uloga pčele kao oprašivača u poljoprivredi mnogo veća od njene uloge kao proizvođača pčelinjih proizvoda. Zahtevi za oprašivanjem u poljoprivredi iz godine u godinu rastu tako da povećanje broja košnica na globalnom nivou od približno 45% u poslednjih pola veka nije neočekivano. Imajući to u vidu, opravdano je interesovanje i briga naučne i stručne javnosti za očuvanjem zdravlja pčela širom sveta. Mnogo je činilaca, različitog porekla, koji mogu dovesti do uspona i padova u sektoru pčelarstva. Pored fizičkih, hemijskih i bioloških, politički i socio-ekonomski činioci mogu dovesti do značajnih promena u ovom sektoru. Adekvatan primer se može naći u značajnom smanjenju broja pčelinjih društava u Evropi tokom 90-tih godina prošlog veka, kao posledica direktnog uticaja političkih i ekonomskih previranja nastalih raspadom Sovjetskog Saveza. U SAD se, takođe, ukupan

broj pčelinjih društava proporcionalno menja, sa variranjem iznosa prihoda koji pčelari imaju od poslova oprašivanja.

Pčelinja društva su podložna uticaju različitih nespecifičnih faktora spoljašnje sredine (abiotičkih i biotičkih), odnosno infekcijama različite etiologije čiji se broj značajno uvećao u proteklih 5 do 10 godina. Ovo za posledicu ima značajno povećanje gubitaka pčelinjih društava, koje je 100 do 1000 puta više u odnosu na Izveštaj Evropske unije iz 2010. godine. Dramatičan gubitak pčelinjih društava širom sveta, označen kao „kolaps pčelinjih društava“ ili „nestajanje pčela“ (eng. Colony Collapse Disorder, CCD) podstakao je istraživače iz oblasti biologije, ponašanja i bolesti pčela da sprovedu opsežna istraživanja koja bi otkrila uzroke koji su doveli do misterioznih gubitaka. Većina istraživača smatra da se nijedan pojedinačan faktor (klima, ishrana, infekcije, apitehničke mere i sl.) ne može okarakterisati kao glavni krivac za gubitke, već da oni nastaju kao posledica istovremenog delovanja više faktora. Najznačajniji patogeni uzročnici koji mogu izazvati ozbiljne posledice po pčelinju zajednicu su: parazitski krpelji (*Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Tropilaelaps* sp.); pripadnici carstva Fungi, (*Nosema* sp., *Ascospaera apis*); bakterije (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*); virusi i mala košnička buba (*Aethina tumida*). Od svih nabrojanih uzročnika, posebna pažnja naučne javnosti najviše je usmerena na uticaj parazitskih infekcija (pčelinji krpelj *V. destructor* i endoparaziti roda *Nosema*) i virusnih infekcija u pojavi kolapsa pčelinjih zajednica. Osim pojedinačnih štetnih efekata koje pomenuti patogeni ispoljavaju, postoje indicije da združene infekcije mogu dovesti do pojave kolapsa pčelinjih društava, odnosno, nestajanja pčela. Delovanje različitih virusa i njihova povezanost sa uginućima pojedinačnih pčela i pčelinjih društava, bilo je i još uvek je predmet mnogih istraživanja. Međutim, neki autori naglasak stavljaju na dominantnu ulogu mikrosporidije *Nosema ceranae* kao uzročnika gubitaka pčelinjih društava.

1. PREGLED LITERATURE

2.1. MIKROSPORIDIJE PČELA

Mikrosporidije (*Microsporidia*) predstavljaju široko rasprostranjene jednoćelijske, obligatne, intracelularne parazite koji se izvan ćelije domaćina mogu nalaziti isključivo u vidu metabolički neaktivnih spora (Mehlhorn, 2008). Ovi jednoćelijski organizmi veličine od 2 do 40 μm u prečniku, uprkos činjenici da ne poseduju mitohondrije, peroksizome i Goldžijev aparat, spadaju u eukariote i oportunističke parazite drugih eukariota (Corradi i Keeling, 2009). Upravo ove otporne, dvozidne spore predstavljaju infektivne oblike svih mikrosporidija, čijom ingestijom dolazi do infekcije domaćina. Kada se stvore adekvatni uslovi sredine, spore počinju da uzimaju vodu kroz akvaporine, što dovodi do rasta pritiska i uvećanja posteriornih vakuola. Povećanje intravakuolarnog pritiska dovodi do pucanja zida vakuole pri vrhu i protruzije membranozne organele označene kao polarni filamenat (polarna cevčica). Polarni filament zatim penetrira u ćeliju domaćina. Kroz polarni filament se prenosi sporoplazma u citoplazmu ćelije domaćina, nakon čega dolazi do inicijacije bespolnog razmnožavanja (Bigliardi i Sacchi 2001; Franzen 2005). U unutrašnjosti ćelije domaćina, mikrosporidije prolaze kroz proces šizogonije, merogonije i sporogonije. Razvoj ovog parazita se može odvijati kako u citoplazmi ćelije domaćina, tako i u parazitoformnim vakuolama, za koje se pouzdano ne zna da li se stvaraju u toku ili nakon invazije parazita. Rezultat infekcije ćelije domaćina je njena posledična destrukcija i oslobađanje spora u vanćelijski prostor i početak novog ciklusa.

Do danas je u literaturi opisano preko 1300 vrsta *Microsporidia* organizovanih u 160 rodova, na osnovu ćelijske strukture, životnog ciklusa i specifičnog odnosa prema domaćinu (Corradi i Keeling, 2009), pri čemu, gotovo

polovina parazitira u insektima (Weiss, 2001; Keeling, 2009). Pojedinačno, pripadnici različitih vrsta mikrosporidija najčešće mogu da inficiraju mali broj vrsta domaćina. Međutim, posmatrajući mikrosporidije u celini, prisustvo ovih parazita je utvrđeno u taksonomski širokom spektru domaćina, uključujući protiste, mnoge artropode kao i vertebrate (Becnel i Andreadis, 1999; Larsson, 1999; Vossbrinck i Debrunner-Vossbrinck, 2005). Zahvaljujući specifičnoj ćelijskoj organizaciji, u poslednjih 150 godina njihov taksonomski status je prilično nestabilan. Pomenuta taksonomska promenljivost na značaju dobija u poslednjih 30 godina uporedo sa razvojem elektronske mikroskopije i molekularnih metoda detekcije. Ujedno, povećava se interesovanje za mikrosporidije kao patogene životinja i ljudi, posebno kod imunokompromitovanih i HIV bolesnika (Weiss, 2001).

Švajcarski mikrobiolog Karl Wilhelm von Nageli je 1857. godine opisao prvu mikrosporidiju koju je nazvao *Nosema bombycis*. Naime, sredinom XIX veka došlo je do drastičnog pada u proizvodnji svile na Evropskom kontinentu usled pojave opasne bolesti koja je pogađala svilene bube (*Bombyx mori*). Istražujući inaktivni materijal, došlo se do nalaza karakterističnih globularnih struktura koje dobijaju ime *N. bombycis* (Nageli, 1857). Zanimljivo, autor ovu mikrosporidiju opisuje kao patogena sličnog gljivici i klasifikuje u *Shizomycetes*, što je veoma slično današnjem shvatanju taksonomskog statusa reda Microsporidia. Balbiani (1882) stvara grupu za *Nosema* parazite koju naziva mikrosporidije i svrstava u grupu protozoa, pod nazivom *Sporozoa* (Balbiani, 1882). Ideja o tipu *Sporozoa* se dugo zadržala u naučnoj javnosti, a obuhvatala je parazite koji formiraju spore (Kudo, 1947). Sa napredovanjem mikroskopije dolazi se do novih saznanja koja rezultiraju svrstavanjem mikrosporidija u tip *Cnidosporidia*. Na kraju, posle brojnih izmena taksonomskog statusa ovih mikroorganizama, javlja se predlog koji favorizuje fungalno poreklo mikrosporidija (Flegel i Pasharawipas, 1995), a njemu u prilog idu i podaci dobijeni publikacijom prvog mikrosporidijalnog genoma (Katinka, 2001). U

radovima novijeg datuma mikrosporidije zauzimaju status tipa (phylum) u okviru carstva *Fungi* (Nakjang i sar., 2013).

Samo dve vrste roda *Nosema*, iz čitavog tipa Microsporidia, parazitiraju u evropskoj medonosnoj pčeli (*A. mellifera*). Prva mikrosporidija pčela, opisana pre više od sto godina, nazvana je *Nosema apis* (Zander, 1909), dok je druga vrsta iz roda *Nosema*, *Nosema ceranae*, otkrivena i opisana dosta kasnije, 1994. godine, najpre u azijskoj pčeli (*A. cerana*) (Fries i sar., 1996), a zatim 2005. godine i u *A. mellifera* u Aziji (Huang i sar., 2007) i Evropi (Higes i sar., 2006).

2.1.1. Mikrosporidija vrste *Nosema apis*

N. apis je poznata naučnoj i stručnoj javnosti od kada je nemački naučnik Enoch Zander, opisao parazita srednjeg creva pčela i klasifikovao ga u mikrosporidije (Zander, 1909). Zanimljivo je da su prvi pisani tragovi o *N. apis* kao izazivaču teške bolesti pčela zabeleženi pre nego što je ovaj parazit opisan i klasifikovan (Donhoff i Leuckart, 1857). Ova mikrosporidija je širom sveta označena kao izazivač prilično destruktivnog oboljenja pčela (Bailey i Ball, 1991; Fries, 1997). U poslednjih nekoliko godina, ulogu dominantnog pčelinjeg endoparazita postepeno preuzima druga opisana vrsta, *N. ceranae*, koja se sve češće laboratorijski detektuje u uzorcima pčela (Chauzat i sar., 2007; Martín-Hernández i sar., 2007; Klee i sar., 2007; Tapaszti i sar., 2009; Stevanovic i sar., 2010,2013). Naime, danas se zna da nije tačna ranija pretpostavka da je *N. apis* patogen specifičan za *A. mellifera*, dok je *N. ceranae* specifična za *A. cerana*, što ukazuju rezultati istraživača širom sveta kojima je potvrđeno prisustvo *N. ceranae* u evropskim medonosnom pčelama (Huang i sar., 2007; Higes i sar., 2006; Fries et al., 2006; Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Chauzat et al., 2007; Chen et al., 2008b; Williams i sar., 2008; Tapaszti i sar., 2009; Giersch i sar., 2009; Stevanovic i sar., 2010,2013). Postoje tvrdnje da se *N. apis* i dalje zadržala kao dominantna u hladnijim klimatima, najverovatnije zahvaljujući većoj otpornosti

prema niskim temperaturama, odnosno manjoj otpornosti ka višim temperaturama nego što je to slučaj sa *N. ceranae* (Fries, 2010; Forsgren i Fries, 2010; Higes i sar., 2013). Istraživanja novijeg datuma pokazuju gotovo potpuno odsustvo *N. apis* na teritoriji bivše Jugoslavije, sa potpunom dominacijom *N. ceranae* (Tlak-Gajger i sar., 2010; Stevanovic i sar., 2010,2013).

Kao obligatni intracelularni parazit, *N. apis* parazitira u epitelnim ćelijama srednjeg creva (ventriculus) pčela dovodeći do ozbiljnih oštećenja. Infekcija nastupa nakon ingestije spora, kao isključivih infektivnih oblika, najčešće tokom obavljanja higijenskih aktivnosti u košnici ili prilikom razmene hrane među pčelama, pri čemu spore najčešće mogu biti prisutne u fecesu inficiranih pčela. Spore nakon ingestije dospevaju do srednjeg creva gde, pod odgovarajućim uslovima, dolazi do njihove germinacije (klijanja). Germinacija, odnosno klijanje, podrazumeva proces transformacija na sporama koji za posledicu ima evaginaciju i protruziju polarnog filameta i penetraciju u ćelije domaćina. Kroz polarni filament se prenosi sporoplazma sa dva nukleusa, dobijajući tom prilikom ćelijsku membranu (Weidner i sar., 1984). Najčešće prednji delovi srednjeg creva (ventrikulusa) bivaju inicijalno inficirani, nakon čega se infekcija postepeno širi na zadnje partije (Fries, 1988). Sporoplazma mikrosporidije unutar ćelije domaćina ubrzo sazreva do majke-ćelije, odnosno meronta. U periodu od 24 časa nakon infekcije nastupa faza merogonije, odnosno, dolazi do deoba parazita i pojave merozoita. Sledeća faza je faza sporogonije koja se odlikuje višestrukim deobama, pri čemu merozoiti sazrevaju do sporonta koji se, tipično za rod *Nosema*, jednom dele dajući dva sporoblasta. Sporoblasti u završnoj fazi razvoja sazrevaju u spore. Pod optimalnim uslovima, kompletni razvoj parazita, odnosno period od ingestije spore do formiranja novih spora, traje 48-60 časova. Nakon infekcije prve epitelne ćelije srednjeg creva, u roku od dve nedelje, pri optimalnim ambijentalnim uslovima, čitav ventrikulus biva inficiran i tom prilikom se može naći između 30 i 50 miliona spora po pčeli (Bailey i Ball, 1991). Intenzivnim deobama parazit oštećuje ćelije domaćina, pri čemu se spore oslobađaju u

lumen creva, te dolazi do infekcije drugih ćelija, odnosno izbacivanja spora u spoljašnju sredinu putem fecesa. Međutim, usled izuzetno brzog širenja infekcije u epitelu creva, postavljena je hipoteza intercelularnom načinu infekcije, odnosno, postojanju spora sa tankim zidovima koje kličaju dok su još unutar ćelije domaćina i inficiraju susedne ćelije crevnog epitela (Fries 1988; De Graaf i sar., 1994), dok se drugi tip spora sa debljim zidovima izbacuju u spoljašnju sredinu fecesom i služe za širenje infekcije na druge pčele. Te "sredinske" spore debelih zidova zbog svoje otpornosti prema niskim temperaturama mogu dugo zadržati vijabilnost (u košnici čak godinu dana) (Bailey i Ball, 1991). Verovatno dva najznačajnija „rezervoara“ *N. apis* spora u košnici čine žive inficirane pčele i depoi vijabilnih spora u/na vosku, medu i unutrašnjosti košnice (Malone i sar., 2001).

Promene koje nastaju kao posledica *N. apis* infekcije se mogu tumačiti na osnovu promena na pojedinačnim pčelama, kao i na nivou pčelinjeg društva. Sve odrasle pčele su podložne infekciji (Bailey, 1981), međutim, najverovatnije zbog higijenskih aktivnosti koje postoje kod radilica, ali ne i kod trutova i matica, znatno je veći procenat zaraženih radilica u odnosu na maticu i trutove (Fyg, 1945; Bailey, 1972). Zanimljivo je i da inficirane radilice smanjenom učestalošću hrane maticu, te se na taj način smanjuje ili izbegava inficiranje matice (Wang i sar., 1970). Najčešća klinička slika *N. apis* infekcije, posmatrajući individualne odrasle pčele, je odsustvo specifičnih vidljivih promena, pri čemu izuzetak čine slučajevi teško inficiranih jedinki kod kojih se može zapaziti pojava bledih i proširenih abdomena (Fries, 1997). Klinička slika nozemoze na nivou pčelinjeg društva se karakteriše promenama koje nastaju kao direktna posledica patogenog efekta *N. apis*, ali i usled poremećaja u ponašanju pčela, iscrpljenih od infekcije. Usled patogenog delovanja parazita i oštećenja crevnog epitela, dolazi do pojave dijareje. Dijareja se manifestuje fekalnim mrljama braon boje koje se javljaju po ramovima i prednjim stranama tela košnice (Faucon, 2005; OIE, 2008). Dijareja je izuzetno bitan činilac u procesu širenja infekcije jer se njenom pojavom uzročnik efikasnije prenosi, dok simptomi

bolesti intenziviraju. Promene na individualnom nivou se još mogu manifestovati poremećajima u ponašanju pčela radilica koje podrhtavaju u nemogućnosti da polete, na satonošama i ispred košnica (Faucon, 2005; OIE, 2008). Smanjenje prinosa meda i drugih pčelinjih proizvoda, slab razvoj društva sa posledičnim smanjenjem broja pčela, skraćenje njihovog životnog veka i posledični gubici teško inficiranih društava (Fries, 1993) su najvažniji simptomi *N. apis* infekcije na nivou pčelinje zajednice. Slab razvoj i napredovanje inficiranih društava je direktna posledica patoloških promena kod inficiranih matica i radilica. Kod inficiranih matica je zapaženo smanjenje kapaciteta polaganja jaja usled degenerativnih promena na jajnicima (Fyg, 1945; Hassanein, 1951; Liu, 1992). Matice koje se inficiraju tokom sezone, često budu zamenjene od strane radilica. Na osnovu činjenice da jedino matica defecira unutar košnice, zamena inficirane matice je izuzetno bitan prirodni mehanizam usporavanja širenja, ali i ublažavanja posledica infekcije (Bailey i Ball, 1991). Slab prolećni razvoj legla kod *N. apis* inficiranih društava je posledica i smanjene aktivnosti hipofaringealnih žlezda pčela inficiranih pčela hraniteljica (Lotmar, 1936,1939; Hassasein, 1953; Wang i Moeller, 1970), odnosno smanjene proizvodnje hrane za larve. Pored pomenutih problema u vezi ishrane potomstva, inficirane pčele, u odnosu na neinficirane, pre vremena postaju izletnice (Hassanein, 1953) što doprinosi njihovom bržem fiziološkom starenju (Wang i Moeller, 1970). Dugi zimski periodi koji onemogućavaju izlazak pčela povećavaju rizik od pojave znakova nozemoze usled učestalog defeciranja unutar košnice (Wang i Moeller, 1970). Seljenje društava, naročito na početku sezone, kao i prenaseljenost košnica na jednom lokalitetu, takođe povećavaju rizik od pojave bolesti (Bailey, 1981). Upotreba antibiotske terapije zasnovane na fumagilinu može za posledicu imati niz negativnih efekata kako na pčele, tako i na konzumente pčelinjih proizvoda (Stanimirovic i sar., 2007).

Sumnja na postojanje nozemoze izazvane mikrosporidijom *N. apis* se može postaviti na osnovu kliničkog pregleda društva, odnosno nalazom fekalnih mrlja na košnici i satonošama, kao i prisustvom pčela sa nadutim

abdomenima koje drhte i ne mogu da polete. Međutim, sigurna dijagnoza se postavlja laboratorijskim ispitivanjima, odnosno upotrebom svetlosne mikroskopije u detekciji spora iz macerata abdomena pčela i vrsta-specifičnom PCR metodom. U sledećem poglavlju posvećenom dijagnostici mikrosporidijalnih i virusnih oboljenja, odnosno ispitivanju prisustva izazivača pomenutih infekcija, biće detaljno opisane laboratorijske tehnike i postupci u otkrivanju uzročnika.

2.1.2. Mikrosporidija vrste *Nosema ceranae*

N. ceranae predstavlja jednu, od ukupno dve vrste mikrosporidija koje parazitiraju na medonosnom pčelama. Njeno prisustvo, ujedno i otkriće, je potvrđeno u uzorcima azijskih pčela (*A. cerana*) poreklom iz Kine (Fries i sar., 1996), a nešto kasnije ovaj parazit je pronađen i u evropskoj medonosnoj pčeli *A. mellifera* (Higes i sar., 2006). Trenutno se *N. ceranae* smatra jednim od najzastupljenijih pčelinjih patogena širom sveta (Fries, 2010; Higes i sar., 2010; Bernal i sar., 2011; Traver i Fell, 2011; Medici i sar., 2012; Martínez i sar, 2012), pri čemu se sve više njeno prisustvo, smatra presudnim u pojavi gubitaka pčelinjih društava. Naime, istraživanja vršena u Španiji i zemljama sa sličnom klimom, pokazuju čvrstu povezanost između gubitaka društava i infekcije ovom mikrosporidijom (Higes i sar., 2006,2010,2013; Bacandritsos i sar., 2010; Borneck i sar., 2010; Soroker i sar., 2011). Suprotstavljanje pomenutom stavu izneli su u svojim radovima autori iz zemalja sa hladnijom klimom (Gisder i sar., 2010; Hedtke i sar., 2011; Stevanovic i sar., 2011; 2013; Dainat i sar., 2012) navodeći da je za pun destruktivan efekat potrebno da se ispune i dodatni uslovi. Specifičnosti vezane za savladavanje barijere vrste za *N. ceranae*, odnosno vreme i način prelaska parazita sa izvornog domaćina - *A. cerana*, na novog domaćina - *A. mellifera*, još uvek nisu potpuno razjašnjene. Naime, istraživanja genoma *N. ceranae* koje su nađene u uzorcima evropske i azijske medonosne pčele, od strane Huang i sar. (2008), pokazuju minimalne ili gotovo

nikakve razlike. To sugerise na zaključak da barijera vrste za ovu mikrosporidiju gotovo i da ne postoji. S tim u vezi, vreme i mesto prelaska na novog domaćina ostaje nepoznanica. Analiza arhivskih uzoraka evropske medonosne pčele u SAD, poreklom iz sredine 90-tih godina prošlog veka, dala je pozitivan nalaz na *N. ceranae* (Chen i sar., 2008b), dok je najstariji slučaj prisustva *N. ceranae* u *A. mellifera* zabeležen u Urugvaju, analizom uzoraka koji datiraju i pre 1990. godine (Invernizzia i sar., 2009). Rastuća incidencija *N. ceranae* infekcije u pčelinjim društvima u Severnoj Americi (Williams et al., 2008) i Evropi (Martín-Hernández i sar., 2007; Stevanovic i sar., 2011,2013; Forsgren i Fries, 2013) se može objasniti uticajem toplije klime, gde je ovaj parazit dominantan. U hladnijim predelima *N. apis* infekcija i dalje ostaje dominantan nalaz. Međutim, istraživanja Paxton i sar. (2007) i Fries i Forsgren (2008) pokazuju veću zastupljenost *N. ceranae* u Finskoj u poređenju sa Švedskom i Norveškom, iako su klimatski uslovi jako slični. Objašnjenje za ovu pojavu treba tražiti u uvozu pčelinjih društava iz južne Evrope, koju Finska praktikuje.

Popularnost *N. ceranae*, kao značajnog pčelinjeg patogena, je u najvećoj meri posledica tvrdnji da, ako se infekcija u društvima ne kontroliše, dolazi do njihovog kolapsa (Martín-Hernández i sar., 2007; Higes i sar., 2008,2009,2010). U suprotnosti sa ovom tvrdnjom stoje nalazi Siede i sar. (2008) i Gisder i sar. (2010) koji pokazuju da, iako je *N. ceranae* prevalentnija u nemačkim pčelinjim društvima, ne postoji čvrsta veza između infekcije i zimskih gubitaka. Kao jedno od mogućih objašnjenja za sposobnost *N. ceranae* da izazove kolaps društva, navodi se razlika u patogenosti ispitivanih sojeva (Higes i sar., 2013). Nekoliko autora smatra da su patogeni efekti ovog parazita u tesnoj vezi sa većom virulencijom španskog soja (Genersch, 2010; Huang i sar., 2012). Naime, molekularna klasifikacija mikrosporidija se u najvećoj meri oslanja na analize ribozomalne DNK (rDNK), a organizacija različitih domena u okviru ove genske grupe varira u odnosu na vrstu (Ironsides, 2007). Organizacione jedinice dela genoma rDNK za *N. ceranae* su raspoređene na jedinstven način: 5s

subjedinica je smeštena na 5' kraju, a intergenski region (eng. intergenic spacer region, IGS), mala subjedinica (eng. small subunit, SSU), interni transkribovani region (eng. internal transcribed spacer, ITS) i velika subjedinica (eng. large subunit, LSU) na 3' kraju (Huang i sar., 2008). Imajuću u vidu pomenutu organizaciju, interesantna je pojava brojnih polimorfizama u okviru istog izolata *N. ceranae* (Huang i sar., 2008; Sagastume i sar., 2010) jer primećena rekombinacija (Sagastumei sar., 2010) nije svojstvena za organizme za koje se veruje da se razmnožavaju bespolno. Objašnjenje treba tražiti u mogućnosti postojanja prelazne diploidne faze koja bi nastajala nakon fuzije dve parazitske ćelije unutar ćelije domaćina, nakon čega bi, rekombinacijom, nastale varijante koje ne postoje kod „roditeljskih“ sojeva. U prilog rešavanju otvorenih pitanja vezanih za genom *N. ceranae*, ne ide ni činjenica da postoje različite, često suprotstavljajuće filogenije, bazirane na sekvencama SSU ribozoma (Fries, 2010; Choi i sar., 2011). Za sada ne postoji konsenzus oko taksonomskog odnosa između *N. ceranae* sa jedne, i *N. apis* i *N. bombi* sa druge strane, kao srodnih vrsta (Slamovits i sar., 2004; Vossbrinck i Debrunner-Vossbrinck, 2005; Wang i sar., 2006; Shafer i sar., 2009; Chen i sar., 2009; Choi i sar., 2011). Saglasnost nije postignuta ni oko moguće veze specifičnih haplotipova i stepena oštećenja domaćina (Tay i sar., 2005; Williams i sar., 2008). Međutim, treba naglasiti da je virulentnost posledica uzajamnog odnosa parazita i domaćina na različitim nivoima (Frank, 1996; Frank i Schmid-Hempel, 2008).

Dominantnost nalaza *N. ceranae* u pčelinjim društvima, klinički znaci i uticaj infekcije na stepen preživljavanja pčelinjih zajednica predstavljaju predmet brojnih diskusija, u kojima su često suprotstavljani stavovi. Naime, *N. apis* infekcija pokazuje nisku prevalenciju u toplijim mesecima, odnosno tokom leta i većeg dela jeseni, nešto više krajem jeseni i tokom zime, a najviši stupanj doživljava u proleće, pre nego stare pčele budu zamenjene mladim. Prevalencija *N. ceranae* infekcije se različito prikazuje zavisno od klimatskih karakteristika ispitivanog područja. Ispitivanja *N. ceranae* infekcije pokazuju visoku prevalenciju u toplijim klimatima, ali odsustvo sezonalnosti (Martín-Hernández

i sar., 2007; 2012; Higes i sar., 2008; Hedtke i sar., 2011; Runckel i sar., 2011; Traver i Fell, 2011; Medici i sar., 2012; Smart i Sheppard, 2012; Botías i sar., 2012a; Dainat i sar., 2012). Međutim, za razliku od pomenutih autora, Gisder i sar. (2010) u svojim rezultatima navode prisustvo sezonalnosti i generalno nisku prevalenciju u Nemačkoj (1,3 - 14,9%). Na osnovu ispitivanja učestalosti infekcije u Srbiji, Stevanovic i sar. (2013) navode prisustvo sezonalnosti (nalik pomenutoj sezonalnosti kod *N. apis* infekcije) uz visoku opštu prevalenciju tokom cele godine (73 - 98%). Dominantnost *N. ceranae* infekcije u odnosu na *N. apis* infekciju je, u najvećem broju slučajeva, potvrđena u toplijim klimatima (Martín-Hernández i sar., 2007, 2012), dok je *N. apis* zastupljenija u hladnijim predelima (Williams i sar., 2008; Fries i Forsgren, 2008). Međutim, u ovom slučaju postoji izuzetak, jer *N. ceranae* pokazuje visoku dominantnost u balkanskim zemljama i zemljama okruženja u kojima je nešto umerenija klima (Tapasztó i sar. 2009; Tlak Gajger i sar. 2010; Bacandritsos i sar. 2010; Stevanovic i sar. 2011, 2013; Simeunovic i sar., 2014b).

Na osnovu podataka o epizootiološkim, simptomatološkim i razlikama u patološkim karakteristikama *Nosema* spp infekcije, na radionici COLOSS-a 2009. godine, kao i u revijalnom radu Higes i sar. (2010), uvodi se termini nozemoza tip A, za infekciju čiji je uzročnik *N. apis*; i nozemoza tip C, za *N. ceranae* infekciju. Na osnovu takve klasifikacije, nozemoza tip C se odlikuje odsustvom simptoma primećenih kod *N. apis* infekcije (Martín-Hernández i sar. 2007; Higes i sar. 2008, 2009, 2010). U petogodišnjem istraživanju Stevanovic i sar. (2013) navode da postoji jasno prisustvo fekalnih mrlja (tipičan znak *N. apis* infekcije) po ramovima i košnici tokom cele godine. Suprotno stavu o direktnoj vezi uginuća društva i *N. ceranae* infekcije, stoji istraživanje većeg broja autora, koje pokazuje da infekcija, kao jedini činilac, ne može dovesti do gubitka društva (Cox-Foster i sar. 2007; vanEngelsdorp i sar. 2009; Genersch i sar. 2010; Gisder i sar. 2010; Stevanovic i sar. 2011; 2013; Dainat i sar. 2012). Način infekcije, putevi širenja parazita, oštećenje epitela srednjeg creva, zajedničke su karakteristike infekcija obe vrste, *N. apis* i *N. ceranae*. Razlike se ogledaju i u tome što se DNK

N. ceranae nalazi i u drugim tkivima, kao što su Malpigijeve cevčice, hipofaringealne i pljuvačne žlezde (Chen i sar., 2009; Gisder i sar., 2010; Copley i Jabaji, 2012), glava, toraks, jajnici, spermateka i jaja (Traver i Fell, 2012), međutim ovi nalazi još uvek nisu histopatološki potvrđeni, niti su pronađeni razvojni oblici *N. ceranae* u nekim od nabrojanih tkiva, sem u epitelnim ćelijama creva (Higes i sar., 2007; García-Palencia i sar., 2010).

Kontrola podele rada između radilica i proces sazrevanja negovateljica u izletnice kod inficiranih pčela, posledica su povećanja titra juvenilnog hormona (Higes i sar., 2013; Ares i sar., 2012), smanjene ekspresije gena za vitelogenin (Vg) (Antúnez i sar., 2009) i povećanja nivoa feromona etil oleata (Dussaubat i sar., 2010). Povećano uzimanje šećera i smanjena učestalost razmene hrane (Naug i Gibbs, 2009), takođe se mogu videti kod inficiranih pčela, pri čemu se nivo šećera u hemolimfi smanjuje, dovodeći do pojave energetskeg stresa (Mayack i Naug, 2010). Takvo, izmenjeno energetske stanje pčela umanjuje letačke aktivnosti izletnica za dve trećine u poređenju sa neinficiranim pčelama (Kralj i Fuchs, 2010). Matice u društvima u kojima je ustanovljeno prisustvo *N. ceranae* ispoljavaju značajno slabije reproduktivne i produktivne performanse (Simeunovic i sar., 2014b). Društvo koje se nalazi u stanju energetskeg stresa je podložnije pojavi bolesti kao što je krečno leglo (Hedtke i sar., 2011), a efikasnost borbe protiv pčelinjeg krpelja *V. destructor* je značajno smanjena (Botías i sar., 2011).

Postavljanje dijagnoze nozemoze izazvane mikrosporidijom *N. ceranae* i otkrivanje prisustva uzročnika u pčelama se izvode na način opisan u poglavlju koji opisuje karakteristike *N. apis* infekcije. Upotreba svetlosne mikroskopije je osnova u otkrivanju prisustva spora *N. ceranae* u maceratu abdomena pčela, međutim, zbog velike sličnosti u njihovoj građi i veličini, izuzetno slabu pouzdanost pokazuje u diferencijaciji spora *Nosema* vrsta mikrosporidija. Za pouzdanu detekciju i vrsta-specifičnu diferencijaciju, koriste se savremene molekularno-genetičke metode: duplex-PCR (Stevanovic i sar. 2011, 2013), RFLP-PCR (Stevanovic i sar. 2011), real-time PCR (Traver i Fell, 2011) i metod izotermalne amplifikacije nukleinskih kiselina (eng. Loop mediated isothermal amplification – LAMP) (Ptaszyńska i sar., 2014).

2.2. VIRUSI PČELA

Počev od 1963. godine, kada su prvi put izolovani virus hronične paralize pčela i virus akutne paralize pčela (Bailey i sar., 1963), virusima se pridaje značaj kao izazivačima brojnih poremećaja zdravstvenog stanja pčela. Razlog porastu interesovanja naučne i stručne javnosti za probleme virusnih infekcija pčelinjih društava treba tražiti u još nedovoljno ispitanim okolnostima koje mogu dovesti do pojave oboljenja. Do danas su kod pčela identifikovana najmanje 22 različita virusa (Bailey i Ball, 1991; Allen i Ball, 1996; Ellis i Munn, 2005; Chen i Siede, 2007; Genersch i Aubert, 2010; Runckel i sar., 2011). Većina otkrivenih pčelinjih virusa, u organizmu pčela i pčelinjim društvima, može da egzistira i koegzistira ne izazivajući nikakve vidljive promene. Primena savremenih, osetljivih dijagnostičkih molekularnih tehnika, pokazala je visoku učestalost pomenute pojave (Bakonyi i sar., 2002; Tentcheva i sar., 2004; Chen i sar., 2005; Forgach i sar., 2008; Gauthier i sar., 2007; Cornman i sar., 2013; Chejanovsky i sar., 2014). U korak sa inovacijama iz oblasti molekularne dijagnostike, raste i mogućnost primene te sofisticirane tehnologije ne samo u otkrivanju prisustva, već i u ispitivanju nasledne osnove izazivača virusnih bolesti pčela. Na osnovu dosadašnjih istraživanja, sledećih sedam virusa se mogu okarakterisati kao najznačajniji virusi koji inficiraju pčelinje zajednice: virus crnih matičnjaka (eng. Black Queen Cell Virus - BQCV), virus deformisanih krila (eng. Deformed Wing Virus - DWV), virus mešinastog legla (eng. Sacbrood Virus - SBV), virus hronične paralize pčela (eng. Chronic Bee Paralysis Virus - CBPV), virus akutne paralize pčela (eng. Acute Bee Paralysis Virus - ABPV), kašmirski pčelinji virus (eng. Kashmir Bee Virus - KBV) i izraelski virus akutne paralize pčela (eng. Israeli Acute Paralysis Virus - IAPV) (Chen i Siede, 2007; Maori i sar., 2007; de Miranda i Genersch, 2010). Od pomenutih sedam virusa, kao najčešći i najvažniji uzročnici poremećaja zdravstvenog statusa i reproduktivno - proizvodnih karakteristika pčelinjeg

društva, navode se virus deformisanih krila, virus akutne paralize pčela, virus mešinastog legla i virus hronične paralize pčela (Tentcheva i sar., 2004; Berenyi i sar., 2006; Genersch i Aubert, 2010). Karakteristike genoma, načini infekcije, putevi širenja, klinička slika i posledice po pčelinje društvo pomenutih sedam virusa su bili predmet istraživanja većeg broja autora širom sveta (Stoltz i sar., 1995; Allen i Ball, 1996; Hung i sar., 2000; Grabensteiner i sar., 2001; Benjeddou i sar., 2001; Tentcheva i sar., 2004; Chen i sar., 2005; Yue i Genersch, 2005; Berenyi i sar., 2006; Chantawannakul i sar., 2006; Antúnez i sar., 2006; Ribiere i sar., 2008; Ai i sar., 2012; Muli i sar., 2014). Svi navedeni virusi spadaju u grupu jednolančanih RNK virusa, veličine oko 20-30 nm u prečniku.

2.2.1. Opšte karakteristike virusa pčela

Virusi koji su do sada izolovani iz uzoraka pčela kao genetsku osnovu mogu imati deoksiribonukleinsku (DNK virusi) i ribonukleinsku kiselinu (RNK virusi). Najveći broj do sada identifikovanih pčelinjih virusa spada u grupu jednolančanih RNK virusa. Svih sedam virusa (BQCV, DWV, SBV, CBPV, APBV, KBV, IAPV) koji mogu izazvati ozbiljnije posledice po pčelinje zajednice, spadaju u grupu jednolančanih RNK virusa sa pozitivno orijentisanim RNK lancem. U skladu sa odredbama Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa (International Committee of Taxonomy of Viruses - ICTV), pčelinji virusi koji mogu da izazovu ozbiljne posledice po pčelinje društvo svrstavaju se u red Picornavirales (King i sar. 2012; Adams i sar., 2013). Virusi reda Picornavirales inicijalno su nazvani „picorna-like“ ili „picornavirus-like“ virusi jer sekvencom svog genoma i strukturom viriona podsećaju na viruse pripadnike familije Picornaviridae, recimo polioviruse (Cristian i sar., 2005; Le Gall i sar., 2008).

Analizom strukture genoma i viriona pripadnika reda Picornavirales kod beskičmenjaka možemo izdvojiti sledeće zajedničke karakteristike:

- virusna čestica je ikosaedrične simetrije i nema spoljašnji omotač, a veličina virusa se kreće oko 30 nm u prečniku;
- genom virusa se sastoji iz jednog pozitivno orijentisanog RNK lanca;
- mali protein (VPg, manji od 5 kDa) je kovalentno vezan za 5' kraj RNK genoma;
- jednolančana RNK služi kao iRNK (nema sub-genomskih iRNK);
- kapsid virusa se sastoji iz 60 kapsomera.

Red Picornavirales čini pet familija: Dicistroviridae, Iflaviridae, Marnaviridae, Picornaviridae i Secoviridae (King i sar. 2012; Adams i sar., 2013). Za izučavanje patogenog uticaja koji virusi imaju po zdravstveno stanje pčelinjih društava, od izuzetnog značaja su dve familije, Dicistroviridae i Iflaviridae. Kriterijum za svrstavanje virusa u ove dve familije je zasnovan na specifičnosti genoma. Osnovnu razliku u genomu virusa navedenih familija predstavlja broj informacija koju nosi virusna RNK. Virus koji pripadaju obema familijama poseduju nesegmentisani molekul RNK sa različitim brojem cistrona, odnosno "okvira čitanja" (eng. "open reading frame", ORF) koji kodiraju strukturne i/ili nestrukturne proteine, što ih klasifikuje u dve odvojene familije virusa. U zavisnosti od broja cistrona, virusna RNK može biti monocistronska ili dicistronska (van Regenmortel i sar., 2000), tako da monocistronske genome imaju virusi iz familije Iflaviridae, a dicistronski genom virusi iz familije Dicistroviridae (King i sar. 2012; Adams i sar., 2013).

Familiju Iflaviridae čini jedan rod virusa označen kao *Iflavirus* (Adams i Carstens, 2012; King i sar. 2012; Adams i sar., 2013). Virus hronične paralize pčela, do danas, nije svrstan u određenu familiju i rod, već se označava samo kao RNK virus (Ribière i sar., 2010, 2012). U okviru ovog roda mogu se razlikovati sledeći virusi značajni za zdravstveno stanje pčelinjeg društva:

- Rod *Iflavirus*
 - Vrste:
 - virus deformisanih krila (DWV),
 - virus mešinastog legla (SBV),
 - virus spore paralize pčela (SBPV) i
 - Kakugo virus, koji se dugo smatrao varijantom virusa deformisanih krila.

Iflavirusi poseduju jedinstveni veliki ORF, koji kodira sintezu strukturnih i nestrukturnih proteina. Poput pikornavirusa kičmenjaka, i u ovom slučaju 5' region genoma virusa kodira sintezu proteina kapsida a 3' region sintezu nestrukturnih proteina. Za 5' kraj genoma kovalentno se vezuje peptid male molekulske mase (VPg) koji igra značajnu ulogu u procesu replikacije virusne RNK (King i sar. 2012). Za razliku od pikornavirusa kičmenjaka, virusima iz roda *Iflavirus* nedostaje 2A-proteaza/2B/2C region (van Regenmortel i sar., 2000).

U okviru porodice Dicistroviridae razlikujemo sledeće rodove virusa i u okviru njih vrste značajne za zdravstveni status pčelinjih društava (Adams i Carstens, 2012; King i sar. 2012; Adams i sar., 2013):

- Rod *Cripavirus*
 - Vrsta:
 - virus crnih matičnjaka (BQCV)
- Rod *Apavirus*
 - Vrste
 - virus akutne paralize pčela (ABPV)
 - kašmirski pčelinji virus (KBV)
 - izraelski virus akutne paralize pčela (IAPV)

Virusi iz porodice Dicistroviridae poseduju markantnu karakteristiku zbog koje su svrstani u jedinstvenu familiju, a koja ih odvaja od drugih virusa pripadnika reda Picornavirales. Ta osobina se odnosi na strukturu virusnog genoma a podrazumeva postojanje dva ORF u okviru nesegmentisanog molekula RNK. U ovom slučaju jedan ORF (ORF1 u okviru 5' regiona) kodira sintezu nestrukturnih proteina, dok drugi (ORF2 u okviru 3' regiona) kodira sintezu strukturnih proteina (van Regenmortel i sar., 2000; Ongus i sar., 2004).

Replikacija virusa pčela se odigrava u citoplazmi ćelija domaćina. Virusne partikule prijanjaju na površinu ćelije domaćina i stupaju u reakciju sa prisutnim receptorima ćelijske membrane. Nakon što se ubaci u unutrašnjost ćelije domaćina, virusna RNK se prepisuje do jedinstvenog poliproteina koji naknadno biva podeljen u strukturne proteine i funkcionalne proteine značajne za replikaciju virusa. Zahvaljujući RNK-zavisnoj RNK polimerazi, pozitivno orijentisan lanac RNK se transkribuje u negativno orijentisan RNK lanac. On služi kao posrednik i matrica za sintezu novog, pozitivno-orijentisanog RNK lanca koji ulazi u sastav virusne čestice.

Danas su parcijalne i celokupne sekvence genoma svih pomenutih virusa poznate i registrovane u genskoj bazi podataka: ABPV (GenBank Accession No.: AF486072), BQCV (GenBank Accession No.: KM255693.1), DWV (GenBank Accession No.: NC- 004830), Kakugo virus (KV) (GenBank Accession No.: NC_005876), KBV (GenBank Accession No.: NC-004807), i SBV (GenBank Accession No.: NC_002066), dok su za CBPV poznate samo parcijalne sekvence genoma.

2.2.2. Virus deformisanih krila (DWV)

Virus deformisanih krila (DWV) je jedan od najispitivanijih pčelinjih virusa jer se njegova pojava i posledice infekcije blisko povezuju sa infestacijom pčelinjim krpeljom *V. destructor* i posledičnim propadanjem pčelinjih zajednica (Ball i Allen, 1988; Nordström, 2003; Tentcheva i sar., 2004; Highfield i sar., 2009; Genersch i Aubert, 2010; Dainat i sar., 2012). Virus je prvi put izolovan iz uzoraka pčela poreklom iz Japana početkom '80-tih godina prošlog veka, a do danas je njegovo prisustvo zabeleženo širom sveta (de Miranda i Genersch, 2010; Genersch i Aubert, 2010; Martin i sar., 2013). Zastupljenost ovog virusa u pčelinjim društvima se može smatrati uobičajenom pojavom, jer u najvećem broju slučajeva, prisutan u niskim koncentracijama, izaziva latentne infekcije (Yue i sar., 2007; de Miranda i Fries, 2008).

Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da DWV poseduje ikosaedričnu simetriju, veličine je približno 30 nm i sastoji se od jednolančanog pozitivno orijentisanog molekula RNK i tri glavna strukturna proteina (Bailey i Ball, 1991). Genom virusa se sastoji iz 10144 nukleotida (Lanzi i sar., 2006) i poseduje jedan veliki "okvir čitanja" koji kodira sintezu prekursora viralnih polipeptida, što ga svstava u familiju Iflaviridae, deleći sve opisane karakteristike pripadnika roda *Iflavirus*.

Prisustvo virusa deformisanih krila je otkriveno u svim životnim stadijumima pčela, od jaja do odraslog oblika-adulta, kao i u žlezdanim sekretima koji su sastavni deo hrane za larve i maticu (Chen i sar., 2005, 2006; Yue i sar., Genersch, 2005). Predilekciono mesto za replikaciju virusa su epitelne ćelije srednjeg i zadnjeg creva, što rezultuje velikim brojem viriona u lumenu creva (Fievet i sar., 2006). Druga poznata mesta umnožavanja ovog virusa su žlezdane ćelije u mozgu, reproduktivni organi matica i trutova (Chen i sar., 2005,2006; Fievet i sar., 2006), kao i seme trutova (Fievet i sar., 2006). Ova otkrića nesumnjivo ukazuju na postojanje i horizontalnog (fekalno-oralnog) i vertikalnog (sa roditelja na potomstvo) prenošenja virusa među pčelama (Chen i sar., 2005; Yue i Genersch, 2005; Fievet i sar., 2006; Möckel i sar., 2011). Horizontalno širenje DWV-a se najčešće odvija putem hrane i fecesa, kao i preko inficiranih lutki koje pčele radilice ubijaju i izbacuju iz ćelija saća (Möckel i sar., 2011). Vertikalno prenošenje virusnih čestica se može posmatrati dvojako: direktno – oplođenjem jaja kontaminiranim semenom trutova, i indirektno – najpre veneralnou infekcijom reproduktivnih organa matica, a zatim i posledičnom vertikalnom transmisijom virusa sa inficiranih jaja na potomstvo. U prvom slučaju su samo radilička jaja inficirana, dok se u drugom slučaju virus može naći i kod radiličkog i kod trutovskog legla. Najznačajniji način prenošenja ovog virusa je preko pčelinjeg krpelja *V. destructor* koji ima ulogu i mehaničkog i biološkog vektora u pčelinjoj zajednici (Gisder i sar., 2009; Genersch i Aubert, 2010; deMiranda i Genersch, 2010; Martin i sar., 2013). Naime, novija istraživanja pokazuju da je replikacija virusa i dostizanje dovoljno visokog infektivnog titra virusa u pčelinjem krpelju neposredno pre inficiranja lutki pčela, neophodan preduslov za pojavu klinički manifestnih simptoma kod novoizleženih pčela (Yue i Genersch, 2005; Gisder i sar., 2009).

Posledice infekcije pčela izazvane sa DWV u mnogome zavise od prisustva *V. destructor* kao bitnog činioca u ispoljavanju simptoma. U odsustvu pčelinjeg krpelja, DWV uzrokuje asimptomatske infekcije, odnosno, inficirane pčele ne pokazuju nikakve vidljive simptome (Yue i sar., 2007; deMiranda i Genersch, 2010; Möckel i sar., 2011; Martin i sar., 2013). Sa porastom broja infestiranih društava pčelinjim krpeljom *V. destructor* u populaciji evropske medonosne pčele, klinički manifestni oblici ove virusne infekcije postaju sve izrađeniji (Ball, 1989; 1993). Kod novoizleženih inficiranih pčela mogu se zapaziti promene na krilima koje se manifestuju skraćenim i deformisanim krilima (Slika 1), praćene drugim defektima (skraćen i proširen abdomen), a u nekim slučajevima javlja se i promena boje tela (Ball i Allen 1988; Yue i Genersch 2005; Yang i Cox- Foster, 2007).



Slika 1. Skraćena i deformisana krila kod pčela inficiranih sa DWV (Genersch, 2010)

Pčele sa deformisanim krilima imaju značajno skraćen životni vek i uginu za manje od 67 sati od izvođenja (Yang i Cox- Foster, 2007). Iako do sada nije poznat tačan način na koji ovaj virus i *V. destructor* mogu da izazovu kolaps pčelinje zajednice, razmatra se mogućnost udruženog dejstva pčelinjeg krpelja (kao mehaničkog i biološkog vektora) i virusa u supresiji imunog odgovora

pčela i posledičnog gubitka čitavog pčelinjeg društva (Genersh i Aubert, 2010; Martin i sar., 2013).

Na osnovu četvorogodišnjeg istraživanja koje je sprovedeno u Nemačkoj, prisustvo virusa deformisanih krila u ispitivanim društvima se u visokom procentu moglo povezati sa zimskim gubicima pomenutih društava (Genersch i sar., 2010).

2.2.3. Virus mešinastog legla (SBV)

Virus mešinastog legla (SBV) je uzročnik bolesti mešinastog legla, verovatno jedne od najčešćih virusnih bolesti pčela koja je prisutna u gotovo svim delovima sveta (Dall, 1985; Grabensteiner i sar., 2001; Shen i sar., 2005; Antúnez i sar., 2006; Freiberg i sar., 2012; Mingxiao i sar., 2013). Ovu bolest je opisao White još davne 1913. godine. Uzročnik je prvi put izolovan i identifikovan 1964. godine od strane Bailey i sar. (1964). Virus mešinastog legla inficira pčelinje leglo dovodeći do uginuća larvi. Infekcija pčelinjih društava ovim virusom se najčešće javlja u proleće. Pretpostavlja se da je ovaj period godine najpogodniji za pojavu infekcije jer je pčelinje leglo, koje se tada najbrže razvija, najprijemčivije za delovanje različitih patogena.

Virus mešinastog legla je okruglog oblika, prečnika oko 28 nm i nema spoljašnji omotač poreklom od membrane ćelija- peplos. Genom virusa podseća na viruse iz roda *Rhinovirus*, a monocistranska organizacija genoma, sa strukturnim genom na 5' kraju i nestrukturnim na 3' kraju, ga svrstava u familiju Iflaviridae, rod *Iflavirus*. SBV je prvi virus čija je kompletna nukleotidna sekvenca utvrđena (Ghosh i sar., 1999). Virusna RNK broji 8832 nukleotida organizovanih u jedinstveni, veliki "okvir čitanja" koji kodira sintezu poliproteina sačinjenog od 2852 aminokiseline (Grabensteiner i sar., 2001).

U dosadašnjim istraživanjima je potvrđeno horizontalno i vertikalno širenje SBV u pčelinjem društvu. Horizontalnu transmisiju virusa prvi je ustanovio Bailey (1969) kada je identifikovao prisustvo virusa u glavama pčela, tačnije u hipofaringealnim žlezdama radilica i na osnovu toga zaključio da se širi na leglo putem hrane. Novija istraživanja ne samo da potvrđuju horizontalnu transmisiju nalazom virusne RNK u hipofaringealnim žlezdama, medu, polenu, matičnom mleču, već dokazuju i postojanje vertikalnog transovarijalnog prenošenja, kao i vektorske uloge pčelinjeg krpelja *V. destructor* u širenju infekcije primarno na leglo, ali i na odrasle pčele (Shen i sar., 2005; Chen, 2005; Yue i sar., 2006).

Klinička slika infekcije zavisi od količine virusnih partikula unetih u organizam pčela, imunog statusa društva, doba godine i prisustva ektoparazita *V. destructor*. Manifestacije patogenog dejstva SBV se primarno ogledaju u promenama na pčelinjem leglu i to, pre svega, na larvama kod kojih dolazi do uginuća. Naime, virusne čestice se nalaze ispod integumenta larvica dovodeći do nakupljanja ekdisijalne tečnosti i sprečavanja metamorfoze larve u lutke. Nakupljanje tečnosti ima za posledicu pojavu vrećastog, odnosno mešinastog izgleda larvi, po čemu je bolest i dobila ime (Slika 2).



Slika 2. Mešinast izgled larvi inficiranih sa SBV (Food and Environment Research Agency, Australia)

Inficirane larvice menjaju boju od biserno bele do blede žute i ubrzo nakon uginuća dolazi do njihovog isušivanja i transformacije u tamno braon tvorevinu koja svojim oblikom podseća na gondolu (Bailey, 1969). SBV je otkriven i u odraslim pčelama, međutim prepoznatljivi klinički simptomi infekcije u ovom slučaju nedostaju (Bailey, 1969; Anderson i Gibbs, 1988). Rezultati pojedinih istraživanja ukazuju na skraćenje životnog veka inficiranih odraslih pčela (Bailey, 1969; Bailey i Fernando, 1972).

Postavljanje dijagnoze na osnovu kliničkog pregleda pčelinjeg društva je prilično teško zbog postojanja drugih patoloških stanja koja diferencijalno dijagnostički mogu navesti na pogrešne zaključke. Elektronska mikroskopija je široko primenjivan metod u identifikaciji brojnih uzročnika virusnih oboljenja pčela. Serološke metode na bazi ELISA testa ili Western-blot analize su korišćene u svrhu identifikacije virusa mešinastog legla u predlutkama (Rana i sar., 2011). Međutim, najpouzdaniji rezultati se postižu primenom savremenih molekularnih metoda kao što su RT-PCR i real-time PCR.

2.2.4. Virus akutne paralize pčela (ABPV)

Virus akutne paralize pčela (ABPV) je otkriven i prvi put opisan kao sporedni nalaz tokom laboratorijskog ispitivanja prisustva virusa hronične paralize pčela u uzorcima poreklom iz pčelinjeg društva koje je pokazivalo znake hronične paralize (Bailey, 1963). Sve do pojave globalne raširenosti pčelinjeg krpelja nije se mogla uspostaviti čvrsta veza između prisustva ABPV u pčelama i pojave oboljenja, odnosno, uginuća pčelinjih društava u prirodi, iako je ovaj virus bio široko rasprostranjen, mahom u formi latentnih i inaparentnih infekcija (Allen i Ball, 1996; Hung i sar., 1996; Ellis i Munn, 2005). Bailey i sar. (1963) su na osnovu svojih istraživanja zapazili da su „pčele inficirane virusom akutne paralize uobičajena pojava“ i da „nisu našli društvo bez inficiranih pčela“. Na osnovu toga je izveden zaključak da je geografska rasprostranjenost

ovog virusa jednaka rasprostranjenosti medonosne pčele (Allen i Ball, 1996; Ellis i Munn, 2005). Pored *A. mellifera* kao pravog domaćina, virus se još može naći i kod nekoliko vrsta bumbara (Bailey i Gibbs, 1964; Allen i Ball, 1996; Ribière i sar., 2008).

Virus akutne paralize pčela je pripadnik familije Dicistroviridae, rod Apavirus, čija se organizacija genoma (veličina približno 9500 nukleotida) karakteriše pojavom dva ORF koje razdvaja intergenski region. Na 5' kraju je lociran veći ORF koji kodira sintezu nestrukturnih proteina uključenih u procese replikacije virusa. Kraći ORF se nalazi pri 3' kraju i kodira sintezu strukturalnih proteina kapsida (Govan i sar., 2000; de Miranda i sar., 2004; Maori i sar., 2007). Kao i većina virusa pripadnika familije Dicistroviridae, ABPV je najčešće prisutan u niskom infektivnom titru u pčelinjim društvima kao izazivač latentnih infekcija, odnosno društva inficirana ovim virusom ne pokazuju nikakve vidljive simptome na individualnom nivou i nivou pčelinje zajednice (Anderson i Gibbs, 1988; Gauthier i sar., 2007; de Miranda i sar., 2010). Međutim, ovaj virus ispoljava izuzetnu virulentnost kod veštački inficiranih lutaka i/ili adultnih pčela (Bailey i sar., 1963; Dall, 1985; Ribiere i sar., 2008). Putevi prenošenja ABPV mogu biti različiti. Nalaz nakupina virusnih čestica u hipofaringealnim žlezdama (Bailey i Milne, 1969) i fecesu (Ribiere i sar., 2008) adultnih pčela, ukazuje na dominantnu infekciju oralnim putem - preko adulta, larvi, kanibalizovanog legla i kontaminirane hrane (Chen i sar., 2006; Chen i Siede, 2007). Dokaz vertikalnog širenja ovog virusa u pčelinjem društvu su otkrivene virusne čestice u semenu trutova (Yue i sar., 2006), ali ne i u ovarijumima matice. Nasuprot širokoj rasprostranjenosti ABPV kao izazivača latentnih infekcija pčelinje zajednice, sa brzim širenjem pčelinjeg krpelja u pčelinjim društvima, raste i infektivni titar virusa u inficiranim društvima, a uz to i pojava ozbiljnih kliničkih manifestacija sa često letalnim ishodom (Slika 3).



Slika 3. Ekstenzija ekstremiteta kod pčela uginulih od posledica infekcije sa ABPV
(Copyright Paul Goettlich)

Ovaj virus je imao značajnu ulogu u pojavi gubitaka pčelinjih društava infestiranih sa *V. destructor*, pre svega u Evropi 80-tih i 90-tih godina prošlog veka (Ball, 1985; Allen i sar., 1986; Ball i Allen, 1988; Bailey i Ball, 1991; Faucon i sar., 1992; Bekesi i sar., 1999; Berenyi i sar., 2006). Uzimajući u obzir izuzetnu virulentnost ovog virusa nakon ubrizgavanja u hemolimfu pčela, ne iznenađuje da je pojava kliničkih manifestacija bolesti u pčelinjim zajednicama intenzivnija prilikom povećanja broja pčelinjeg krpelja, čija je primarna hrana upravo hemolimfa. Literaturni podaci o replikaciji ovog virusa u *V. destructor* do sada nisu poznati, samim tim ni o ulozi pčelinjeg krpelja kao biološkog vektora (Genersch, 2010). Udruženo delovanje ABPV i *V. destructor* dovodi do vidljivih promena na nivou pčelinje zajednice koje se ogledaju u značajnom smanjenju populacije pčela (Ball i Allen, 1988; Todd i sar., 2007; Ribiere i sar., 2008). Ova pojava za posledicu ima povećanje zastupljenosti obolelih i uginulih larvi zbog nedovoljnog broja odraslih pčela koje neguju leglo i vrše higijenske poslove u košnici (pravovremeno uklanjanje obolelih i uginulih larvi iz ćelija).

Postavljanje sumnje na prisustvo ABPV u pčelinjim društvima, isključivo na osnovu kliničkog pregleda, je prilično nepouzđano. Razlog treba tražiti u postojanju različitih patoloških stanja koja mogu ukazivati i na druga oboljenja. Laboratorijska potvrda prisustva ovog virusa u pčelinjim društvima je u prvo vreme bila zasnovana na upotrebi tehnike elektronske mikroskopije. U cilju dijagnostike ovog oboljenja pčela, u laboratorijama se koriste imunodifuzija u gelu (Anderson, 1984) i imunoenzimski test (ELISA) (Anderson, 1984; Allen i sar., 1986; de Miranda, 2008). Međutim, razvoj molekularnih tehnologija i dostupnost RT-PCR-a je umnogome unapredilo proces potvrde prisustva ovog virusa u pčelama. Veliki broj autora u svojim ispitivanjima vezanim za prisustvo ABPV u pčelinjim društvima akcentat stavlja na RT-PCR ili real-time PCR tehnologiju (Tentcheva i sar., 2004; Chen i sar., 2005, 2006; Yue i sar., 2006; Antunez i sar., 2006; Evans, 2006; Baker i Schroeder, 2008; Jamnikar Jamnikar Ciglencečki i Toplak, 2012).

2.2.5. Virus hronične paralize pčela (CBPV)

Aristotel je, pre više od 2000 godina, opisao pojavu crnih pčela bez dlaka koje je nazvao „kradljivci“ i time verovatno ostavio prve pisane tragove o hroničnoj paralizi pčela. Virusna etiologija uzročnika ovog oboljenja je ustanovljena 1945. godine (Burnside, 1945) u SAD, kada su ogleđne pčele veštački inficirane ekstraktom paralizovanih pčela. Izolacija i identifikacija CBPV izvršena je od strane Bailey i sar. (1963). Kao i većina drugih, i ovaj pčelinji virus može postojati u pčelinjim zajednicama indukujući inaparentne infekcije, međutim, pri visokom infektivnom titru (Blanchard i sar., 2008) može dovesti do značajnih gubitaka (Allen i Ball, 1996). Mnogobrojna istraživanja pokazuju široku zastupljenost CBPV na evropskom kontinentu (Bailey, 1965,1967; Bereniy i sar., 2006; Nielsen i sar., 2008; Gajger i sar., 2014; Simeunović i sar., 2014a).

Budući da je CBPV prvi izolovani i identifikovani virus pčela (Bailey, 1963), jedan je od poslednjih čiji je genom u potpunosti ispitan. Sa genetskog stanovišta, ovo je jedan od najkompleksnijih virusa jer, iako deli osnovne biološke karakteristike većine drugih RNK virusa (jednolančana pozitivno orijentisana RNK), njega, zbog prisutnih razlika u organizaciji genoma, ne možemo svrstati ni u jednu od dve velike familije u okviru reda Picornavirales. Ovaj virus je sličan virusima iz familija Nodaviridae i Tombusviridae, međutim nedovoljno da se svrsta u neku od familija. Do danas su poznate dve varijante genoma ovog virusa različite veličine, RNK1 sa 3674 baznih parova i RNK2 sa 2305 baznih parova (Olivier i sar., 2008). Savremene dijagnostičke metode omogućavaju ispitivanje prisustva CBPV u društvima koja ne pokazuju nikakve kliničke simptome oboljenja. Rezultati tih ispitivanja pokazuju da ovaj virus može postojati u pčelinjim društvima, izazivajući inaparentne infekcije (Ribière i sar., 2002; Tentcheva i sar., 2004). U prilog tome govori i istraživanje Gauthier i sar. (2007) kojima je dokazano prisustvo virusa u društvima koja nisu pokazivala nikakve kliničke simptome bolesti. U prirodnim uslovima do infekcije ovim virusom može doći na različite načine. Infekcija *per os*, kao posledica prisustva virusa u hrani i sekretima žlezda, jedan je od čestih, mada ne toliko efikasnih načina širenja ovog virusa u populaciji pčela. To potvrđuje nalaz virusnih čestica u fecesu pčela (Bailey, 1965; Ribière i sar., 2007) koji kontaminira hranu i omogućava širenje infekcije. Jedan od najefikasnijih načina prenošenja CBPV je intenzivan, učestali, neposredni međusobni kontakt zaraženih i nezaraženih pčela do koga najčešće dolazi usled nepovoljnih vremenskih prilika, nedostatka hrane i sl. (Ball i Bailey, 1997). U prilog tome govore i rezultati oglada veštačke infekcije izvedene aplikovanjem infektivnog sadržaja na površinu kutikule pčela kojima su uklonjene dlačice, odnosno ogladi u kojima su zdrave i inficirane pčele držane u kavezima provocirajući česte kontakte (Bailey, 1983). Vertikalna transmisija preko matica, takođe, predstavlja značajan put širenja ovog patogena (Kulincevic i Rothenbuhler, 1989). Otkrivanje prisustva CBPV uz pomoć savremenih molekularnih metoda

u maticama (Chen, 2005,2006), kao i u svim stupnjevima razvoja legla (Chen i sar., 2006) potvrđuje pretpostavku vertikalnog širenja virusa u pčelinjoj zajednici. Hronična paraliza pčela se smatra jednom od retkih virusnih bolesti pčela sa jasno definisanim simptomima (Bailey i Ball, 1991; Ball i Bailey, 1997). Do vidljivih, klinički manifestnih znakova bolesti dolazi usled delovanja stresnih faktora različitog porekla koji značajno utiču na ubrzanu replikaciju virusa. Kulinčević i sar. (1973) su приметili da do vidljivih znakova paralize, kod društava koja nisu pokazivala nikakve simptome, brže dolazi ako se matica odvoji od svojih pčela. Pored stresogena ovog tipa, do transformacije latentnih u manifestne infekcije može doći i usled problema sa hranom, greškama u tehnologiji pčelarenja, klimatskim promenama i sl.

Kod infekcije pčela virusom hronične paralize dolazi do pojave dve grupe kliničkih simptoma (Ball i Bailey, 1997; Morimoto, 2012). Prva grupa simptoma kod pčela je prvi put opisana u Velikoj Britaniji, kada je primećena pojava abnormalnih pokreta pčela, nalik drhtanju. Ovakve pčele se skupljaju u grupice ispred košnica ili na satonošama, podrhtavaju, puze i ne mogu da polete. Pored drhtanja krila i tela, kod obolelih pčela se mogu приметiti i znaci proširenja abdomena, sa povremenim izlivima sadržaja digestivnog trakta koji je od nekih autora bio okarakterisan kao dijareja (Ribière i sar., 2010).



Slika 4. Masne, sjajne i tamne pčele obolele od hronične paralize (Aubert i sar., 2008)

Druga grupa kliničkih simptoma je kroz vreme dobijala različite nazive: „crni kradljivci“ i „male crne pčele“ u Britaniji, odnosno „sindrom crnih pčela bez dlake“ u SAD (Rinderer i Rothenbuhler, 1976). Obolele pčele u početku imaju sposobnost letenja, ali gube gotovo sve dlake postajući sjajne, masne i tamne do gotovo crne (Slika 4), zatim dolazi do proširenja abdomena i na posletku, gube sposobnost letenja i ubrzo uginu. Ball i Bailey (1997) su dokazali da se obe grupe kliničkih simptoma mogu naći u istom pčelinjem društvu. Na osnovu dosadašnjih istraživanja, primenom savremenih dijagnostičkih metoda, nije nađena RNK virusa hronične paralize pčela u pčelinjem krpelju *V. destructor* (Chantawannakul i sar., 2006; Gauthier i sar., 2007), što ukazuje da isti nije vektor ovog virusa, odnosno ne učestvuje u širenju virusa u populaciji pčela.

Klinički simptomi hronične paralize se, za razliku od drugih virusnih oboljenja pčela, mogu ustanoviti kliničkim pregledom obolelih pčelinjih društava. Međutim, problem predstavljaju česte inaparentne infekcije koje imaju tendenciju transformacije u manifestne, dovodeći do propadanja društava. Primenom RT-PCR i real-time PCR tehnologije u mnogome je olakšano utvrđivanje prisustva CBPV u društvima sa inaparentnim infekcijama (Ribiere i sar., 2002; Tentcheva i sar., 2004; Chen, 2005,2006; Gauthier i sar., 2007; Celle i sar., 2008; Blanchard i sar., 2012; Marimoto i sar., 2012), što pruža mogućnost pravovremene intervencije kod inficiranih društava.

2.2.6. Izraelski virus akutne paralize pčela (IAPV)

Značajni gubici pčelinjih zajednica u Izraelu su naveli istraživače da ispituju moguće uzroke i spreče dalje gubitke. Obolele pčele su pokazivale simptome nalik onima koje ispoljavaju pčele inficirane sa ABPV. Novootkriveni virus za kojeg je utvrđeno da je izazvao promene kod pčela u Izraelu, nazvan je izraelski virus akutne paralize pčela (Maori i sar., 2007). Na onovu filogenetske

pozicije, IAPV je ranije smatran varijantom kašmirskog pčelinjeg virusa. Za sada jedini poznati domaćin ovog virusa jeste *A. mellifera* (Maori i sar., 2007; Chen i Evans, 2007; Palacios i sar., 2008). Kao i drugi pomenuti virusi, i IAPV se može naći u niskom infektivnom titru u društvima koja ne pokazuju nikakve kliničke promene (Chen i Evans, 2007; Palacios i sar., 2008), dok sa porastom infektivnog titra dolazi do značajnog povećanja virulencije ovog virusa kako kod prirodno inficiranih pčela, tako i kod veštački inficiranih jedinki. U SAD-u je ovaj virus bio predložen kao marker kolapsa pčelinjih društava (Cox-Foster i sar., 2007), međutim ta tvrdnja je kasnije diskreditovana od strane vanEngelsdorp i sar. (2009).

Izraelski virus akutne paralize pčela, kao deo kompleksa "virusa paralize" (virus akutne paralize – izraelski virus akutne paralize – kašmirski pčelinji virus) ima sve biološke karakteristike virusa iz familije Dicistroviridae. Organizacija genoma, koja uključuje postojanje dva ORF i jedan intergenski region, je već detaljno opisana u delu koji se tiče virusa akutne paralize pčela. Rezultati istraživanja Palacios i sar. (2008) i Chen i sar. (2008a) ukazuju na postojanje tri različite grupe sekvenci u okviru genoma IAPV: prva grupa obuhvata sekvence dobijene analizom uzoraka pčela sa zapadne obale SAD-a, kao i iz paketnih rojeva poreklom iz Australije; druga grupa uključuje sekvence poreklom od analiziranih pčela u Izraelu; treću grupu čine sekvence dobijene iz pozitivnih uzoraka pčela iz istočnog dela SAD-a i Kanade. Podaci o putevima prenošenja ovog virusa u populaciji pčela su slabo dostupni zbog činjenice da su: karakteristike izraelskog virusa akutne paralize pčela, kao novo otkrivenog virusa, predstavljene tek 2007. godine (Maori i sar., 2007), kao i da postoji sumnja da se u rezultatima ranijih istraživanja (Dall, 1985, 1987; Anderson i Gibbs, 1988; Anderson i East, 2008), tada nepoznati virus, klasifikovao kao soj kašmirskog pčelinjeg virusa usled teškog razlikovanja genoma ova dva virusa primenom konvencionalne RT-PCR tehnologije (de Miranda i sar., 2010). Načini transmisije ovog virusa u populaciji pčela se mogu pretpostaviti na osnovu ekstrapolacije rezultata dobijenih ispitivanjem srodnih virusa akutne paralize i

kašmirskog pčelinjeg virusa. Međutim, obzirom da ne postoji dovoljno podataka, može se pretpostaviti da se virus u populaciji pčela može prenositi direktnim kontaktom putem hrane (Maori i sar., 2009), kao i putem pčelinjeg krpelja *V. destructor* (di Prisco i sar., 2011). Klinički znaci infekcije na pojedinačnim pčelama teško mogu dati sliku masovne paralize na nivou društva (Maori i sar., 2007) jer je vreme od pojave paralize do uginuća (usled visoke virulencije) prilično kratko, te nije moguće primetiti dovoljan broj živih paralizovanih jedinki. Najkarakterističniji znak (ali ne i patognomoničan) infekcije ovim virusom je značajna depopulacija pčelinjeg društva, gde u košnici ostaje matica i mali broj pčela radilica (Underwood i vanEngelsdorp, 2007; Cox-Foster i sar., 2007; vanEngelsdorp i sar., 2008).

Dijagnoza bolesti izazvane sa IAPV je prilično teška zbog specifičnosti pčelinjeg društva kao socijalnog organizma u odgovoru na endogene i egzogene štetne nokse. Zbog sličnih kliničkih simptoma koji se javljaju kao posledica infekcije pčela drugim virusima i *Nosema* infekcije, klinički pregled pčelinjeg društva nije dovoljan za postavljanje precizne dijagnoze bolesti. Danas se u svetu, u cilju laboratorijske dijagnostike ove virusne infekcije, pokušava sa razvojem različitih imunoloških testova. Monoklonska antitela za virus akutne paralize, izraelski virus akutne paralize i kašmirski pčelinji virus još uvek nisu stvorena. Postoje istraživanja vezana za primenu poliklonskih antitela (Maori i sar., 2007), međutim specifičnost ovakvih testova još uvek nije potpuno poznata. Upotreba RT-PCR tehnologije je dala rezultate u otkrivanju prisustva naslednog materijala IAPV, međutim zbog genetske bliskosti sa kašmirskim pčelinjim virusom, pouzdanost ove metode pada ispod 100%. Primenom real-time RT-PCR tehnologije prevaziđen je problem diferencijacije genoma izraelskog virusa akutne paralize od kašmirskog pčelinjeg virusa, pri čemu su uspešno detektovane razlike u sekvencama različitih sojeva IAPV-a (de Miranda i sar., 2010; Palacios i sar., 2011).

2.2.7. Kašmirski pčelinji virus (KBV)

Kašmirski pčelinji virus (KBV) je otkriven 1974. godine, kao kontaminant ekstrakta *Apis cerana* poreklom iz Indije pripremljenog za ispitivanje na prisutvo iridescentnog virusa pčela (Baley i Woods, 1977). Virus je nazvan po regiji iz koje su dobijeni uzorci pčela u kojima je ovaj virus izolovan (Kašmir, Indija). Daljim istraživanjima je potvrđeno prisustvo ovog virusa i u *A. mellifera* širom sveta (Hung i sar., 2000; Calderon i sar., 2003; Tentcheva i sar., 2004; Chen i sar., 2005; Berenyi i sar., 2006; Choe i sar., 2012), kao i u bumbarima i evropskim osama (Anderson, 1991). Do danas je utvrđeno da ovaj virus ima značajno veću prevalenciju u Severnoj Americi i Novom Zelandu (Hung i sar., 2000; Todd i sar., 2007) nego u Evropi (Tentcheva i sar., 2004; Siede i sar., 2005; Berenyi i sar., 2006). Prisustvo RNK KBV je, slično drugim pčelinjim virusima, otkriveno u niskom infektivnom titru u pčelinjim društvima koja nisu pokazivala nikakve kliničke simptome oboljenja (Chen i Evans, 2007; Palacios i sar., 2008).

Kašmirski pčelinji virus je, na osnovu karakteristika genoma, veoma sličan ABPV, odnosno stepen podudarnosti nukleotidnih sekvenci navedenih virusa iznosi 70% (de Miranda i sar., 2004). Visok stepen podudarnosti sekvenci je primećen i u poređenju sa IAPV, koji je jedno vreme pogrešno klasifikovan kao soj KBV. KBV pripada rodu *Apavirus*, familija Dicistroviridae, odnosno poseduje dicistronsku jednolančanu RNK sa dva "okvira čitanja" koje razdvaja intergenski region. Putevi prenošenja ovog virusa mogu biti različiti. Prisustvo RNK ovog virusa je otkriveno u fecesu pčela (Hung i sar., 2000; Ribiere i sar., 2008), hrani, larvama i adultima (Shen i sar., 2005; Chen i sar., 2006; Chen i Siede, 2007), što implicira postojanje različitih vidova horizontalnog prenošenja. Anderson i Gibbs (1989) su u svojim eksperimentima dokazali da su se larve koje su hranjene razblaženim rastvorom koji je sadržao KBV, ipak transformisale u lutke. S druge strane, ispitivanja Bailey i Woods-a (1977) su za

rezultat imala smrt veštački inficiranih pčela, već za 6 sati od početka izvođenja oglada. Ovde treba naglasiti da je eksperimentalnim pčelama virus bio aplikovan parenteralno ili *per os*. Vertikalno prenošenje ovog virusa je potvrđeno u oglecima u kojima su ispitivane matice u čijim je jajima pronađen nasledni materijal kašmirskog pčelinjeg virusa (Shen i sar., 2005; Chen i sar., 2006), ali ne i u jajnicima (Chen i sar., 2006). RNK ovog virusa je detektovana u pljuvački pčelinjeg krpelja (Shen i sar., 2005) što ukazuje na mogućnost prenošenja virusa sa krpelja na odrasle pčele, leglo, ali i horizontalno u populaciji pčela (Chen i sar., 2006). Imajući u vidu značajno povećanje virulentnosti kašmirskog pčelinjeg virusa kada se ubrizga direktno u hemolimfu, ne iznenađuje pojava patogenih efekata i gubitaka inficiranih društava pri povećanju broja pčelinjeg krpelja *V. destructor*, kao vektora virusa u pčelinjim zajednicama (eng. "varoa-associated colony losses") (Ribiere i sar., 2008). Postoji i drugačije tumačenje uloge pčelinjeg krpelja u nastanku patogenih efekata kod društava inficiranih ovim virusom. Naime, Shen i sar. (2005) smatraju da prisustvo značajne koncentracije virusa, u vidu visokog infektivnog titra u lutki na kojoj parazitira *V. destructor*, može biti rezultat ili replikacije virusa ili supresije imunog sistema pčele (Yang i Cox-Foster, 2005) koja može dovesti do nesmetane replikacije virusa.

Kašmiski pčelinji virus kod pčela uglavnom izaziva latentne infekcije koje, usled delovanja nepovoljnih uslova sredine, mogu izazvati pojavu vidljivih kliničkih simptoma bolesti, što u krajnjem dovodi do propadanja pčelinjih društava. U istraživanju koje je obuhvatilo 127 pčelinjaka sa teritorije Nemačke i tri pčelinjaka iz Luksemburga, jedini zabeleženi simptomi kod virusom inficiranih društava bili su vezani za zimske gubitke, mali broj prolećnih pčela i razvoj prolećnih pčela sa različitim anomalijama (Siede i sar., 2005). Ovi simptomi mogu biti posledica i mešovite virusne infekcije (Tentcheva i sar., 2004). Prema ranijim rezultatima Bailey i sar. (1979), KBV je imao najveći stepen virulencije od svih do tada poznatih virusa pčela. Naime, ogledi veštačke infekcije pčela su pokazali da je virus izazivao uginuće odraslih oblika

pčela i lutki već za tri dana od aplikacije. Postavljanje dijagnoze bolesti pčela izazvane ovim virusom nije moguće samo na osnovu kliničkog pregleda pčelinjih društava. Klinički simptomi koji se ispoljavaju kod ove virusne infekcije pčela nisu specifični. U laboratorijskim uslovima u cilju postavljanja precizne dijagnoze koriste se različiti imunološki testovi (Stoltz i sar., 1995; Allen i Ball, 1995). RT-PCR zajedno sa metodom sekvenciranja omogućava ne samo otkrivanje virusnog genoma u uzorcima pčela, već i ispitivanje karakteristika virusne nukleinske kiseline (Hung i sar., 2000; Calderon i sar., 2003; Tentcheva i sar., 2004; Chen i sar., 2005; Berenyi i sar., 2006; Choe i sar., 2012). Real-time RT-PCR tehnika pruža mogućnosti rane detekcije i kvantifikacije virusa (Ward i sar., 2007) budući da pokazuje veću osetljivost od end-point PCR-a i od RT-PCR-a.

2.2.8. Virus crnih matičnjaka (BQCV)

Virus crnih matičnjaka (BQCV) je prvi put izolovan iz mrtvih larvi i predlutki matica koje su uginule u svojim ćelijama. Virus je nazvan po crnim flekama na zidovima matičnjaka u kojima su larve i predlutke uginule (Bailey i Woods, 1977). Ovaj virus prvenstveno izaziva infekcije kod larvi i lutki matica, međutim, može se javiti i kod lutki radilica, kao i kod odraslih pčela (Chen i sar., 2004; Berenyi i sar., 2006). Zanimljiva je i pojava podudarnosti kliničke slike u ranim fazama ove bolesti sa kliničkim znacima društava obolelih od mešinastog legla - pojava svetlo-žutih uvećanih larvica koje „podsećaju na mešinu“ (Bailey i Ball, 1997). Infekcija mikrosporidijom *N. apis* se smatrala mogućim uzrokom pojave mortaliteta kod društava obolelih od bolesti crnih matičnjaka (Bailey i Woods, 1974; Bailey i sar., 1983; Allen i Ball, 1996). Prisustvo BQCV je utvrđeno u zemljama Evrope, Azije, Amerike, Afrike i Australije (Benjeddou i sar., 2002; Davison i sar., 2003; Siede i Buchler, 2003; Tentcheva i sar., 2004; Chen i sar., 2004; Berenyi i sar., 2006; Chantawannakul i sar., 2006; Antunez i sar., 2006; Choe i sar., 2012).

Virus crnih matičnjaka poseduje jednolančani molekul pozitivno orijentisanog, dicistranskog molekula RNK i pripada porodici Dicistroviridae. Za razliku od drugih pomenutih virusa iz ove porodice koji spadaju u rod *Apavirus*, na osnovu trenutno važeće nomenklature, BQCV je svrstan u poseban rod *Cripavirus* (King i sar., 2012). Veličina virusnih čestica ne prelazi 30 nm, a veličina genoma iznosi približno 8550 nukleotida (Benjeddou i sar., 2002). Na 5' kraju nukleinske kiseline virusa se nalazi ORF koji kodira sintezu replikacionih proteina, dok ORF na 3' kraju kodira sintezu poliproteina kapsida (Leat i sar., 2000). Horizontalno prenošenje virusa fekalno-oralnim putem podrazumeva ingestiju hrane kontaminirane patogenom i eliminaciju virusa iz crevnog trakta fecesom. U uslovima kada je populacija pčela velika, međusobni kontakti jedinki intenzivniji, a učestalost razmene hrane među pčelama povećana, hrana predstavlja značajan način širenja BQCV. U prilog ovome govore i rezultati istraživanja Chen i sar. (2006) u kojima se polen, med i feces inficiranih matice navode kao rezervoari ovog virusa. Horizontalna transmisija ovog virusa podrazumeva i veneralno prenošenje, odnosno prenošenje virusa među polovima tokom parenja. Osim toga, u istraživanju Chen i sar. (2004) detektovana je virusna RNK u semenu trutova, ali i u spermateci matice (Chen i sar., 2006). Nasledni materijal ovog virusa je utvrđen i u *V. destructor* primenom real-time PCR tehnologije (Chantawannakul i sar., 2006). Davison i sar. (2003) ukazuju na postojanje pozitivne korelacije između infestacije pčelinjeg društva ovim ektoparazitom i povećanog mortaliteta larvi inficiranih sa BQCV. U prilog tome govori i činjenica da se virus nakon ubrizgavanja u lutke umnožava, tako da je moguće da pčelinji krpelj, hraneći se hemolimfom, prenese na leglo virus dobijen od odraslih pčela. Dokazi za vertikalni način prenošenja dobijeni su otkrivanjem prisustva virusne RNK u ovarijumima matice i jajima (Chen i sar., 2005,2006). Istraživanja Anderson i Gibbs (1988), kao i Gauthier i sar. (2007) pokazuju prisustvo ovog virusa u asimptomatskim pčelinjim društvima. U istraživanjima Bailey i sar. (1983) postavlja se hipoteza povezanosti infekcije sa BQCV i infekcije sa *N. apis* u ispoljavanju kliničke slike karakteristične za bolest

crnih matičnjaka. Objašnjenje za ispoljavanje patogenog efekta prevashodno na larvama i lutkama matica leži u činjenici da larve matica dobijaju, od strane inficiranih radilica, mnogo više obroka nego što je to slučaj sa radiličkim leglom (Allen i Ball, 1996).

Zbog pojave prevashodno latentnih infekcija pčelinjih društava, postavljanje dijagnoze bolesti izazvane sa BQCV može biti problematično. Kod društava koja ne pokazuju prepoznatljive znakove infekcije (crno prebojavanje matičnjaka), laboratorijska dijagnostika bolesti crnih matičnjaka se postiže upotrebom osetljivih dijagnostičkih procedura, kao što je konvencionalni endpoint RT-PCR (Leat i sar., 2000; Benjeddou i sar., 2002; Davison i sar., 2003; Siede i Buchler, 2003; Chen i sar., 2004; Berenyi i sar., 2006; Choe i sar., 2012; Guzman-Novoa i sar., 2013) i real-time RT-PCR (Chantawannakul i sar., 2006; Gauthier i sar., 2007; Kukielka i sar., 2008; Locke i sar., 2014).

2.3. UDRUŽENO DELOVANJE MIKROSPORIDIJA I VIRUSA

Uzimajući u obzir pomenuti destruktivni potencijal mikrosporidijalnih infekcija, povezanost mikrosporidije *N. ceranae* sa gubitkom pčelinjih društava (Higes i sar., 2006; 2008; 2010; Bacandritsos i sar., 2010; Hatjina i sar., 2011; Soroker i sar., 2011) i zastupljenost većeg broja virusa u pčelinjim društvima (Allen i Ball, 1996; Hung, 2000; Bakonyi i sar., 2002; Ribiere i sar., 2002; Chen i sar., 2005; Chantawannakul i sar., 2006; Gauthier i sar., 2007; Simeunović i sar., 2014a), nameće se potreba za proučavanjem posledica udruženog delovanja ovih patogena na pčelinje društvo. Istraživanja su pokazala da patogeni efekti po pčelinje zajednice koje ispoljava *N. ceranae* mogu biti izraženiji prilikom interakcije sa nekim virusima. Tako Bromenshenk i sar. (2010) u ispitivanju povezanosti iridovirusa i mikrosporidija u izazivanju kolapsa društava, navode da ova mešovita infekcija može značajno da utiče na pojavu gubitka društava. Istraživanje izvršeno na medonosnim pčelama u Grčkoj (Bacandritsos i sar.,

2010) imalo je za cilj ispitivanje uloge više različitih patogena u izazivanju kolapsa, te se došlo do zaključka da mešovita mikrosporidijalno-virusna infekcija igra najvažniju ulogu u pojavi uginuća. Costa i sar. (2011) u svojim istraživanjima navode da primećena negativna korelacija između *N. ceranae* i DWV, može da bude posledica kompetitivnog odnosa ova dva patogena za ćelije domaćina. Naime, kao što je već napomenuto, *N. ceranae* izaziva oštećenja epitelih ćelija srednjeg creva (Higes i sar., 2013), a digestivni trakt igra značajnu ulogu u patogenezi virusa deformisanih krila (Boncristiani i sar., 2009). Iz svega navedenog, jasno je da su efekti udruženih infekcija pčelinjih virusa i mikrosporidija veoma malo ispitivani. Drugim rečima, postoji nedostatak informacija o tipovima i posledicama interakcija pojedinačnih virusa i mikrosporidija u pčelinjim društvima kako u svetu, tako i u Srbiji, gde do danas nikakva istraživanja ovog tipa nisu sprovedena.

2.4. PREGLED METODA KOJE SE KORISTE U DETEKCIJI I IDENTIFIKACIJI UZROČNIKA MIKROSPORIDIJALNIH I VIRUSNIH INFEKCIJA PČELA

Na osnovu važećeg pravilnika Svetske organizacije za zdravlje životinja (OIE, 2013), prisustvo spora *Nosema* vrsta se detektuje iz macerata abdomena pčela upotrebom svetlosnog mikroskopa. Korišćenjem elektronskog mikroskopa moguće je, u izvesnoj meri, razlikovati spore *N. apis* i *N. ceranae*, međutim ova metoda povećava troškove analize i ne pruža zadovoljavajuću specifičnost. Tek razvojem protokola DNK analize korišćenjem PCR (Martín-Hernández i sar., 2007), PCR-RFLP (Klee i sar., 2007; Tapasztó i sar., 2009), multiplex PCR (Martin-Hernandez i sar., 2007), kao i real-time PCR (Cox-Foster i sar., 2007; Bourgeois i sar., 2010) postalo je moguće sa sigurnošću utvrditi koja od pomenutih mikrosporidija je prisutna u ispitujućem materijalu.

Dijagnostikovanje virusnih infekcija pčela može predstavljati poteškoću usled pojave čestih inaparentnih infekcija, odnosno infekcija bez pojave

simptoma (Bailey, 1967). Godinama se prisustvo virusnih čestica utvrđivalo elektronskom mikroskopijom, kako direktno, iz homogenata pčela, tako i nakon inokulacije ispitivanog materijala u lutke (Vecchi i sar., 1990). Ova metoda je veoma složena, zahteva dosta vremena, pri čemu se javljaju i sezonska ograničenja. Nakon razvoja seroloških metoda kao što su agar-gel imunodifuzioni test (AGID), indirektni imonofluorescentni test (IFA) i imunoenzimski test (ELISA), otkrivanje prisustva virusa u uzorcima pčela je prilično olakšano (Anderson, 1984; Allen i sar., 1986; Allen i Ball, 1995). Međutim, upotreba seroloških metoda u svrhu detekcije virusa nije uvek najpouzdanija metoda. Najpre, nizak nivo specifičnosti ovih testova može dovesti do pogrešnog klasifikovanja srodnih virusa (Allen i Ball, 1995). Zatim, nizak nivo osetljivosti seroloških testova u određenoj meri može biti ograničavajući faktor u detekciji virusa kod latentnih infekcija. Indirektni ELISA test koji su koristili Allen i sar. (1986) je pokazao veliku osetljivost, ali kao i ostali serološki testovi, zahteva proizvodnju specifičnih antiseruma, što u mnogome poskupljuje postupak otkrivanja uzročnika i otežava ponovljivost testa među različitim istraživačkim grupama. Razvoj PCR tehnologije sredinom osamdesetih godina prošlog veka označio je početak jedne potpuno nove ere u molekularnim istraživanjima (Alberts i sar., 2002). Ova metoda je izazvala revoluciju u dijagnostici virusnih infekcija i uspešno prevazilazeći sve pomenute poteškoće, ubrzo postala moćno dijagnostičko sredstvo. Upotreba RT-PCR u svrhu detekcije i identifikacije uzročnika virusnih oboljenja je opisana u brojnim radovima (Hung i sar., 2000; Benjeddou i sar., 2001; Evans, 2001; Grabenstiner i sar., 2001; Bakonyi i sar., 2002; Ribiere i sar., 2002; Tentcheva i sar., 2004; Chantawannakul i sar., 2006). Pomenuta metoda je modifikovana u formi multiplex RT-PCR-a da bi odgovorila na zahteve otkrivanja prisustva više različitih uzročnika u jednom uzorku u slučajevima složenih virusnih infekcija (Chen i sar., 2004; Topley i sar., 2005; Grabensteiner i sar., 2007; Nielsen i sar., 2008). U poslednjih nekoliko godina u postupku detekcije, identifikacije i kvantifikacije virusa u uzorcima pčela, sve više se koristi metod real-time-RT-

qPCR koji omogućuje praćenje reakcije umnožavanja i kvantifikovanje umnoženog proizvoda u momentu odvijanja reakcije. Ova metoda, pored visoke specifičnosti i osetljivosti (1000 puta osetljivija od ELISA testa i 100 puta od konvencionalnog PCR-a), nudi i mogućnost kvantifikacije umnoženog produkta.

Real-time RT-qPCR, uz korišćenje SYBR-Green tehnologije, je korišćen u svrhu otkrivanja prisustva RNK svih sedam pomenutih virusa (Cox-Foster i sar., 2007; Evans, 2007; Kukielka i sar., 2008; Palacios i sar., 2008; Siede i sar., 2008). Karakteristika ove tehnologije je korišćenje fluorescentne boje (SYBR-Green) u svrhu vizuelizacije umnoženog proizvoda u momentu odvijanja reakcije. Prilikom korišćenja SYBR-Green tehnologije, fluorescentna boja se nespecifično veže za dvolančanu DNK stvorenu u procesu amplifikacije, pri čemu dolazi do fluorescencije (Morrison i sar., 1998). Softver real-time PCR aparata beleži intenzitet fluorescencije poreklom od boje vezane za dvolančanu DNK, oblikujući ga u odgovarajući dijagram na ekranu računara. Jedan od nedostataka ove metode je, upravo, nespecifičnost u vezivanju fluorescentne boje za prisutnu dvolančanu DNK. Dešava se da uređaj prikaže fluorescenciju poreklom od prajmer-dimer struktura koje se mogu javiti u procesu amplifikacije. S obzirom na to, da je nemoguće utvrditi poreklo fluorescencije, na taj način dolazi do lažno pozitivnih rezultata. Upotreba real-time RT-PCR tehnologije bazirane na Taqman® probama je smanjila procenat greške i povećala specifičnost i osetljivost detekcije nukleinskih kiselina različitih virusa u uzorcima pčela. Naime, Taqman® proba predstavlja oligonukleotidnu sekvencu (15-30 nukleotida) komplementarnu delu tražene nukleotidne sekvence, koja se nalazi do deset baznih parova „uzvodno“ od mesta vezivanja prajmera. Ovakva proba je obeležena fluorescentnim bojama na svom 5' i 3' kraju. Na 5' kraju probe se nalazi boja pod nazivom „reporter“, koja je u stanju da emituje fluorescenciju odgovarajuće talasne dužine koju softver aparata može da zabeleži. Na 3' kraju se nalazi fluorescentna boja pod nazivom „quencher“ (eng. quencher – gasilac, supresor), koja pretvara fluorescenciju

„reporter“-a u fluorescenciju talasne dužine kakvu aparat ne može da zabeleži. Emitovanje fluorescencije, a samim tim i beleženje signala od strane PCR aparata, je moguće samo ako se „reporter“ udalji od „quencher“-a. To se postiže zahvaljujući 5' egzonukleaznoj aktivnosti DNK polimeraze, koja hidrolizuje probu vezanu nedaleko od prajmera, oslobađa „reporter“, čija fluorescencija biva zabeležena od strane softvera PCR aparata. Upravo komplementarnost nukleotidne sekvence probe delu tražene sekvence obezbeđuje beleženje fluorescencije poreklom isključivo od umnoženog proizvoda, a ne od bilo koje dvolančane DNK (što je bio slučaj sa SYBR-Green). Pomenuta karakteristika obezbeđuje Taqman® tehnologiji visoku preciznost i specifičnost u otkrivanju nukleinskih kiselina virusa. Noviji radovi pokazuju tendenciju upotrebe Taqman® proba za identifikaciju i vizuelizaciju produkata amplifikacije virusne RNK iz uzoraka pčela (Chantawannakul i sar., 2006; Blanchard i sar., 2007; Jamnikar Ciglencečki i sar., 2012; Mingxiao i sar., 2013; Simeunović i sar., 2014a). Prednost Taqman® nad SYBR-Green tehnologijom je i u mogućnosti otkrivanja prisustva naslednog materijala više različitih virusa u uzorku pčela tokom jedne reakcije. Ovu mogućnost pružaju višekanalni real-time PCR aparati, koji su u stanju da detektuju proizvode umnožavanja koji su hibridizovani probama koje emituju fluorescencije različitih talasnih dužina u jedinstvenoj reakciji. Svaka proba, obeležena drugačijom bojom, se veže za sebi komplementarnu sekvencu nukleinske kiseline traženog virusa, pri čemu softver višekanalnog PCR aparata beleži fluorescenciju samo vezanih proba. Na taj način se, u jedinstvenoj reakciji, otkriva prisustvo različitih virusa u jednom uzorku. Još jedna prednost upotrebe fluorescentnih proba je u brzosti i preciznoj apsolutnoj kvantifikaciji umnoženog proizvoda - virusne RNK (Blanchard i sar., 2008,2012; Boncristiani i sar., 2009; di Prisco i sar., 2011; Mingxiao i sar., 2013).

2.5. ISTRAŽIVANJA PRISUSTVA UZROČNIKA MIKROSPORIDIJALNIH I VIRUSNIH INFEKCIJA PČELINJIH DRUŠTAVA NA TERITORIJI SRBIJE

Na osnovu šestogodišnjeg istraživanja od strane Stevanovic i sar. (2011, 2013), utvrđeno je predominantno prisustvo *N. ceranae* u uzorcima pčela poreklom iz Srbije i drugih zemalja bivše SFRJ, sa samo jednim uzorkom pozitivnim na prisustvo *N. apis*. Od zemalja bivše SFRJ, ispitivanje prisustva virusa u pčelinjim društvima izvršeno je u Sloveniji (Jamnikar Ciglencečki i sar., 2012) i Hrvatskoj (Tlak Gajger i sar., 2014). U Srbiji, rezultati preliminarnih istraživanja na 50 pčelinjih društava pokazuju prisustvo DWV u 76,4 %, odnosno ABPV u 61,8 % ispitivanih pčelinjih društava (Simeunović i sar., 2014a). Pored ispitivanja prisustva patogena, u Srbiji je izvršeno i ispitivanje genetskog diverziteta *A. mellifera carnica* – kranjske medonosne pčele (Stanimirovic i sar., 2005). Na osnovu iznetih podataka, nameće se potreba pretrage prisustva različitih virusa pčela u Srbiji, što će doprineti dobijanju potpunije slike o raznovrsnosti patogena pčela i mogućim uzrocima gubitaka društava. Da bi se dobili podaci o zdravstvenom stanju pčelinjih društava u pogledu prisustva, raširenosti i udela pojedinih virusa na teritoriji Srbije, neophodno je izvršiti molekularno-genetičke analize pčela sa reprezentativnih lokaliteta na prisustvo virusa.

Podaci dobijeni ovim istraživanjem pružili bi esencijalne informacije o prisustvu i zastupljenosti određenih virusa i mikrosporodija u pčelinjim društvima u Srbiji. Takve informacije su korisne u epizootiološkom smislu, ali i u svrhu planiranja daljih koraka za kontrolu i prevenciju oboljenja izazvanih pomenutim patogenima.

2. CILJ I ZADACI RADA

Uzimajući u obzir malo dostupnih literaturnih podataka o prisustvu i zastupljenosti DWV i ABPV, kao i odsustvo relevantnih podataka o prisustvu SBV i CBPV kod pčelinjih društava na teritoriji Republike Srbije, cilj ove doktorske disertacije je da se primenom molekularno genetičkih tehnika izvrši detekcija i identifikacija uzročnika virusnih infekcija zastupljenih kod pčelinjih zajednica koje potiču iz različitih krajeva naše zemlje. Pored toga, istraživanje obuhvata i utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti mikrosporidija roda *Nosema* kod ispitivanih pčelinjih zajednica, kao i njihovu zastupljenost u mešovitim, mikrosporidijalno-virusnim, infekcijama.

Zadaci ovog istraživanja su:

1. Prikupljanje uzoraka pčela iz 15 pčelinjih zajednica sa 10 reprezentativnih lokaliteta na teritoriji Srbije. Prikupljanje uzoraka pčela je izvršeno tokom marta, jula i oktobra meseca.
2. Obradivanje i priprema prikupljenih uzoraka pčela za izvođenje molekularnih metoda laboratorijske dijagnostike.
3. Ispitivanje pripremljenih uzoraka pčela primenom metoda PCR, RT-PCR i real-time RT-PCR na prisustvo nukleinskih kiselina mikrosporidija roda *Nosema*, virusa deformisanih krila (DWV), virusa akutne paralize pčela (ABPV), virusa mešinastog legla (SBV) i virusa hronične paralize pčela (CBPV).
4. Statistička obrada dobijenih rezultata ispitivanja u pogledu raširenosti mikrosporidijalnih i virusnih infekcija pčela u ispitivanim pčelinjim zajednicama.
5. Utvrđivanje povezanosti virusnih i mikrosporidijalnih infekcija u ispitivanim pčelinjim zajednicama.
6. Sekvenciranje umnoženih delova genoma virusa detektovanih u Srbiji i njihovo poređenje sa sekvencama virusa objavljenih u genskoj bazi podataka.

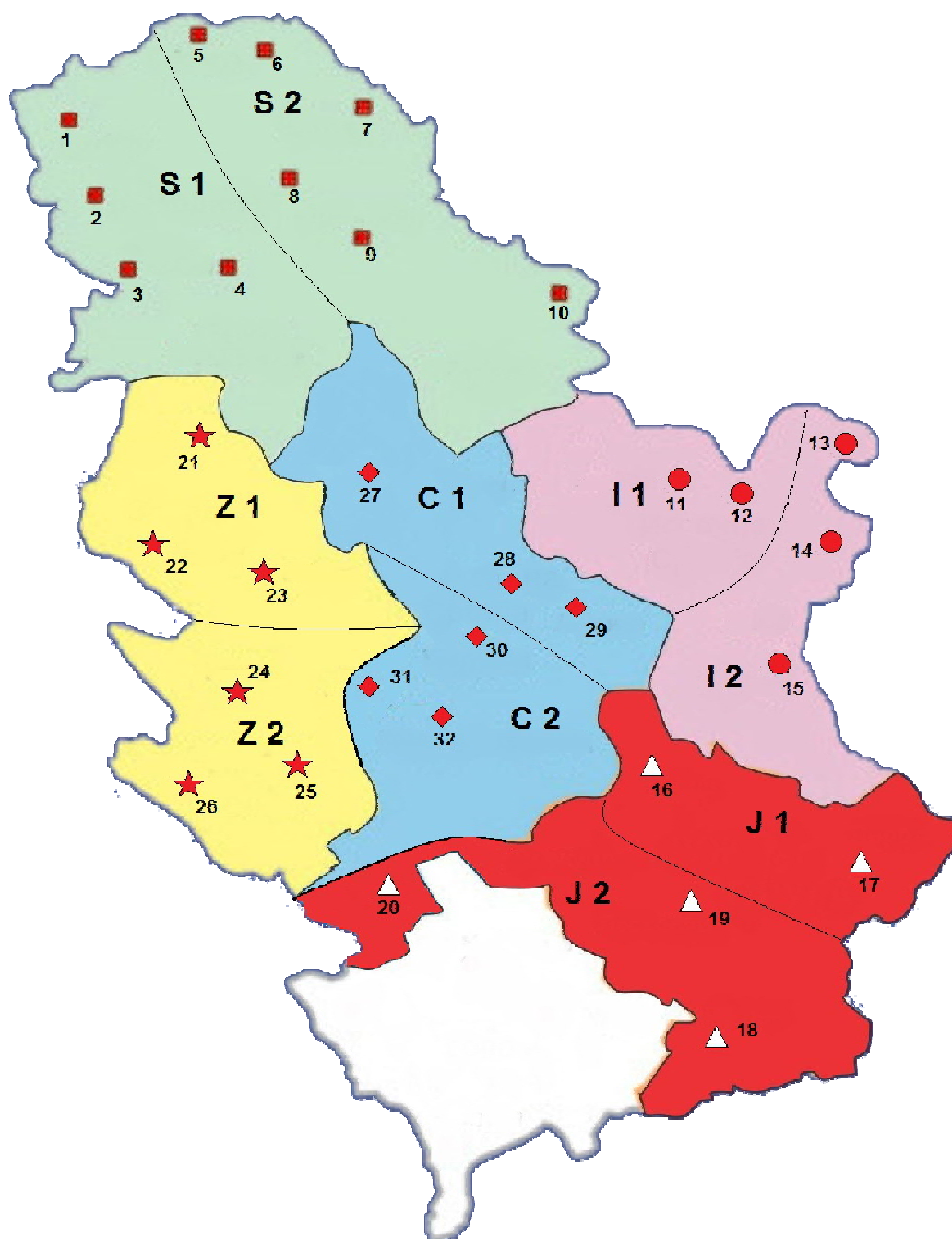
4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

4.1.1. ODABIR REPREZENTATIVNIH LOKALITETA I PČELINJIH DRUŠTAVA PO LOKALITETU

4.1.1.1. Odabir lokaliteta i podlokaliteta

U cilju određivanja prisustva i zastupljenosti uzročnika mikrosporidijalnih i virusnih infekcija pčelinjih zajednica na teritoriji Srbije, odabrano je 10 lokaliteta (Slika 5). Kriterijum u odabiru lokaliteta za uzorkovanje bio je ravnomerna geografska rasprostranjenost pčelinjaka na teritoriji Srbije. Odabranih 10 lokaliteta je raspoređeno tako da se po dva lokaliteta nalaze na severu, jugu, istoku, zapadu i centralnom delu Srbije. Lokaliteti imaju podlokalitete u cilju dobijanja što objektivnijih rezultata o pojavi i zastupljenosti različitih virusa u pčelinjacima na teritoriji Srbije. U odabiru lokaliteta bitan činilac je bila i nadmorska visina, odnosno klimatske karakteristike regiona, tako da izabrani lokaliteti reprezentuju klimatske karakteristike cele Srbije. Ujedno, prilikom odabira lokaliteta uzimana je u obzir i gustina pčelinjih društava na određenom području, te su izabrana društva poticala sa malih, srednjih i većih pčelinjaka.



Slika 5 – Mapa Srbije sa odabranim lokalitetima i podlokalitetima za uzorkovanje pčela. S1 i S2 – severna Srbija; I1 i I2 – istočna Srbija; J1 i J2 – južna Srbija; Z1 i Z2 – zapadna Srbija; C1 i C2 – centralna Srbija.

1 – Sombor; 2 – Odžaci; 3 – Bačka Palanka; 4 – Novi Sad; 5 – Subotica; 6 – Kanjiža; 7 – Kikinda; 8 – Novi Bečej; 9 – Zrenjanin; 10 – Vršac; 11 – Kučevo; 12 – Donji Milanovac; 13 – Kladovo; 14 – Negotin; 15 – Zaječar; 16 – Aleksinac; 17 – Pirot; 18 – Vranje; 19 – Leskovac; 20 – Novi Pazar; 21 – Šabac; 22 – Sokolska Planina; 23 – Valjevo; 24 – Užice; 25 – Ivanjica; 26 – Prijepolje; 27 – Beograd; 28 – Svilajnac; 29 – Despotovac; 30 – Kragujevac; 31 – Čačak; 32 – Kraljevo.

4.1.1.2. Odabir pčelinjih društava po lokalitetu

Uzorkovanje pčela je izvršeno na svakom podlokalitetu iz jakih, srednje jakih i slabih društava. Kriterijumi za procenu jačine društva su se odnosili na površinu legla i broj ulica pčela po košnici (Delaplane i sar., 2013). Procenu jačine svakog uzorkovanog društva je izvršio autor ove disertacije. Pčelinja društva iz kojih su uzorkovane pčele nisu pokazivala kliničke simptome bolesti. Sa većine podlokaliteta pčele su uzorkovane iz dva jaka, jednog srednje jakog i dva slaba društva. U ovom istraživanju izabrana su samo stacionarna pčelinja društva (društva koja se ne sele na različite paše). Razlog za uvođenje ovog kriterijuma je ispitivanje prisustva i zastupljenosti uzročnika mikrosporidijalnih i virusnih infekcija na odgovarajućim lokalitetima teritorije Srbije, a odabir selećih društava bi uticao na rezultat distribucije navedenih uzročnika.

4.1.2. UZORKOVANJE MATERIJALA ZA PREGLED

Uzorkovanje materijala za pregled sa svih navedenih lokaliteta rađeno je u tri perioda razvoja pčelinjeg društva. Prvo uzorkovanje je u saglasnosti sa prolećnim razvojem pčelinjeg društva i vršilo se od 10.04. do 01.05.2013. godine. Drugo uzorkovanje prati period najintenzivnijeg razvoja i aktivnosti pčelinjeg društva, i obavljeno je od 10.05. do 05.06.2013. godine. Treći, završni period uzorkovanja je period priprema za uzimljanje, odnosno period ekološkog i biološkog mirovanja pčelinjih društava, od 20.08. do 10.09.2013. godine.

Materijal za pregled na prisustvo uzročnika mikrosporidijalnih infekcija je bio uzorak od 60 pčela izletnica po društvu, živih u trenutku uzorkovanja, uzetih sa leta košnica (OIE, 2008, 2013). Materijal za pregled na prisustvo uzročnika virusnih infekcija obuhvatio je 40 odraslih pčela po društvu, uzetih sa leta i iz unutrašnjosti košnice (Tentcheva i sar., 2004, Gauthier i sar., 2007).

Uzorkovanje živih pčela za pregled na prisustvo mikrosporidija roda *Nosema* je obavljeno uz pomoć jednokratne sterilne plastične posude, kojom su

sakupljane izletnice sa leta košnice. Pre uzimanja uzoraka, leto košnice je bilo zatvoreno na 30 minuta, onemogućavajući izletnicama da se vrate u košnicu, time obezbeđujući osobi koja uzorkuje dovoljno pčela (60 izletnica) za uzorkovanje (Botias i sar., 2012). Za svako društvo je korišćena nova, jednokratna plastična posuda. Uzorci su neposredno nakon uzorkovanja stavljeni u kutiju od stiropora ispunjenu suvim ledom (-79⁰C).

Uzorkovanje živih, odraslih pčela za pretragu na prisustvo virusa je obavljeno na sledeći način: sterilnom pincetom je uzorkovano 30 živih pčela iz različitih delova košnice, koje su odmah po uzorkovanju stavljane u sterilne epruvete sa zapašaćem i pakovane u kutiju od stiropora ispunjenu suvim ledom. Za svako pčelinje društvo je uzimana nova sterilna pinceta.

Nakon završenog uzorkovanja sa jednog lokaliteta, uzorci su u najkraćem vremenu dopremani u laboratoriju gde je izvršena priprema uzorka za izolaciju DNK za potrebe ispitivanja prisustva mikrosporidija, odnosno izolaciju RNK za potrebe ispitivanja prisustva virusa. Izolati DNK su skladišteni u hladnjak na -20⁰C dok se ne pristupi analizi primenom PCR tehnike. RNK je odmah po izolovanju upotrebljena za analizu primenom real-time RT-PCR metode.

4.2. METODE

4.2.1. ISPITIVANJE PRISUSTVA MIKROSPORIDIJA RODA *Nosema* U UZORKOVANOM MATERIJALU

4.2.1.1. Mikrosopski pregled

Prema preporukama OIE (2008, 2013), abdomeni 60 pčela iz svakog uzorka su macerirani u tarioniku uz dodatak 2-3 ml vode. Tri kapi macerata su stavljane na mikroskopsku pločicu koja je pokrivena mikroskopskom ljuspicom. Tako pripremljen uzorak je analiziran pod svetlosnim mikroskopom, pod uvećanjem od 400x u svrhu pretrage na prisustvo spora *Nosema* uzročnika. Za potrebe izolacije DNK, tečna faza macerata, koja predstavlja suspenziju spora, je pipetirana sterilnom jednokratnom pipetom i stavljana u sterilne epruvete od 2 ml. Materijal za izolaciju mikrosporidijalne DNK je uziman od svih macerata, bez obzira da li je potvrđeno prisustvo spora *Nosema* vrste ili ne.

Nakon potvrde prisustva spora *Nosema* vrste, u ispitujući macerat je dodavana voda do zapremine od 60 ml, kako bi se napravio odnos 60 abdomena : 60 ml vode. Zapremina od 1 ml tako pripremljenog macerata je upotrebljena za određivanje prosečnog broja spora po pčeli pomoću Neubauer-improved hemocitometra. Prisustvo spora je beleženo u pet nesusednih kvadrata hemocitometra, pri čemu se svaki kvadrat sastoji iz 16 manjih kvadrata. Na taj način, jedna pronađena spora u $5 \times 16 = 80$ kvadrata je ekvivalentna broju od 50000 spora po pčeli (Cantwell 1970; Simeunovic i sar., 2014b).

4.2.1.2. Izolacija mikrosporidijalne DNK

Neposredno pre početka procesa izolacije DNK, tečna faza macerata pčela, prethodno pregledana pod svetlosnim mikroskopom na prisustvo spora, podvrgnuta je centrifugiranju na 13000 rpm kako bi se formirao talog koji bi potencijalno sadržao spore mikrosporidija. Nakon odbacivanja supernatanta, dobijeni talog je preliven tečnim azotom i maceriran sterilnim štapićima radi razaranja zida eventualno prisutnih spora *Nosema* vrsta i oslobađanja njihove DNK. Izolacija nukleinskih kiselina je izvršena primenom komercijalnog kita za ekstrakciju - „DNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen, Valencia, CA) po uputstvu proizvođača. Izolovana nukleinska kiselina je čuvana na -20°C do amplifikacije primenom PCR tehnike. U cilju kontrole efikasnosti procesa izolacije, uporedo sa izolacijom ispitivanog materijala, obavljana izolacija sigurno pozitivnog materijala (potvrđeno sekvenciranjem) i redestilovane vode (ddH₂O). Izolati su skladišteni u hladnjak na -20°C dok se ne pristupi amplifikaciji putem PCR metode.

4.2.1.3. Amplifikacija mikrosporidijalne DNK koristeći duplex-PCR metodu.

U svrhu utvrđivanja prisustva i determinacije mikrosporidijalne DNK korišćena je duplex-PCR metoda koju su inicijalno uspostavili Martín-Hernández i sar. (2007) koja omogućava istovremeno umnožavanje vrsta-specifičnih delova genoma (16S rRNK gena) vrsta *N. apis* i *N. ceranae*, odnosno njihovu diferencijaciju zahvaljujući primeni prajmera specifičnih za vrstu. Za potrebe umnožavanja delova genoma i determinacije vrste *Nosema* uzročnika, korišćeni su species-specifični prajmeri 321APIS-FOR/REV i 218MITOC-FOR/REV, opisani u Martín-Hernández i sar. (2007) (Tabela 1).

Tabela 1 - Prajmeri korišćeni u svrhu molekularne identifikacije vrsta *N. apis* i *N. ceranae* tokom duplex-PCR

Prajmer	Sekvenca (5'-3')	<i>Nosema</i> vrsta	Ciljani gen	Očekivana veličina produkta (bp)
321APIS-FOR 321APIS-REV	GGGGGCATGTCTTTGACGTA TGTA GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAA CAACTATG	<i>N. apis</i>	16S rRNK	321
218MITOC-FOR 218MITOC-REV	CGGCGACGATGTGATATGAAAA TATTAA CCCGGTCATTCTCAAACAAAA ACCG	<i>N. ceranae</i>	16S rRNK	218-219

Temperaturni režim i PCR protokol za duplex PCR preuzet je iz radova Martín-Hernández i sar. (2007) i Stevanovic i sar. (2011). PCR amplifikacija obavljena je u aparatima Mastercycler Personal (Eppendorf) i MultiGene Gradient (Labnet International Inc.) u zapremini od 25 µl koja je sadržala 1× PCR-bufer A (Kapa Biosystems), 2,5 mM MgCl₂ (Kapa Biosystems), 0,2 mM od svakog deoksinukleozid trifosfata (Qiagen), 0,5 µM od svakog prajmera (nos-16S-fw, nos-16S-rv, Operon Biotechnologies, Inc., Huntsville, Al), 0.5 U *Taq* polimeraze (Kapa Biosystems) i 5 µl DNK uzorka. PCR parametri bili su sledeći: inicijalna DNK denaturacija od 4 min na 95°C, 45 ciklusa od 1 min na 95°C, 1 min na 53°C i 1 min na 72°C, kao i završni korak ekstenzije od 4 min na 72°C. Za svaki PCR, korišćena je pozitivna kontrola, DNK *Nosema* pozitivnog uzorka (izolovana iz macerata abdomena pčela u kojima su i mikroskopski detektovane spore) i negativna kontrola (ddH₂O) paralelno sa uzorcima koje ispitujeemo.

4.2.1.4. Elektroforeza dobijenih produkata i vizuelizacija pod UV svetlosti

Zapremina od 4 μ l svakog PCR produkta je pomešana sa 1.5 μ l 6X DNA Loading Dye (Thermoscientific, SAD) i podvrgnuta procesu horizontalne elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Horizontalna gel elektroforeza izvođena je tokom vremenskog perioda od 40 minuta pri jaćini struje od 50 V. Nakon završenog procesa elektroforeze, agarozni gel je obojen etidijum-bromidom. Za vizuelizaciju rezultata korišćen je UV transiluminator „ETX-20.C“ (Vilber - Lourmat). Za određivanje velićine amplifikata korišćen je komercijalni marker O'RangeRuler™ 50bp DNA (Thermo Scientific, SAD).

4.2.2. ISPITIVANJE PRISUSTVA PĀELINJIH VIRUSA U UZORKOVANOM MATERIJALU

4.2.2.1. Priprema materijala za izolaciju virusne RNK

Svaki uzorak od 30 pćela je stavljen u pojedinaćne, sterilne, staklene epruvete. U epruvete je dodato po 5 ml TBE (Tris/Borate/EDTA) pufera i sadržaj je homogenizovan uz pomoć sterilnih staklenih štapića. Nakon homogenizacije, 1 ml macerata je prebacivan u sterilne epruvete od 1.5 ml i centrifugiran 15 minuta na 10000 g.

4.2.2.2. Izolacija virusne RNK

Zapremina od 140 μ l supernatanta je korišćena kao materijal za izolaciju virusne RNK. Izolacija RNK je vršena pomoću komercijalnog seta - „ZR Viral RNA Kit™“ (Zymo Research, Orange, CA) u skladu sa uputstvima proizvođaća. Izolovana RNK je smeštena na -80°C do postupka amplifikacije primenom RT-PCR ili real-time RT-PCR.

4.2.2.3. Amplifikacija virusne RNK primenom real-time RT-PCR metode

Za amplifikaciju RNK svakog pojedinačnog virusa korišćen je komercijalni set „Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit“ (Qiagen, Valencia, CA). Umnožavanje je vršeno u jednom koraku, u kontinuiranoj reakciji se odigrava prvo reverzna transkripcija, a zatim umnožavanje dela genoma ciljanog virusa. Za umnožavanje dela genoma svakog pojedinačnog virusa korišćeni su specifični parovi prajmera: DWV-F/R, ABPV-F/R i SBV-F/R (Chantawannakul i sar., 2006) i CBPV-F/R (Blanchard i sar., 2007) (Tabela 2). Za potrebe vizuelizacije umnoženog dela genoma korišćene su Taqman® probe: DWV-T, ABPV-T, SBV-T (Chantawannakul i sar., 2006) i CBPV-T (Blanchard i sar., 2007) (Tabela 2). Svaka proba je na svom 5' kraju obeležena sa FAM fluorescentnom bojom (zeleni fluorescentni signal), a na 3' kraju sa TAMRA “quencher” bojom.

Tabela 2 - Prajmeri i Taqman® probe korišćeni u molekularnoj identifikaciji RNK ispitivanih virusa primenom real-time RT-PCR tehnike

Prajmer/ Proba	Sekvenca (5'-3')	Virus
DWV958F DWV9711R DWV9627T	CCTGGACAAGGTCTCGGTAGAA ATTCAGGACCCCAACCAAT CATGCTCGAGGATTGGGTCGTCGT	virus deformisanih krila
APV95F APV159R APV121T	TCCTATATCGACGACGAAAGACAA GCGCTTTAATCCATCCAATTGA TTTCCCCGGACTTGAC	virus akutne paralize pčela
SBV311F SBV380R SBV331T	AAGTTGGAGGCGCGYATTTG CAAATGTCTTCTTACDAGAAGYAAGGATTG CGGAGTGGAAAGAT	virus mešinastog legla
CBPV1F CBPV2R CBPVT	CGCAAGTACGCCTTGATAAAGAAC ACTACTAGAACTCGTCGCTTCG TCAAGAACGAGACCACCGCCAAGTTC	virus hronične paralize pčela

F - Forward prajmer, R - Reverse prajmer, T - proba

Svaka real-time RT-PCR reakcija je izvedena u jednom koraku u zapremini od 25 μ l koja je sadržala: 12.5 μ l 2X Rotor-Gene Probe RT-PCR Master Mix, 0.8 μ M Forward prajmera, 0.8 μ M Reverse prajmera, 0.4 μ M probe, 0.25 μ l Rotor-Gene RT Mix, 7.25 μ l H₂O i 2 μ l RNK. Reakcije su izvedene na real-time PCR aparatu „Rotor-Gene Q 5plex“ (Qiagen, Valencia, CA). Za sve tražene viruse temperaturni i vremenski režim se sastojao iz: reverzne transkripcije (50°C, 15 minuta), inicijalne aktivacije enzima (95°C, 5 minuta) i 45 ciklusa denaturacije (95°C, 15 s), hibridizacije prajmera i proba (za DWV, ABPV i CBPV na temperaturi od 50°C, 30 s; za SBV na temperaturi od 50°C, 30 s) i elongacije DNK (72°C, 30 s). Vizuelizacija amplifikovanih produkata je omogućena beleženjem nivoa fluorescencije u vidu specifičnih dijagrama uz pomoć kompjuterskog softvera koji je obezbeđen od strane proizvođača aparata.

4.2.3. SEKVENCIRANJE DELA VIRUSNOG GENOMA

U svrhu potvrde identifikacije virusne RNK pronađene u ispitivanim uzorcima, kao i analize stepena sličnosti sa sekvencama virusa uskladištenih u „GenBank“ - genskoj bazi podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>), izvršeno je sekvenciranje delova njihovih genoma.

Sekvenciranje genoma virusa je metod koji se koristi za određivanje redosleda nukleotidnih baza adenina, guanina, citozina i timina u molekulu DNK. Postoji više različitih pristupa sekvenciranju, pri čemu je za potrebe sekvenciranja dužih fragmenata najpogodniji Sanger-ov pristup. Princip Sangerove metode se zasniva na upotrebi dideoksinukleotid trifosfata (ddNTPs) u cilju prekida DNK lanca. Svaki od ovih ddNTP-a je obeležen drugom fluorescentnom bojom koje nakon ekscitacije emituju svetlost različite talasne dužine. Pošto im nedostaje -OH grupa na 3' kraju, mogu se ugraditi u DNK lanac, ali se posle njih ne mogu vezati drugi deoksinukleotidi, odnosno

elongacija DNK lanca teći će normalno sve dok se u njega ne ugradi neki od dideoksinukleotida, kada se lanac završava. Ovo ima za posledicu stvaranje velikog broja lanaca DNK različite dužine. DNK lanci različitih dužina podvrgavaju se elektroforezi u specijalnom polimeru automatskog genetskog analizatora. Laserski čitač detektuje intenzitet fluorescencije koju emituju dideoksinukleotidi koji se nalaze na kraju lanca. Kada svi lanci DNK prođu kroz kapilaru i detektor očitava sve obeležene dideoksinukleotide, kompjuterski program aparata vrši upoređivanje i obradu svih podataka uz izradu hromatograma na osnovu koga se određuje redosled nukleotida u ispitujućem materijalu.

4.2.3.1. Amplifikacija nukleinskih kiselina izabranih virusa putem RT-PCR tehnike

Nakon analize rezultata dobijenih putem real-time RT-PCR, izabrani su uzorci koji će biti podvrgnuti procesu sekvenciranja. Na osnovu izgleda amplifikacionih kriva uzoraka kod kojih je potvrđeno prisustvo jednog ili više virusa, odabrano je 11 virusa čiji će delovi genoma biti sekvencirani: 2 izolata RNK ABPV, 2 izolata RNK CBPV, 3 izolata SBV i 8 izolata DWV.

Za potrebe sekvenciranja i filogenetske analize odabranih RNK izolata virusa, bilo je potrebno izvršiti RT-PCR reakcije uz upotrebu preporučenih prajmera (Tabela 3) i protokola od strane „Francuske agencije za bezbednost hrane, zaštitu životne sredine i bezbednost na radu“ (ANSES, 2011). RT-PCR produkti dobijeni uz pomoć preporučenih prajmera odlikuju se dužim nukleotidnim sekvencama u poređenju sa real-time RT-PCR produktima. Duže nukleotidne sekvence povećavaju tačnost identifikacije virusa nakon sekvenciranja, ali i određivanja stepena srodnosti sa drugim sekvencama nakon filogenetskih analiza.

Tabela 3 - Prajmeri korišćeni u RT-PCR reakciji koja je prethodila sekvenciranju

Prajmer	Sekvenca (5'-3')	Vrsta virusa	Očekivana veličina produkta (bp)
DWV 3	GGTCCGCGGCTAAGATTGTA	virus deformisanih krila	420
DWV 4	CGGCTGTTTGATGGAAGAAGTT		
ABPV 3	CATATTGGCGAGCCACTATG	virus akutne paralize pčela	398
ABPV 4	CCACTTCCACACA ACTATCG		
SBV 1	ACCAACCGATTCTCAGTAG	virus mešinastog legla	467
SBV2	CCTIGGAACTCTGCTGIGTA		
CBPV1-1	TCAGACACCGAATCTGATTATTG	virus hronične paralize pčela	570
CBPV1-2	ACTACTAGAACTCGTCGCTTCG		

Svaka RT-PCR reakcija je izvedena u jednom koraku primenom komercijalnog kita AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Applied Biosystems, SAD), u zapremini od 25 µl na aparatu Multigene Gradient Thermal Cycler (Labnet International Inc.). Protokol za izvođenje reakcije je bio sledeći: 12.5 µl 2X RT-PCR Buffer (pufera), 0.4 µM Forward prajmera, 0.4 µM Reverse prajmera, 1 µl 25X RT-PCR Enzyme Mix (mešavine enzima), 7 µl ddH₂O i 2.5 µl RNK. Temperaturni i vremenski režim reakcije je bio sledeći: 50°C u trajanju od 10 minuta, 95°C u trajanju od 5 minuta, zatim 30 ciklusa od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 55°C i 45 sekundi na 72°C i na kraju završni korak elongacije na 72°C u trajanju od 5 minuta.

Proizvodi RT-PCR reakcije su podvrgnuti procesu horizontalne elektroforeze na 1% agaroznom gelu. Horizontalna gel elektroforeza izvođena je tokom vremenskog perioda od 40 minuta pri jačini struje od 100 V. Nakon završenog procesa elektroforeze, agarozni gel je obojen etidijum-bromidom. Za vizuelizaciju rezultata korišćen je UV transiluminator „ETX-20.C“ (Vilber - Lourmat). Za određivanje veličine amplifikata korišćen je komercijalni marker O'RangeRuler™ 50bp DNA (Thermo Scientific, SAD).

4.2.3.2. Prečišćavanje PCR proizvoda iz gela radi sekvenciranja

Nakon vizuelizacije na agaroznom gelu, trake, odnosno proizvodi veličine koje korespondiraju traženim virusima, isečeni su iz gela. Iz isečenih delova gela vršena je ekstrakcija i prečišćavanje dobijenog PCR proizvoda. Na ovaj način se PCR proizvod oslobađa neinkorporisanih nukleotida, etidijum bromida i drugih nespecifičnih proizvoda reakcije koji mogu negativno uticati na izvođenje metode sekvenciranja dela virusnog genoma. Postupak prečišćavanja gela je vršen pomoću seta QIAquick gel extraction (Qiagen, Germany) po uputstvu proizvođača. Na ovaj način je dobijeno od 45 do 48 µl prečišćenog PCR proizvoda. Pre sekvenciranja u uzorcima je obavljena kvantifikacija DNK metodom spektrofotometrije (Nanodrop, Germany) radi izjednačavanja koncentracija.

4.2.3.3. Primena metode sekvenciranja za potvrdu identifikacije nukleinskih kiselina virusa čije je prisustvo potvrđeno u uzorcima pčela

Sekvenciranje dobijenih PCR proizvoda je izvršeno po Sanger metodi uz izvođenje kapilarne elektroforeze u automatskom genetskom analizatoru 3130 (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD). Reakcija sekvenciranja je vršena primenom BigDye Terminator v3.1 seta (Applied Biosystems, SAD), po sledećem protokolu: 4 µl Terminator Ready Reaction mix, 2 µl Sequencing buffer, 1 µl F prajmera, 8 µl prečišćenog PCR proizvoda i 5 µl H₂O. Reakcija se odvijala u termosajkleru AB 2720 na osnovu sledećeg temperaturnog i vremenskog režima: 96°C u trajanju od 1 minuta, zatim 25 ciklusa od 10 sekundi na 96°C, 5 sekundi na 50°C i 4 minuta na 60°C.

Prečišćavanje proizvoda sekvenciranja je izvršeno primenom komercijalnih kolona Centri Sept (Princeton, SAD) po uputstvu proizvođača. Na ovaj način se uklanjaju neinkorporisani dideoksinukleotidi i deoksinukleotidi koji mogu izazvati određene probleme tokom izvođenja elektroforeze u genetskom analizatoru.

Kapilarna elektroforeza u automatskom genetskom analizatoru 3130 pri čemu su četiri kapilare dužine od 36 cm su postavljene na uređaj, a kao polimer je korišćen POP-7 (Applied Biosystems, SAD). Uređaj je podešen na RapidSeq protokol za POP-7 polimer i kapilare dužine od 36 cm.

4.2.3.4. Analiza rezultata sekvenciranja

Dobijene sekvence genoma DWV, ABPV, SBV i CBPV su obrađivane korišćenjem SeqScape programa (Applied Biosystems, SAD) i korigovane u Chromas Lite programu (Technelysium Pty, Ltd, Australija).

Genotipizacija i filogenetska analiza DWV obavljena je korišćenjem dela poliprotein gena (Accession number GU109335.1) dužine 420 nukleotida, od pozicije 4245 do 4664. Za genotipizaciju i filogenetsku analizu ABPV korišćen je deo kapsid-protein gena (Accession number AF486073.2) dužine 398 nukleotida, od pozicije 8102 do 8499. Kod SBV korišćen je deo poliprotein gena (Accession number AF092924.1) dužine 467 nukleotida, od pozicije 221 do 708, dok je kod CBPV primenjen deo gena za RNK-zavisnu RNK polimerazu (Accession number EU122229) dužine 570 nukleotida, od pozicije 1921 do 2490.

Poravnavanje sekvenci nukleotida, izrada filogenetskog stabla i izračunavanje filogenetske distance je vršeno korišćenjem kompjuterskog programa MEGA 6 (Tamura i sar., 2013). Autentičnost dobijenih parcijalnih nukleotidnih sekvenci svakog od ispitivanih virusa je potvrđena putem „BLAST“ pretrage (eng. *Basic Local Alignment Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) genske baze podataka (GenBank). Nakon pretrage, izvršena je statistička provera genetske sličnosti dobijenih nukleotidnih sekvenci virusa pčela poreklom iz Srbije i relevantnih sekvenci virusa koje se nalaze u genskoj bazi podataka. Najpre je izvršeno sravnjivanje nukleotidnih sekvenci primenom ClustalW algoritma. Nakon toga, izvršena je filogenetska analiza primenom Maximum Parsimony i Neighbor-Joining algoritama.

4.3. Statistička obrada rezultata

Normalnost raspodele je testirana matematičkim i grafičkim metodama (koeficijent varijacije, mere oblika raspodele, Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testovi, histogram). Za deskripciju podataka korišćeni su aritmetička sredina i standardna devijacija (normalno raspodeljeni), kao i medijana i opseg (podaci koji ne podležu normalnoj raspodeli). Učestalosti su prikazivane kao apsolutne i relativne frekvencije izražene u procentima.

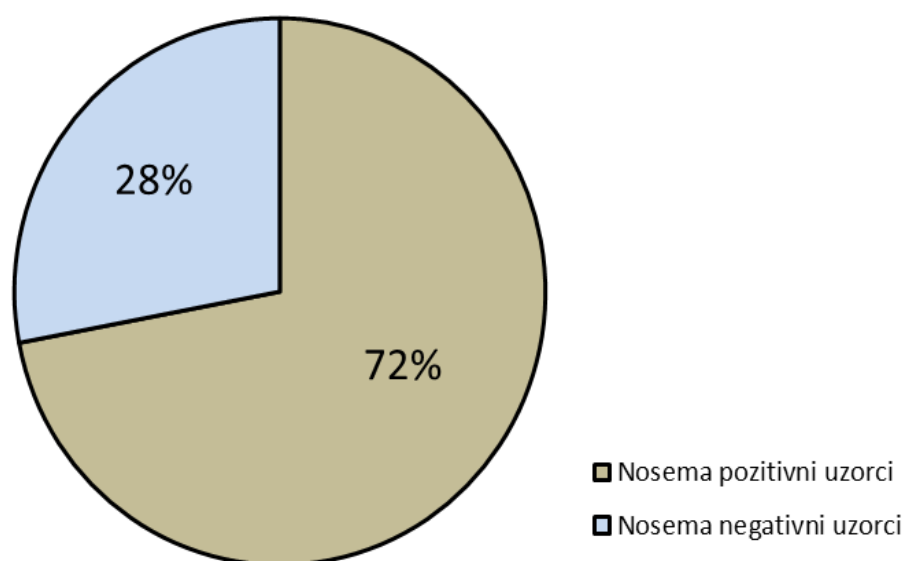
Za poređenje dve grupe korišćeni su studentov t-test, kao i Man-Whitney U test u zavisnosti od distribucije podataka. Za poređenje više od dve grupe korišćeni su ANOVA (kao parametarska metoda) sa Tuckey PostHoc metodom, kao i Kruskal-Wallis (kao neparametarska alternativa) koga je pratio Mann-Whitney za analizu parova. Za poređenje učestalosti korišćeni su Pearsonov hi-kvadrat test, Fišerov test tačne verovatnoće, a tamo gde zbog velikog broja kategorija i malih učestalosti nije bilo adekvatno primeniti predhodna dva navedena testa, izvedena je Monte Carlo simulacija sa 95% intervalom poverenja na 1000 uzoraka.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. PRISUSTVO I ZASTUPLJENOST UZROČNIKA MIKROSPORIDIJALNIH INFEKCIJA U UZORCIMA PČELA

Prisustvo i zastupljenost uzročnika mikrosporidijalnih infekcija pčela u uzorkovanom materijalu ispitivano je mikroskopskim pregledom macerata abdomena pčela, na osnovu uputstva koje propisuje OIE (2008, 2013). Na osnovu mikroskopskog pregleda moguće je izvršiti determinaciju mikrosporidija samo do roda *Nosema*, dok se determinacija vrste vrši primenom molekularnih metoda. Pozitivan nalaz podrazumeva prisustvo jedne i više spora mikrosporidija roda *Nosema* u ispitujućem maceratu. Nakon mikroskopskog pregleda 150 uzoraka pčela, prisustvo spora je utvrđeno u 108 uzoraka, što čini 72 % ukupno obrađenih uzoraka (Grafikon 1). Odsustvo spora je zabeleženo u 42 uzorka, što čini 28 % svih obrađenih uzoraka.

Grafikon 1 - Rezultati **mikroskopske** analize prisustva spora mikrosporidija vrste *Nosema* u uzorcima pčela poreklom iz Srbije (n=150)



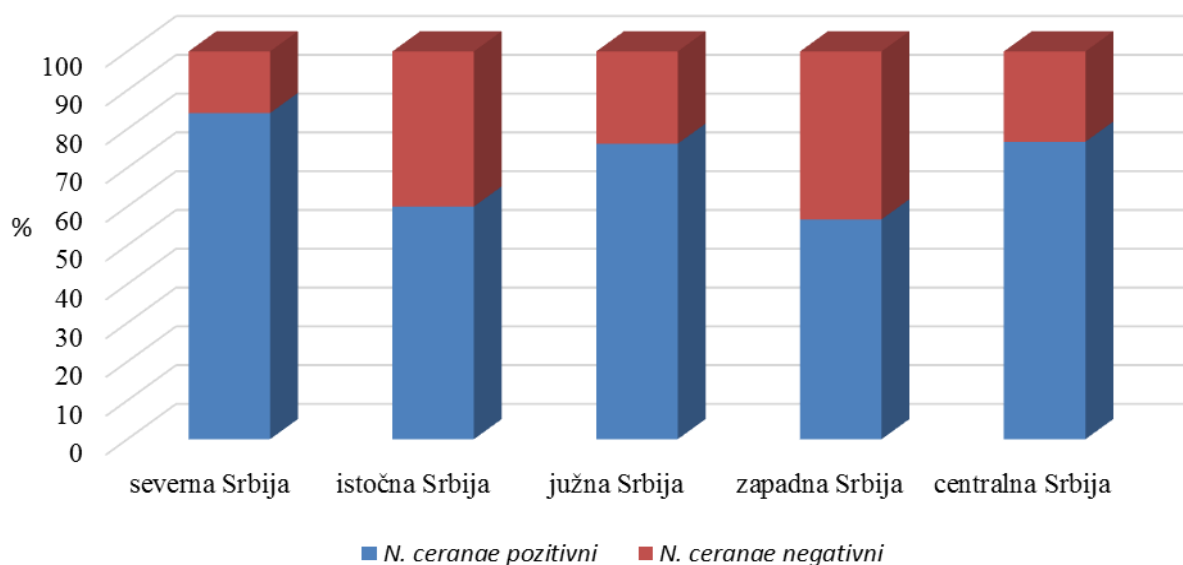
Regionalna distribucija uzoraka u kojima je mikroskopskim pregledom utvrđeno prisustvo spora je prikazana u Tabeli 4 i Grafikonu 2.

Tabela 4 – Zastupljenost uzoraka iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije u kojima je mikroskopskim pregledom utvrđeno prisustvo spora mikrosporidija iz roda *Nosema*

Spore mikrosporidija		Region					p*
		Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Prisutne	n	37	15	16	17	23	0,062†
	%	84,1	60	76,2	56,7	76,7	
Odsutne	n	7	10	5	13	7	
	%	15,9	40	23,8	43,3	23,3	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

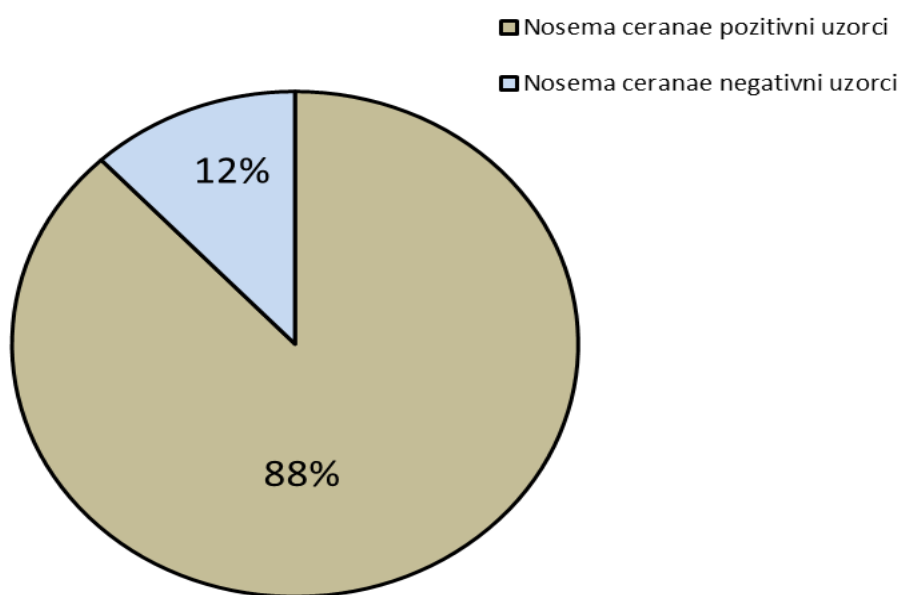
Grafikon 2 – Regionalna distribucija uzoraka u kojima je mikroskopskim pregledom utvrđeno prisustvo ili odsustvo spora mikrosporidija vrste *Nosema*

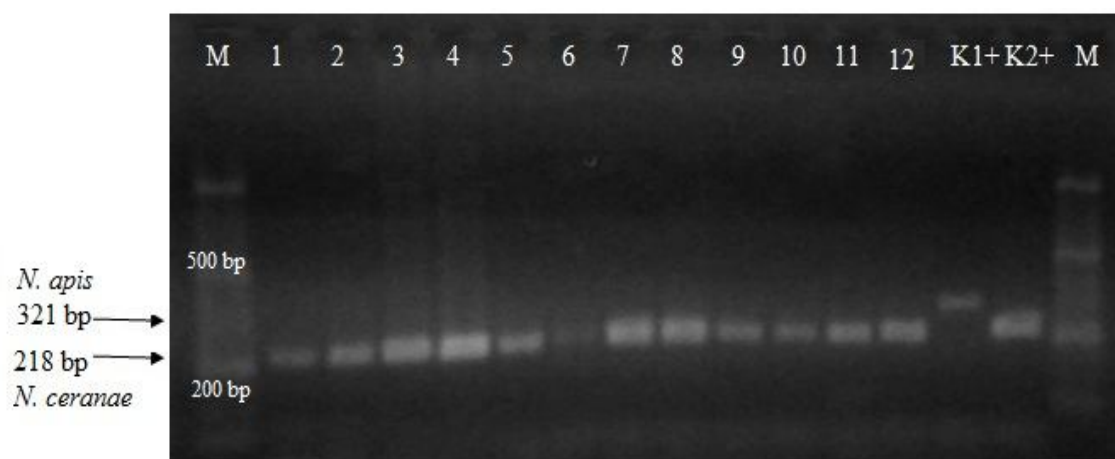


Mikroskopskim pregledom ispitujućeg materijala, prisustvo spora je zabeleženo u 37 uzoraka poreklom iz severne Srbije, što čini 84,1 % svih obrađenih uzoraka poreklom iz ovog regiona. U istočnoj Srbiji prisustvo spora je utvrđeno u 15 uzoraka, što predstavlja 60 % obrađenih uzoraka iz ovog regiona. Na prisustvo spora u južnoj Srbiji pozitivno je bilo 16 uzoraka, što čini 76,2 % obrađenih uzoraka iz ovog regiona. U zapadnoj Srbiji prisustvo spora je utvrđeno u 17 uzoraka, što predstavlja 56,7 % obrađenih uzoraka ovog regiona. Prisustvo spora u centralnoj Srbiji je zabeleženo u 23 uzorka, što čini 76,7 % obrađenih uzoraka ovog regiona. Primenom χ^2 testa nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji *Nosema* mikrosporidija.

Nakon mikroskopskog pregleda, svi ispitivani uzorci pčela su, bez obzira na prisustvo spora mikrosporidija, analizirani primenom molekularnih metoda (Slika 6). Rezultati PCR analiza (Grafikon 3, Tabela 5) pokazuju prisustvo mikrosporidijalne DNK u 132 uzorka, odnosno u 88 % ukupno analiziranih uzoraka.

Grafikon 3 – Rezultati PCR analize prisustva DNK mikrosporidije *N. ceranae* u uzorcima pčela poreklom iz Srbije (n=150)





Slika 6 - Prikaz dobijenih rezultata PCR analize prisustva DNK mikrosporidija roda *Nosema* u uzorcima u kojima nije zabeleženo prisustvo spora nakon mikroskopskog pregleda. M - Ladder; 1 - 12 - uzorci kojima je detektovana DNK *N. ceranae*; K1+ - pozitivna kontrola DNK *N. apis*; K2+ - pozitivna kontrola DNK *N. ceranae*.

Tabela 5 - Uporedni prikaz rezultata ispitivanja prisustva mikrosporidija roda *Nosema* u uzorcima pčela poreklom iz Srbije izvršenih mikroskopskim pregledom (prisustvo spora) i PCR analizama (prisustvo DNK)

Metoda	Prisustvo spora/DNK mikrosporidija roda <i>Nosema</i>		Odsustvo spora/DNK mikrosporidija roda <i>Nosema</i>	
	broj	%	broj	%
Mikroskopski pregled n=150	108	72	42	28
PCR n=150	132	88	18	12

Rezultati poređenja dve pomenute metode pokazuju da je u 24 uzorka u kojima mikroskopskim pregledom nije utvrđeno prisustvo spora, utvrđeno prisustvo DNK mikrosporidija roda *Nosema*. Upotrebom dupleks PCR tehnike analizirani su prisustvo i zastupljenost *N. apis* i *N. ceranae* u uzorcima pčela poreklom iz Srbije. Od ukupnog broja *Nosema* pozitivnih uzoraka, prisustvo DNK *N. ceranae*

je zabeleženo u 100 % *Nosema* pozitivnih uzoraka, dok prisustvo DNK *N. apis* nije utvrđeno ni u jednom ispitivanom uzorku (Tabela 6).

Tabela 6 – Rezultati prisustva i zastupljenosti mikrosporidija vrste *N. apis* i *N. ceranae* u uzorcima pčela poreklom iz Srbije nakon izvršene dupleks PCR analize

Ukupan broj uzoraka	<i>Nosema</i> pozitivni uzorci		<i>N. ceranae</i> pozitivni uzorci		<i>N. apis</i> pozitivni uzorci	
	broj	%	broj	%	broj	%
150	132	88	132	100	0	0

Regionalna distribucija uzoraka u kojima je tehnikom PCR utvrđeno prisustvo DNK *N. ceranae* je prikazana u Tabeli 7 i Grafikonu 4.

Tabela 7 – Zastupljenost uzoraka iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije u kojima je primenom tehnike PCR utvrđeno prisustvo DNK *N. ceranae*

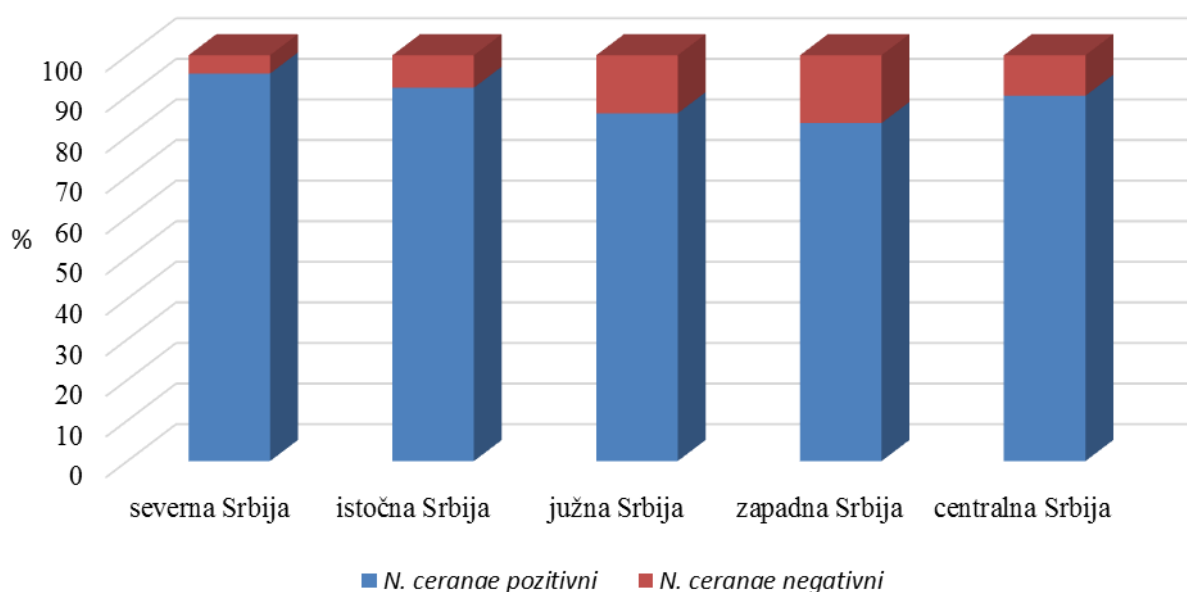
DNK <i>N. ceranae</i>		Region					p*
		Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Prisutna	n	42	23	18	25	27	0,712
	%	95,5	92	85,7	83,3	90	
Odsutna	n	2	2	3	5	3	
	%	4,5	8	14,3	16,7	10	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Prisustvo DNK *N. ceranae* je zabeleženo u 95,5 % svih obrađenih uzoraka poreklom iz iz severne Srbije. U istočnoj Srbiji prisustvo DNK *N. ceranae* je utvrđeno u 92 % obrađenih uzoraka iz ovog regiona. Na prisustvo DNK *N.*

ceranae u južnoj Srbiji pozitivno je bilo 85,7 % obrađenih uzoraka iz ovog regiona. U zapadnoj Srbiji DNK *N. ceranae* je utvrđena u 83,3 % obrađenih uzoraka ovog regiona. DNK *N. ceranae* u centralnoj Srbiji je zabeležena u 90 % obrađenih uzoraka ovog regiona. Primenom χ^2 testa nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji DNK *N. ceranae*.

Grafikon 4 - Regionalna distribucija uzoraka u kojima je primenom tehnike PCR utvrđeno prisustvo ili odsustvo DNK *N. ceranae*



Uzimajući u obzir kriterijum jačine pčelinjeg društva, distribucija uzoraka u kojima je mikroskopskim pregledom utvrđeno prisustvo spora je prikazana u Tabeli 8 i Grafikonu 5.

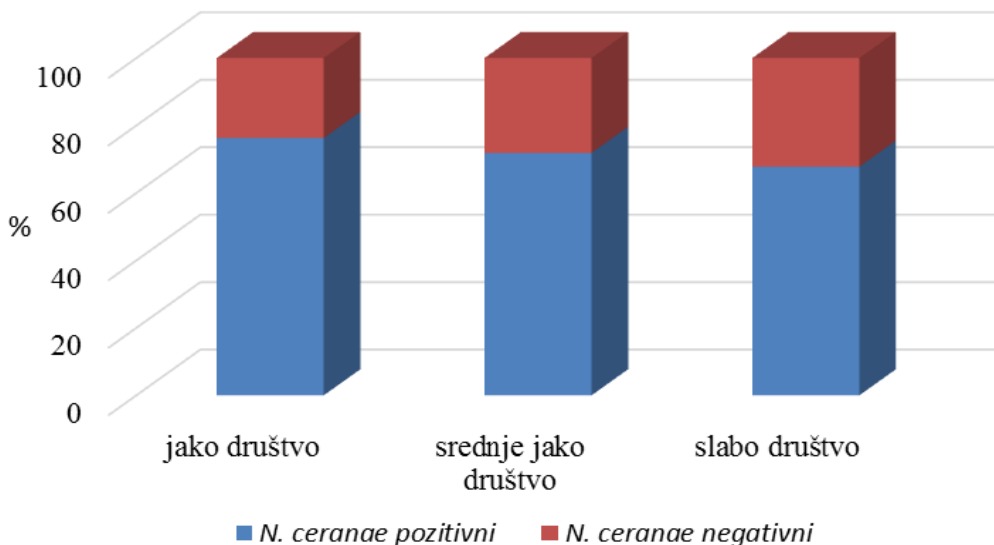
Tabela 8 – Zastupljenost uzoraka poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava u kojima je mikroskopskim pregledom utvrđeno prisustvo spora mikrosporidija iz roda *Nosema*

Spore mikrosporidija		Jačina pčelinjeg društva			p*
		Jako društvo n=59	Srednje jako društvo n=32	Slabo društvo n=59	
Prisutne	n	45	23	40	0,591†
	%	76,3	71,9	67,8	
Odsutne	n	14	9	19	
	%	23,7	28,1	32,2	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Prisustvo spora je zabeleženo u 45 uzoraka poreklom iz jakih, 23 uzorka iz srednje jakih i 40 uzoraka iz slabih pčelinjih društava. Primenom χ^2 testa nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u uticaju jačine pčelinjeg društva na pojavu *Nosema* mikrosporidija.

Grafikon 5 – Distribucija uzoraka u jakim, srednje jakim i slabim pčelinjim društva u kojima je mikroskopskim pregledom utvrđeno prisustvo ili odsustvo spora mikrosporidija vrste *Nosema*



Distribucija uzoraka pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava u kojima je PCR analizama utvrđeno prisustvo DNK *N. ceranae* je prikazana u Tabeli 9 i Grafikonu 6.

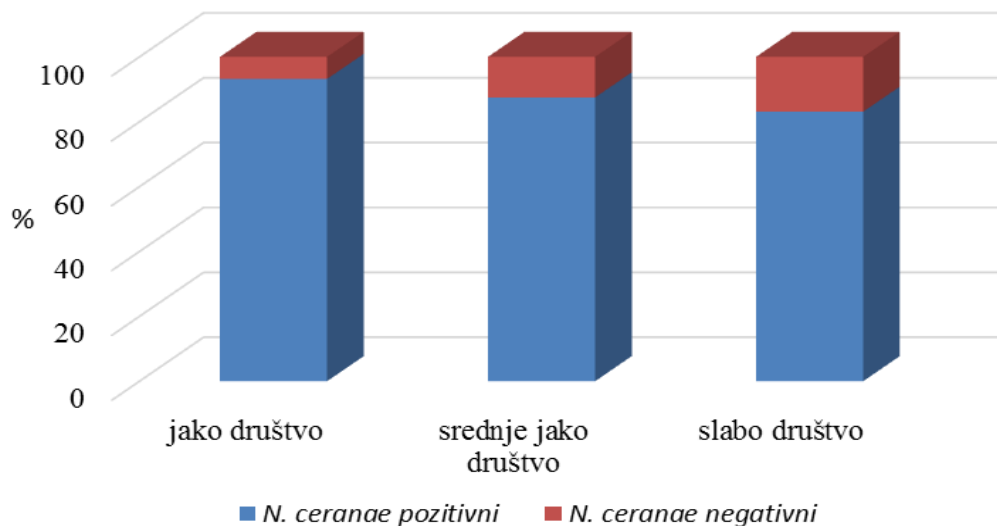
Tabela 9 – Zastupljenost uzoraka poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava u kojima je primenom tehnike PCR utvrđeno prisustvo DNK *N. ceranae*

DNK <i>N. ceranae</i>		Jačina pčelinjeg društva			p*
		Jako društvo n=59	Srednje jako društvo n=32	Slabo društvo n=59	
Prisutna	n	55	28	49	0,053
	%	93,2	87,5	83,1	
Odsutna	n	4	4	10	
	%	6,8	12,5	16,9	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Primenom tehnike PCR, prisustvo DNK *N. ceranae* je zabeleženo u 93,2 % jakih društava. U srednje jakim društvima DNK *N. ceranae* je potvrđena u 87,5 % uzoraka. Na prisustvo DNK *N. ceranae* u slabim društvima, pozitivno je bilo 83,1 % svih slabih društava. Primenom χ^2 testa nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u uticaju jačine pčelinjeg društva na prisustvo DNK *N. ceranae*.

Grafikon 6 – Distribucija uzoraka u jakim, srednje jakim i slabim pčelinjim društvima u kojima je primenom tehnike PCR utvrđeno prisustvo ili odsustvo DNK *N. ceranae*



Poređenjem vrednosti prosečnog broja spora po pčeli primenom Kurskal-Wallis testa (Tabela 10), za uzorke koji potiču iz severne, južne, istočne, zapadne i centralne Srbije utvrđena je statistička značajnost na nivou $p < 0,001$.

Tabela 10 – Prosečan broj spora mikrosporidije vrste *Nosema ceranae* u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Region	Broj spora po pčeli Med (min-max)	Kurskal-Wallis test	p*
Severna Srbija	750.000 (0-1.900.000)	20,853	<0,001
Južna Srbija	100.000 (0-17.500.000)		
Istočna Srbija	50.000 (0-53.000.000)		
Zapadna Srbija	50.000 (0-51.500.000)		
Centralna Srbija	200.000 (0-17.800.000)		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Testiranjem sume rangova primenom Mann-Whitney testa, utvrđena je statistički značajna razlika ($p=0,048$) u prosečnom broju spora po pčeli među uzorcima iz severne i istočne Srbije (Tabela 11), statistički veoma značajna razlika ($p<0,001$) između uzoraka iz severne i zapadne Srbije (Tabela 11), statistički značajna razlika ($p=0,022$) između uzoraka iz južne i zapadne Srbije (Tabela 13), i statistički značajna razlika ($p=0,002$) između uzoraka iz zapadne i centralne Srbije (Tabela 14). U ostalim poređenjima uzoraka koji pripadaju različitim regionima, nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosečnom broju spora po pčeli (Tabele 11, 12 i 13).

Tabela 11 – Prosečan broj spora mikrosporidije vrste *Nosema ceranae* u uzorcima pčela iz severne Srbije u odnosu na ostale regione

Region	Broj spora po pčeli Med (min-max)	Mann-Whitney test	p*
Severna Srbija	750.000 (0-1.900.000)	347,000	0,105
Južna Srbija	100.000 (0-17.500.000)		
Severna Srbija	750.000 (0-1.900.000)	393,000	0,048
Istočna Srbija	50.000 (0-53.000.000)		
Severna Srbija	750.000 (0-1.900.000)	256,500	<0,001
Zapadna Srbija	50.000 (0-51.500.000)		
Severna Srbija	750.000 (0-1.900.000)	507,000	0,091
Centralna Srbija	200.000 (0-17.800.000)		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Tabela 12 – Prosečan broj spora mikrosporidije vrste *Nosema ceranae* u uzorcima pčela iz istočne Srbije u odnosu na ostale regione

Region	Broj spora po pčeli Med (min-max)	Mann-Whitney test	p*
Istočna Srbija	50.000 (0-53.000.000)	235,500	0,543
Južna Srbija	100.000 (0-17.500.000)		
Istočna Srbija	50.000 (0-53.000.000)	296,000	0,162
Zapadna Srbija	50.000 (0-51.500.000)		
Istočna Srbija	50.000 (0-53.000.000)	330,500	0,444
Centralna Srbija	200.000 (0-17.800.000)		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Tabela 13 - Prosečan broj spora mikrosporidije vrste *Nosema ceranae* u uzorcima pčela iz južne Srbije u odnosu na ostale regione

Region	Broj spora po pčeli Med (min-max)	Mann-Whitney test	p*
Južna Srbija	100.000 (0-17.500.000)	199,000	0,022
Zapadna Srbija	50.000 (0-51.500.000)		
Južna Srbija	100.000 (0-17.500.000)	304,500	0,839
Centralna Srbija	200.000 (0-17.800.000)		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Tabela 14 – Prosečan broj spora mikrosporidije vrste *Nosema ceranae* u uzorcima pčela iz zapadne Srbije u odnosu na ostale regione

Region	Broj spora po pčeli Med (min-max)	Mann-Whitney test	p*
Zapadna Srbija	50.000 (0-51.500.000)	247,500	0,002
Centralna Srbija	200.000 (0-17.800.000)		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Poređenjem vrednosti prosečnog broja spora po pčeli primenom Kurskal-Wallis testa (Tabela 15), za uzorke koji potiču iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava, nije utvrđena statistička značajnost. Daljim testiranjem sume rangova primenom Mann-Whitney testa (Tabela 16), takođe nije utvrđena statistička značajnost u prosečnom broju spora po pčeli.

Tabela 15 – Prosečan broj spora mikrosporidije vrste *Nosema ceranae* u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih ili slabih društava

Jačina pčelinjeg društva	Broj spora po pčeli Med (min-max)	Kurskal-Wallis test	p*
Jako	100.000 (0-17.800.000)	1,523	0,467
Srednje jako	150.000 (0-53.000.000)		
Slabo	100.000 (0-19.000.000)		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Tabela 16 – Poređenje prosečnog broj spora mikrosporidije vrste *Nosema ceranae* u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih ili slabih društava

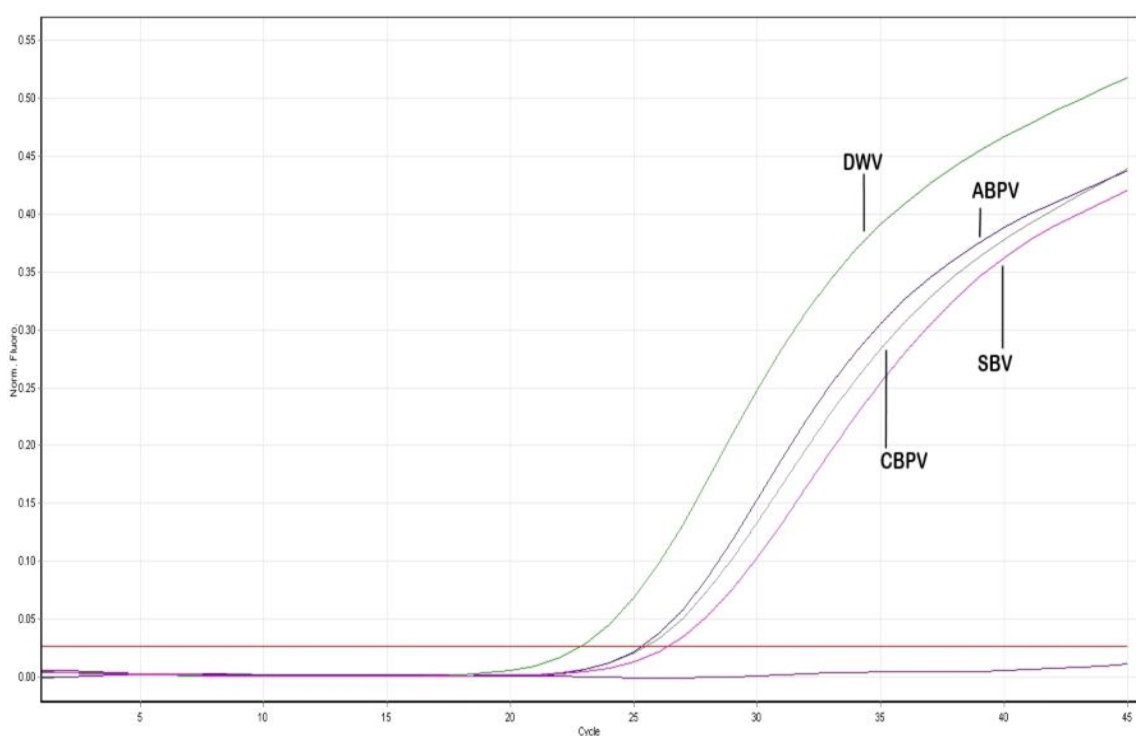
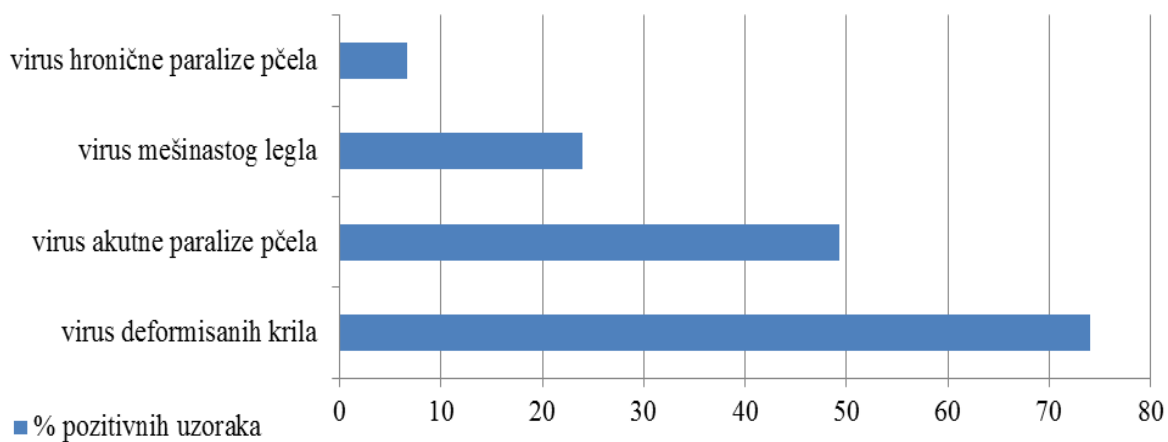
Jačina pčelinjeg društva	Broj spora po pčeli Med (min-max)	Mann-Whitney test	p*
Jako	100.000 (0-17.800.000)	903,000	0,730
Srednje jako	150.000 (0-53.000.000)		
Jako	100.000 (0-17.800.000)	1550,500	0,299
Slabo	100.000 (0-19.000.000)		
Srednje jako	150.000 (0-53.000.000)	825,000	0,315
Slabo	100.000 (0-19.000.000)		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

5.2. PRISUSTVO I ZASTUPLJENOST UZROČNIKA VIRUSNIH INFEKCIJA U UZORCIMA PČELA

Prisustvo i zastupljenost DWV, ABPV, SBV i CBPV u uzorkovanom materijalu poreklom iz pčelinjih društava u kojima kliničkim pregledom nisu zabeleženi simptomi virusnih infekcija, ispitivano je upotrebom real-time RT-PCR metode bazirane na „TaqMan“ probama. Rezultati prisustva virusa pčela na teritoriji Srbije pokazuju da je prisustvo RNK sva četiri pomenuta virusa utvrđeno u ispitujućim uzorcima pčela (Slika 7). Prisustvo RNK pčelinjih virusa je utvrđeno u 131 uzorku, što čini 87,33 % svih obrađenih uzoraka. Odsustvo nukleinskih kiselina virusa pčela je zabeleženo u 19 pčelinjih društava (12,67 %). Zastupljenost ispitivanih virusa na teritoriji Srbije se može videti iz Grafikona 7. Zastupljenost DWV je zabeležena u 111 uzoraka, odnosno u 74 % ispitivanih uzoraka. ABPV pokazuje prisustvo u 74 uzorka, odnosno u 49,3 % ispitivanih uzoraka. RNK SBV je utvrđena u 36 uzoraka, odnosno u 24 % ispitivanih uzoraka. U 10 uzoraka, odnosno u 6,7 % ukupno ispitivanih uzoraka utvrđeno je prisustvo RNK CBPV.

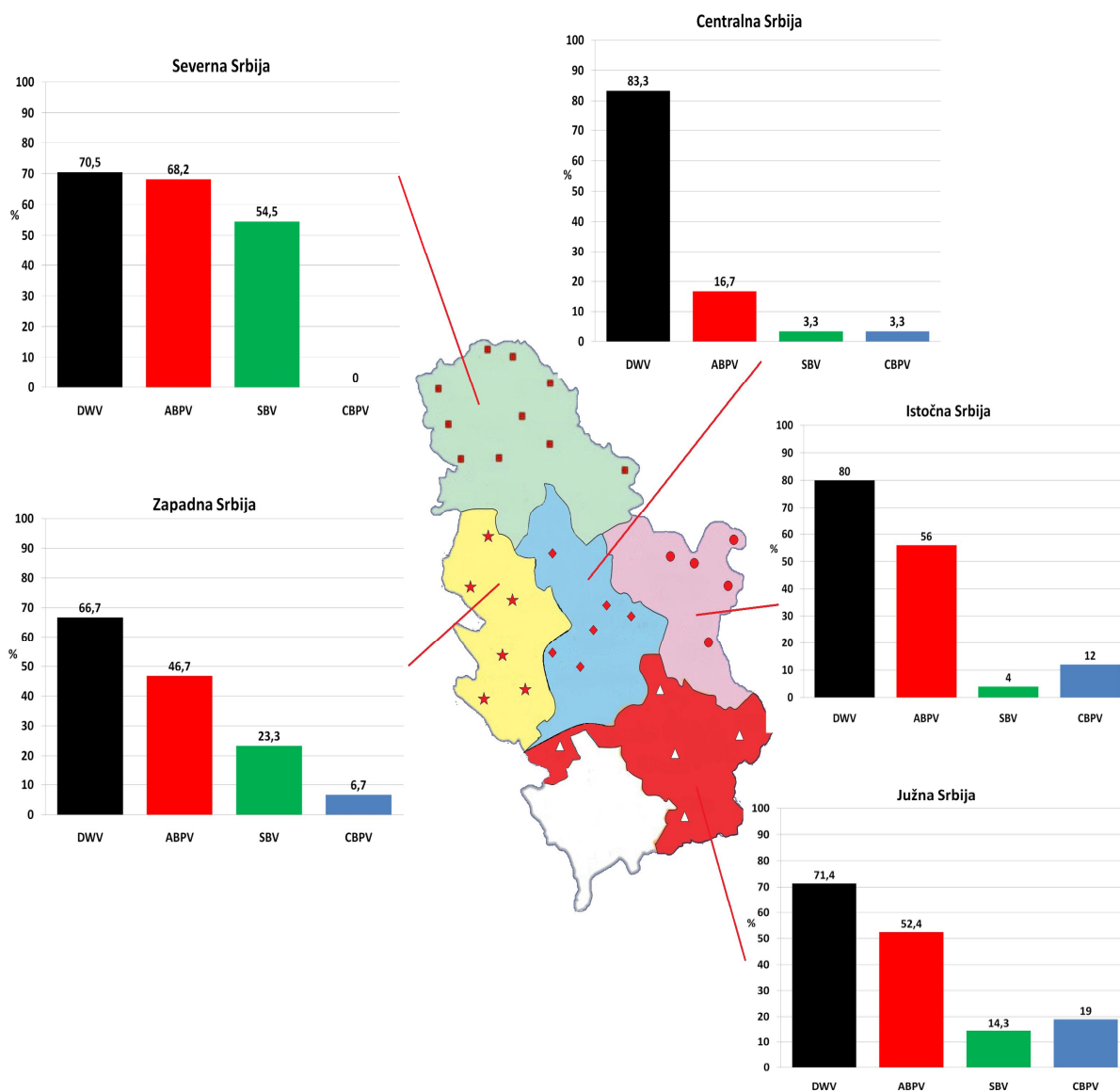
Grafikon 7 – Zastupljenost ispitivanih virusa u uzorcima pčela iz Srbije



Slika 7 – Amplifikacione krive real-time RT-PCR bazirane na TaqMan probama koje pokazuju prisustvo nukleinskih kiselina virusa deformisanih krila, virusa akutne paralize pčela, virusa mešinastog legla i virusa hronične paralize pčela u ispitujućim uzorcima pčela. DWV – virus deformisanih krila; ABPV – virus akutne paralize pčela; SBV – virus mešinastog legla; CBPV – virus hronične paralize pčela

5.2.1. Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Zastupljenost ispitivanih virusa u pčelinjim društvima poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije je prikazana na Slici 8.



Slika 8 - Procentualna zastupljenost virusa deformisanih krila, virusa akutne paralize pčela, virusa mešinastog legla i virusa hronične paralize pčela kod pčelinjih društava poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije.

Distribucija virusa deformisanih krila u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije je prikazana u Tabeli 17.

Tabela 17 – Zastupljenost virusa deformisanih krila u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Virus deformisanih krila n=150	odсутno n=39	n	13	5	6	10	5	0,554†
		%	29,5	20	28,6	33,3	16,7	
	prisutno n=111	n	31	20	15	20	25	
		%	70,5	80	71,4	66,7	83,3	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Posmatrano po regionima, DWV je najzastupljeniji u pčelinjacima centralne Srbije (83,3 %) a najmanje zastupljen u severnoj Srbiji (70,5 %). Upotrebom χ^2 testa utvrđeno je da ne postoji statistička značajnost u regionalnoj distribuciji ovog virusa.

Distribucija ABPV u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije je prikazana u Tabeli 18.

Tabela 18 - Zastupljenost virusa akutne paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Virus akutne paralize pčela n=150	odsutno n=76	n	14	11	10	16	25	0,001†
		%	31,8	44	47,6	53,3	83,3	
	prisutno n=74	n	30	14	11	14	5	
		%	68,2	56	52,4	46,7	16,7	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Virus akutne paralize pčela je najprisutniji u pčelinjacima severne (68,2 %), a najmanje zastupljen u pčelinjacima centralne Srbije (16,7 %). Primenom χ^2 testa utvrđeno je prisustvo statističke značajnosti ($p=0,001$) u regionalnoj distribuciji ovog virusa.

Distribucija SBV u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije je prikazana u Tabeli 19.

Tabela 19 - Zastupljenost virusa mešinastog legla u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Virus mešinastog legla n=150	odsutno n=114	n	20	24	18	23	29	<0,001†
		%	45,5	96	85,7	76,7	96,7	
	prisutno n=36	n	24	1	3	7	1	
		%	54,5	4	14,3	23,3	3,3	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Virus mešinastog legla je najzastupljeniji u uzorcima pčela poreklom iz severne Srbije (54,5 %), dok je njegovo prisustvo najređe u uzorcima pčela poreklom iz centralne Srbije (3,3 %). Primenom χ^2 testa utvrđeno je prisustvo statističke značajnosti ($p < 0,001$) u regionalnoj distribuciji ovog virusa.

Distribucija CBPV u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije je prikazana u Tabeli 20.

Tabela 20 - Zastupljenost virusa hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Virus hronične paralize pčela n=150	odsutno n=140	n	44	22	17	28	29	0,030 ^a
		%	100	88	81	93,3	96,7	
	prisutno n=10	n	0	3	4	2	1	
		%	0	12	19	6,7	3,3	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Virus hronične paralize pčela je najprisutniji u pčelinjacima južne Srbije (19 %), dok u uzorcima iz severne Srbije njegovo prisustvo nije zabeleženo (0 %). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, utvrđeno je prisustvo statističke značajnosti ($p = 0,030$) u regionalnoj distribuciji ovog virusa.

U Tabeli 21 se može videti zastupljenost virusnih infekcija pčela u uzorcima poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije, bez obzira na vrstu virusa utvrđenog u ispitujućem materijalu.

Tabela 21 - Zastupljenost ispitujućih virusa pčela u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Prisustvo virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Bilo koji od ispitivanih virusa n=150	odsutno n=19	n	1	2	5	8	3	0,010^a
		%	2,3	8	23,8	26,7	10	
	prisutno n=131	n	43	23	16	22	27	
		%	97,7	92	76,2	73,3	90	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Virusne infekcije su najzastupljenije u severnoj (97,7 %), a najmanje zastupljene u zapadnoj Srbiji. Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, utvrđeno je prisustvo statističke značajnosti ($p=0,010$) u rasprostranjenosti virusnih infekcija pčela u odnosu na pomenute regione Srbije.

5.2.2. Prisustvo i zastupljenost mešovutih virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Distribucija mešovutih virusnih infekcija sa dva virusa u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije u kojima je kao uzročnik prisutan virus deformisanih krila, prikazana je u Tabeli 22.

Tabela 22 - Zastupljenost virusa deformisanih krila u mešovitim infekcijama sa virusom akutne paralize pčela ili virusom mešinastog legla ili virusom hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Virus deformisanih krila + Virus akutne paralize pčela n=150	odsutno n=104	n	30	14	13	21	26	0,141†
		%	68,2	56	61,9	70	86,7	
	prisutno n=46	n	14	11	8	9	4	
		%	31,8	44	38,1	30	13,3	
Virus deformisanih krila + Virus mešinastog legla n=150	odsutno n=139	n	39	24	20	27	29	0,633 ^a
		%	88,6	96	95,2	90	96,7	
	prisutno n=11	n	5	1	1	3	1	
		%	11,4	4	4,8	10	3,3	
Virus deformisanih krila + Virus hronične paralize pčela n=150	odsutno n=144	n	44	22	19	29	30	0,075 ^a
		%	100	88	90,5	96,7	100	
	prisutno n=6	n	0	3	2	1	0	
		%	0	12	9,5	3,3	0	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Kombinacija DWV i ABPV se, kao najčešća, javila u 44 % uzoraka poreklom iz istočne Srbije, dok je najmanja učestalost ove kombinacije zabeležena u 13,3 % uzoraka poreklom iz centralne Srbije. Primenom χ^2 testa nije zabeležena statistička značajnost u pojavi ove kombinacije virusa između posmatranih

regiona. DWV zajedno sa SBV se najčešće pojavljivao u uzorcima poreklom iz severne Srbije (11,4 %), dok je ova kombinacija virusa bila najmanje učestala u uzorcima poreklom iz centralne Srbije (3,3 %). DWV u kombinaciji sa CBPV se najčešće pojavljivao u uzorcima poreklom iz istočne Srbije, dok ova kombinacija virusa nije pronađena u uzorcima poreklom iz severne i centralne Srbije (0 %). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji pomenute dve kombinacije virusa.

Distribucija mešovityh virusnyh infekcija sa dva virusa u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije u kojima je kao uzročnik prisutan ABPV, prikazana je u Tabeli 23.

Tabela 23 - Zastupljenost virusa akutne paralize pčela u mešovitym infekcijama sa virusom mešinastog legla ili virusom hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Virus akutne paralize pčela + Virus mešinastog legla n=150	odsutno n=139	n	34	25	20	30	30	<0.001 ^a
		%	77,3	100	95,2	100	100	
	prisutno n=11	n	10	0	1	0	0	
		%	22,7	0	4,8	0	0	
Virus akutne paralize pčela + Virus hronične paralize pčela n=150	odsutno n=150	n	44	25	21	30	30	#
		%	100	100	100	100	100	
	prisutno n=0	n	0	0	0	0	0	
		%	0	0	0	0	0	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija; #Nije moguće utvrditi statističku značajnost

Pored već pomenute kombinacije ABPV i DWV (Tabela 23), ABPV se u kombinaciji sa SBV najčešće javljao u uzrocima poreklom iz severne Srbije (22,7 %), dok prisustvo ove kombinacije virusa nije zabeleženo u uzorcima poreklom iz istočne, zapadne i centralne Srbije (0 %). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, utvrđeno je prisustvo statističke značajnosti ($p < 0,001$) u regionalnoj distribuciji ove kombinacije virusa. ABPV u kombinaciji sa CBPV nije zabeležen ni u jednom ispitujućem uzorku. CBPV u kombinaciji sa SBV, takođe nije utvrđen ni u jednom ispitujućem uzorku (Tabela 24).

Tabela 24 - Zastupljenost virusa hronične paralize pčela u mešovitoj infekciji sa virusom mešinastog legla u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					P*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Virus hronične paralize pčela + Virus mešinastog legla n=150	odсутno n=150	n	44	25	21	30	30	#
		%	100	100	100	100	100	
	prisutno n=0	n	0	0	0	0	0	
		%	0	0	0	0	0	

*za nivo značajnosti $\alpha < 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija; #Nije moguće utvrditi statističku značajnost

Tabela 25 - Zastupljenost virusa deformisanih krila u mešovitoj infekciji sa virusom akutne paralize pčela i virusom mešinastog legla u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Virus deformisanih krila + Virus akutne paralize pčela + Virus mešinastog legla n=150	odsutno n=138	n	36	25	20	27	30	0,030 ^a
		%	81,8	100	95,2	90	100	
	prisutno n=12	n	8	0	1	3	0	
		%	18,2	0	4,8	10	0	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Mešovite virusne infekcije u kojima je utvrđeno prisustvo virusa DWV, ABPV i SBV (Tabela 25) su zabeležene u 18,2 % uzoraka poreklom iz severne Srbije, dok se pomenuta kombinacija tri virusa nije mogla utvrditi u uzorcima poreklom iz istočne i zapadne Srbije (0 %). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, utvrđeno je prisustvo statističke značajnosti ($p=0,030$) u regionalnoj distribuciji ove kombinacije virusa.

Tabela 26 - Zastupljenost virusa deformisanih krila u mešovitoj infekciji sa virusom akutne paralize pčela i virusom hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
Virus deformisanih krila + Virus akutne paralize pčela + Virus hronične paralize pčela n=150	odsutno n=147	n	44	25	19	29	30	0,053 ^a
		%	100	100	90,5	96,7	100	
	prisutno n=3	n	0	0	2	1	0	
		%	0	0	9,5	3,3	0	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Kombinacija DWV - ABPV - CBPV (Tabela 26) je utvrđena samo u uzorcima poreklom iz južne (9,5 %) i zapadne Srbije (3,3 %). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji ove kombinacije virusa.

Istovremeno prisustvo sva četiri ispitujuća virusa (Tabela 27) je utvrđeno samo u 1 uzorku pčela poreklom iz južne Srbije (4,8 % od broja uzoraka iz južne Srbije). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji ove kombinacije virusa.

Tabela 27 - Zastupljenost mešovitih infekcija sa virusom deformisanih krila, virusom akutne paralize pčela, virusom mešinastog legla i virusom hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Vrsta virusa			Region					p*
			Severna Srbija n=44	Istočna Srbija n=25	Južna Srbija n=21	Zapadna Srbija n=30	Centralna Srbija n=30	
virus deformisanih krila + virus akutne paralize pčela	odsutno n=149	n	44	25	20	30	30	0,117 ^a
		%	100	100	95,2	100	100	
virus mešinastog legla + virus hronične paralize pčela	prisutno n=1	n	0	0	1	0	0	
		%	0	0	4,8	0	0	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

5.2.3. Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava

Zastupljenost ispitivanih virusa na u odnosu na jačinu pčelinjeg društva se može videti iz Grafikona 8.

Grafikon 8 – Procentualna zastupljenost ispitivanih virusa u jakim, srednje jakim i slabim pčelinjim društvima

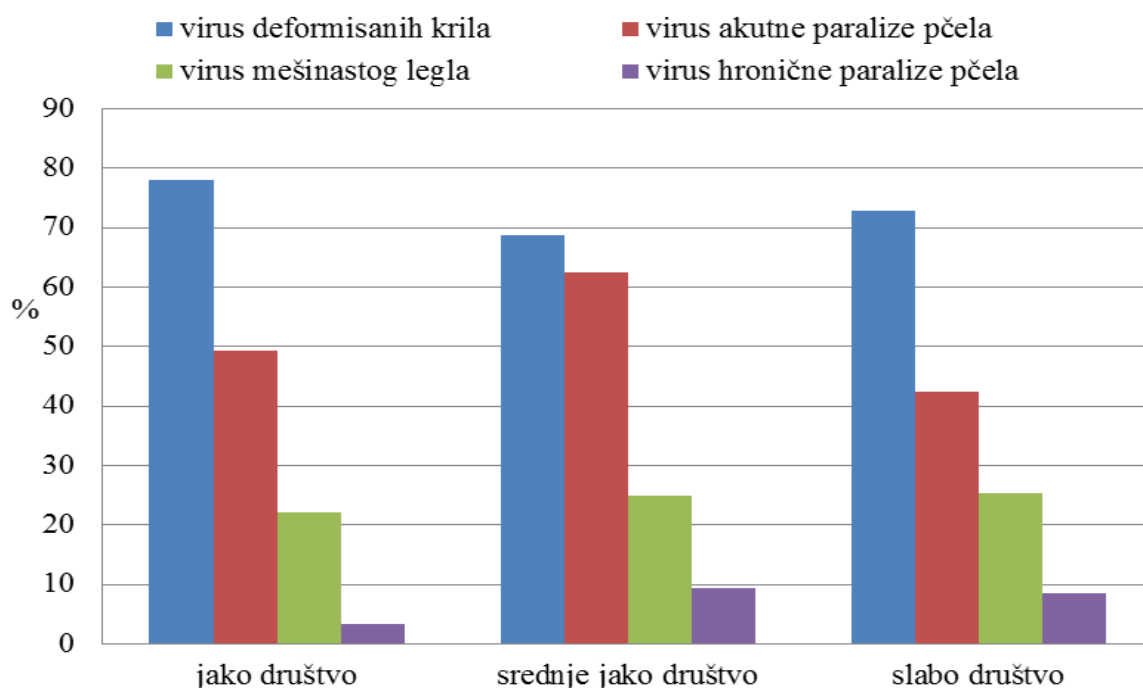


Tabela 28 - Zastupljenost virusa deformisanih krila u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Virus deformisanih krila n=150	odsutno n=39	n	13	10	16	0,613†
		%	22	31,2	27,1	
	prisutno n=111	n	46	22	43	
		%	78	68,8	72,9	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Zastupljenost DWV (Tabela 28) je bila najveća (46 uzoraka, 78 %) u jakim društvima, a najmanja u srednje jakim društvima (22 uzorka, 68,8 % srednje jakih društava). Statističkom obradom rezultata (χ^2 test) nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u pojavi ovog virusa u odnosu na jačinu pčelinjeg društva.

Tabela 29 - Zastupljenost virusa akutne paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Virus akutne paralize pčela n=150	odsutno n=76	n	30	12	34	0,186†
		%	50,8	37,5	57,6	
	prisutno n=74	n	29	20	25	
		%	49,2	62,5	42,4	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Virus akutne paralize pčela (Tabela 29) je najčešće detektovan u srednje jakim društvima (20 uzoraka, 62,5 % srednje jakih društava), a najređe u slabim društvima (25 uzoraka, 42,4 % slabih društava). Statističkom obradom rezultata (χ^2 test) nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u pojavi ovog virusa u odnosu na jačinu pčelinjeg društva.

Tabela 30 - Zastupljenost virusa mešinastog legla u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Virus mešinastog legla n=150	odsutno n=114	n	46	24	44	0,901†
		%	78	75	74,6	
	prisutno n=36	n	13	8	15	
		%	22	25	25,4	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Virus mešinastog legla (Tabela 30) je najučestaliji u slabim društvima (15 uzoraka, 25,4 % slabih društava), a najmanje učestao u jakim društvima (13 uzoraka, 22 % jakih društava). Statističkom obradom rezultata (χ^2 test) nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u pojavi ovog virusa u odnosu na jačinu pčelinjeg društva.

Tabela 31 - Zastupljenost virusa hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Virus hronične paralize pčela n=150	odsutno n=140	n	57	29	54	0,426†
		%	96,6	90,6	91,5	
	prisutno n=10	n	2	3	5	
		%	3,4	9,4	8,5	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Infekcija sa CBPV (Tabela 31) je najfrekventnija kod srednje jakih društava (3 uzorka, 9,4 % srednje jakih društava), a najmanje frekventna kod jakih društava (2 uzorka, 3,4 % jakih društava). Statističkom obradom rezultata (χ^2 test) nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u pojavi ovog virusa u odnosu na jačinu pčelinjeg društva.

Tabela 32 - Zastupljenost ispitujućih virusa pčela u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Prisustvo virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Bilo koji od ispitivanih virusa n=150	odsutno n=131	n	7	4	8	0,962†
		%	11,9	12,5	13,6	
	prisutno n=19	n	52	28	51	
		%	88,1	87,5	86,4	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

Učestalost pojave bilo kog od ispitivanih virusa (Tabela 32) je najviša kod jakih društava (52 uzorka, 88,1 % jakih društava), a najniža kod slabih društava (51 uzorak, 86,4 % slabih društava). Statističkom obradom rezultata (χ^2 test) nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u pojavi bilo kojeg ispitivanog virusa u odnosu na jačinu pčelinjeg društva.

5.2.4. Prisustvo i zastupljenost mešovutih virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava

Distribucija mešovutih virusnih infekcija sa dva virusa u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava u kojima je kao uzročnik prisutan DWV, prikazana je u Tabeli 33.

Tabela 33 - Zastupljenost virusa deformisanih krila u mešovitim infekcijama sa virusom akutne paralize pčela ili virusom mešinastog legla ili virusom hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Virus deformisanih krila + Virus akutne paralize pčela n=150	odsutno n=104	n	39	20	45	0,316 ^a
		%	66,1	62,5	76,3	
	prisutno n=46	n	20	12	14	
		%	33,9	37,5	23,7	
Virus deformisanih krila + Virus mešinastog legla n=150	odsutno n=139	n	53	31	55	0,532 ^a
		%	89,8	96,9	93,2	
	prisutno n=11	n	6	1	4	
		%	10,2	3,1	6,8	
Virus deformisanih krila + Virus hronične paralize pčela n=150	odsutno n=144	n	57	30	57	0,765 ^a
		%	96,6	93,8	96,6	
	prisutno n=6	n	2	2	2	
		%	3,4	6,2	3,4	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Kombinacija DWV i ABPV se kao najčešća javila u 37,5 % uzoraka poreklom iz srednje jakih društava, dok je najmanja učestalost ove kombinacije zabeležena u 23,7 % uzoraka poreklom iz slabih društava. Primenom χ^2 testa nije zabeležena statistička značajnost u pojavi ove kombinacije virusa između posmatranih regiona. DWV zajedno sa SBV se najčešće pojavljivao u uzorcima poreklom iz jakih društava (10,2 %), dok je ova kombinacija virusa bila najmanje učestala u uzorcima poreklom iz srednje jakih društava (3,1 %). DWV u kombinaciji sa CBPV se najčešće pojavljivao u uzorcima poreklom iz srednje jakih društava, za

razliku od jakih i slabih društava gde je zabeležena ista učestalost pojave ove kombinacije virusa (3,4 %). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u distribuciji pomenute dve kombinacije virusa u odnosu na jačinu društva.

Distribucija mešoviti virusnih infekcija sa dva virusa u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava u kojima je kao uzročnik prisutan ABPV, prikazana je u Tabeli 34.

Tabela 34 - Zastupljenost virusa akutne paralize pčela u mešovitim infekcijama sa virusom mešinastog legla ili virusom hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Virus akutne paralize pčela + Virus mešinastog legla n=150	odsutno n=139	n	57	27	55	0,111 ^a
		%	96,6	84,4	93,2	
	prisutno n=11	n	2	5	4	
		%	3,4	15,6	6,8	
Virus akutne paralize pčela + Virus hronične paralize pčela n=150	odsutno n=150	n	59	32	59	#
		%	100	100	100	
	prisutno n=0	n	0	0	0	
		%	0	0	0	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija; #Nije moguće utvrditi statističku značajnost

Pored već pomenute kombinacije ABPV i DWV (Tabela 33), ABPV se u kombinaciji sa SBV najčešće javljao u uzrocima poreklom iz srednje jakih društava (15,6 %), dok je prisustvo ove kombinacije virusa najređe beleženo u jakim društvima (3,4 %). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u distribuciji ove kombinacije virusa u odnosu na jačinu društva. ABPV u kombinaciji sa CBPV nije zabeležen ni u jednom ispitujućem uzorku. CBPV u kombinaciji sa SBV, takođe nije utvrđen ni u jednom ispitujućem uzorku (Tabela 35).

Tabela 35 - Zastupljenost virusa hronične paralize pčela u mešovitoj infekciji sa virusom mešinastog legla u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Virus hronične paralize pčela + Virus mešinastog legla n=150	odsutno n=150	n	59	32	59	#
		%	100	100	100	
	prisutno n=0	n	0	0	0	
		%	0	0	0	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija; #Nije moguće utvrditi statističku značajnost

Tabela 36 - Zastupljenost virusa deformisanih krila u mešovitoj infekciji sa virusom akutne paralize pčela i virusom mešinastog legla u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Virus deformisanih krila + Virus akutne paralize pčela + Virus mešinastog legla n=150	odsutno n=138	n	55	28	55	0,707 ^a
		%	93,2	87,5	93,2	
	prisutno n=12	n	4	4	4	
		%	6,8	12,5	6,8	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Mešovite virusne infekcije u kojima je utvrđeno prisustvo DWV, ABPV i SBV (Tabela 36) su zabeležene u 12,5 % uzoraka poreklom iz srednje jakih društava, dok se pomenuta kombinacija tri virusa javila u 6,8 % uzoraka poreklom iz jakih i slabih društava. Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u distribuciji ove kombinacije virusa u odnosu na jačinu društva.

Tabela 37 - Zastupljenost virusa deformisanih krila u mešovitoj infekciji sa virusom akutne paralize pčela i virusom hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
Virus deformisanih krila + Virus akutne paralize pčela + Virus hronične paralize pčela n=150	odsutno n=147	n	59	32	56	0,123 ^a
		%	100	100	94,9	
	prisutno n=3	n	0	0	3	
		%	0	0	5.1	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Kombinacija DWV - ABPV - CBPV (Tabela 37) je utvrđena samo u 5,1 % uzoraka poreklom iz slabih društava. Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u distribuciji ove kombinacije virusa u odnosu na jačinu društva.

Tabela 38 - Zastupljenost mešovityh infekcija sa virusom deformisanih krila, virusom akutne paralize pčela, virusom mešinastog legla i virusom hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Vrsta virusa			Jačina pčelinjeg društva			p*
			Jako n=59	Srednje jako n=32	Slabo n=59	
virus deformisanih krila + virus akutne paralize pčela + virus mešinastog legla + virus hronične paralize n=150	odsutno n=149	n	59	32	58	1,000 ^a
		%	100	100	98,3	
	prisutno n=1	n	0	0	1	
		%	0	0	1,7	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Istovremeno prisustvo sva četiri ispitujuća virusa (Tabela 38) je utvrđeno samo u 1 uzorku pčela poreklom iz slabih društava (1 % od broja uzoraka iz slabih društava). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji ove kombinacije virusa.

5.2.5. Uticaj jačine pčelinjeg društva na intenzitet virusne infekcije

Intenzitet infekcije izazvane sa DWV, ABPV, SBV i CBPV je iskazan kroz visinu Ct (*eng.* cycle threshold) vrednosti, odnosno broj ciklusa u kome signal fluorescencije, tokom real time RT-PCR prelazi liniju praga detekcije. Visina Ct vrednosti je pokazatelj koji je obrnuto proporcionalan količini detektovane

virusne RNK u svakom ispitujućem uzorku. Drugim rečima, što je Ct vrednost niža, odnosno, što je broj ciklusa u kome fluorescencija prelazi prag detekcije niži, to je količina detektovane virusne RNK u uzorku veća. Veća količina virusne RNK ukazuje na veću opterećenost čitavog društva detektovanim virusom/virusima u ispitujućem uzorku.

Tabela 39 - Rezultati testiranja uticaja jačine društva na visinu Ct vrednosti identifikovanog virusa deformisanih krila u uzorcima pčela

Vrsta virusa	Jačina društva	Ct vrednost $\bar{X} \pm Sd$	ANOVA	p*
Virus deformisanih krila	Jako	32,17±4,69	0,230	0,795
	Srednje jako	31,26±5,45		
	Slabo	31,72±5,83		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Posmatrajući prosečnu visinu Ct vrednosti za DWV (Tabela 39), u jakim društvima u kojima je utvrđeno prisustvo RNK ovog virusa prosečna Ct vrednost je iznosila 32,17±4,69, u srednje jakim društvima 31,26±5,45, dok se u slabim društvima zadržala na 31,72±5,83. Primenom ANOVA testa, utvrđeno je da između uzoraka koji pripadaju jakim, srednje jakim i slabim društvima, a u kojima je utvrđeno prisustvo RNK ovog virusa, ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,795$) u visini Ct vrednosti.

Tabela 40 - Rezultati testiranja uticaja jačine društva na visinu Ct vrednosti identifikovanog virusa akutne paralize pčela u uzorcima pčela

Vrsta virusa	Jačina društva	Ct vrednost $\bar{X} \pm Sd$	ANOVA	p*
Virus akutne paralize pčela	Jako	29,76±4,21	1,095	0,340
	Srednje jako	31,55±4,43		
	Slabo	29,82±5,31		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Posmatrajući prosečnu visinu Ct vrednosti za ABPV (Tabela 40) u jakim društvima u kojima je utvrđeno prisustvo RNK ovog virusa prosečna Ct vrednost je iznosila $29,76 \pm 4,21$, u srednje jakim društvima $31,55 \pm 4,43$, dok se u slabim društvima zadržala na $29,82 \pm 5,31$. Primenom ANOVA testa, utvrđeno je da između uzoraka koji pripadaju jakim, srednje jakim i slabim društvima, a u kojima je utvrđeno prisustvo RNK ovog virusa, ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,340$) u visini Ct vrednosti.

Tabela 41 - Rezultati testiranja uticaja jačine društva na visinu Ct vrednosti identifikovanog virusa mešinastog legla u uzorcima pčela

Vrsta virusa	Jačina društva	Ct vrednost $\bar{X} \pm Sd$	ANOVA	p*
Virus mešinastog legla	Jako	$30,67 \pm 7,68$	1,278	0,292
	Srednje jako	$32,37 \pm 2,26$		
	Slabo	$33,97 \pm 4,14$		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Posmatrajući prosečnu visinu Ct vrednosti za SBV (Tabela 41), u jakim društvima u kojima je utvrđeno prisustvo RNK ovog virusa prosečna Ct vrednost je iznosila $30,67 \pm 7,68$, u srednje jakim društvima $32,37 \pm 2,26$, dok se u slabim društvima zadržala na $33,97 \pm 4,14$. Primenom ANOVA testa, utvrđeno je da između uzoraka koji pripadaju jakim, srednje jakim i slabim društvima, a u kojima je utvrđeno prisustvo RNK ovog virusa, ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,292$) u visini Ct vrednosti.

Tabela 42 – Rezultati testiranja uticaja jačine društva na visinu Ct vrednosti identifikovanog virusa hronične paralize pčela u uzorcima pčela

Vrsta virusa	Jačina društva	Ct vrednost $\bar{X} \pm Sd$	ANOVA	p*
Virus hronične paralize pčela	Jako	31,26±1,09	0,319	0,737
	Srednje jako	29,45±2,49		
	Slabo	28,16±5,92		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Posmatrajući prosečnu visinu Ct vrednosti za CBPV (Tabela 42), u jakim društvima u kojima je utvrđeno prisustvo RNK ovog virusa prosečna Ct vrednost je iznosila 31,26±1,09, u srednje jakim društvima 29,45±2,49, dok se u slabim društvima zadržala na 28,16±5,92. Primenom ANOVA testa, utvrđeno je da između uzoraka koji pripadaju jakim, srednje jakim i slabim društvima, a u kojima je utvrđeno prisustvo RNK ovog virusa, ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,737$) u visini Ct vrednosti.

Rezultati testiranja po rangovima primenom Post Hoc Tukey HSD testa (Tabele 43 - 46), pokazuju odsustvo statistički značajne razlike u visini prosečne Ct vrednosti za sve ispitujuće viruse prilikom poređenja pozitivnih uzoraka iz jakih i srednje jakih, jakih i slabih, i srednje jakih i slabih društava.

Tabela 43 – Rezultati testiranja po rangovima uticaja jačine društva na visinu Ct vrednosti identifikovanog virusa deformisanih krila u uzorcima pčela

Vrsta virusa	Jačina društva	Ct vrednost $\bar{X} \pm Sd$	p*
Virus deformisanih krila	Jako	32,17±4,69	0,786¥
	Srednje jako	31,26±5,45	
	Jako	32,17±4,69	0,918¥
	Slabo	31,72±5,83	
	Srednje jako	31,26±5,45	0,940¥
	Slabo	31,72±5,83	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; ¥ Post Hoc Tukey HSD

Tabela 44 – Rezultati testiranja po rangovima uticaja jačine društva na visinu Ct vrednosti identifikovanog virusa akutne paralize pčela u uzorcima pčela

Vrsta virusa	Jačina društva	Ct vrednost $\bar{X} \pm Sd$	p*
Virus akutne paralize pčela	Jako	29,76±4,21	0,371¥
	Srednje jako	31,55±4,43	
	Jako	29,76±4,21	0,999¥
	Slabo	29,82±5,31	
	Srednje jako	31,55±4,43	0,411¥
	Slabo	29,82±5,31	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; ¥ Post Hoc Tukey HSD

Tabela 45 – Rezultati testiranja po rangovima uticaja jačine društva na visinu Ct vrednosti identifikovanog virusa mešinastog legla u uzorcima pčela

Vrsta virusa	Jačina društva	Ct vrednost $\bar{X} \pm Sd$	p*
Virus mešinastog legla	Jako	30,67±7,68	0,769
	Srednje jako	32,37±2,26	
	Jako	30,67±7,68	0,261
	Slabo	33,97±4,14	
	Srednje jako	32,37±2,26	0,781
	Slabo	33,97±4,14	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; ¥ Post Hoc Tukey HSD

Tabela 46- Rezultati testiranja po rangovima uticaja jačine društva na visinu Ct vrednosti identifikovanog virusa hronične paralize pčela u uzorcima pčela

Vrsta virusa	Jačina društva	Ct vrednost $\bar{X} \pm Sd$	p*
Virus hronične paralize pčela	Jako	31,26±1,09	0,926
	Srednje jako	29,45±2,49	
	Jako	31,26±1,09	0,721
	Slabo	28,16±5,92	
	Srednje jako	29,45±2,49	0,781
	Slabo	28,16±5,92	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; ¥ Post Hoc Tukey HSD

5.2.6. Uticaj jačine pčelinjeg društva na odnos visine Ct vrednosti virus deformisanih krila / virus akutne paralize pčela u mešovitim infekcijama

Ispitivanje uticaja jačine pčelinjeg društva na odnos DWV i ABPV u uzorcima u kojima je utvrđeno istovremeno prisustvo ova dva virusa izvršeno je kroz poređenje količnika njihovih Ct vrednosti (Tabela 47). Prosečna vrednost za količnik Ct vrednosti za ovu kombinaciju virusa kod jakih društava je iznosila $1,04 \pm 0,15$, kod srednje jakih $1,03 \pm 0,20$, dok je kod slabih društava zabeležena vrednost $1,04 \pm 0,20$. Primenom ANOVA testiranja, nije utvrđeno postojanje statističke značajnosti ($p=0,994$) u prosečnoj vrednosti za količnik Ct vrednosti ova dva virusa između jakih, srednje jakih i slabih društava.

Tabela 47 – Rezultati testiranja uticaja jačine društva na odnos visine Ct vrednosti virusa deformisanih krila i virusa akutne paralize pčela u uzorcima pčela u kojima je identifikovan ovaj tip mešovite infekcije

Odnos Ct vrednosti virusa	Jačina društva	Količnik Ct vrednosti $\bar{X} \pm Sd$	ANOVA	p*
Virus deformisanih krila / Virus akutne paralize pčela	Jako	1,04±0,15	0,006	0,994
	Srednje jako	1,03±0,20		
	Slabo	1,04±0,20		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Tabela 48 – Rezultati testiranja po rangovima uticaja jačine društva na odnos visine Ct vrednosti virusa deformisanih krila i virusa akutne paralize pčela u uzorcima pčela u kojima je identifikovan ovaj tip mešovite infekcije

Vrsta virusa	Jačina društva	Količnik Ct vrednosti $\bar{X} \pm Sd$	p*
Virus deformisanih krila	Jako	1,04±0,15	0,997¥
	Srednje jako	1,03±0,20	
Virus akutne paralize pčela	Jako	1,04±0,15	0,999¥
	Slabo	1,04±0,20	
	Srednje jako	1,03±0,20	0,993¥
	Slabo	1,04±0,20	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; ¥ Post Hoc Tukey HSD

Rezultati testiranja po rangovima primenom Post Hoc Tukey HSD testa (Tabela 48), pokazuju odsustvo statistički značajne razlike u prosečnoj vrednosti za količnik Ct vrednosti DWV/ABPV između uzoraka iz jakih i srednje jakih, jakih i slabih, i srednje jakih i slabih društava.

5.2.7. Uticaj jačine pčelinjeg društva na odnos visine Ct vrednosti virus deformisanih krila / virus mešinastog legla u mešovitim infekcijama

Ispitivanje uticaja jačine pčelinjeg društva na odnos DWV i SBV u uzorcima u kojima je utvrđeno istovremeno prisustvo ova dva virusa izvršeno je kroz poređenje količnika njihovih Ct vrednosti (Tabela 49).

Tabela 49 – Rezultati testiranja uticaja jačine društva na odnos visine Ct vrednosti virusa deformisanih krila i virusa mešinastog legla u uzorcima pčela u kojima je identifikovan ovaj tip mešovite infekcije

Odnos Ct vrednosti virusa	Jačina društva	Količnik Ct vrednosti Med (min-max)	Kurskal-Wallis test	p*
Virus deformisanih krila / Virus mešinastog legla	Jako	1,12 (0,94-2,48)	4,744	0,093
	Srednje jako	1,02 (0,55-1,10)		
	Slabo	0,99 (0,74-1,28)		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Medijana za količnik Ct vrednosti za ovu kombinaciju virusa kod jakih društava je iznosila 1,12, kod srednje jakih 1,02, dok je kod slabih društava zabeležena vrednost 0,99. Primenom Kurskal-Wallis testa, nije utvrđeno postojanje statističke značajnosti ($p=0,093$) u vrednosti medijana za količnik Ct vrednosti ova dva virusa između jakih, srednje jakih i slabih društava.

Tabela 50 – Rezultati testiranja po rangovima uticaja jačine društva na odnos visine Ct vrednosti virusa deformisanih krila i virusa mešinastog legla u uzorcima pčela u kojima je identifikovan ovaj tip mešovite infekcije

Odnos Ct vrednosti virusa	Jačina društva	Količnik Ct vrednosti Med (min-max)	Mann-Whitney test	p*
Virus deformisanih krila	Jako	1,12 (0,94-2,48)	8,000	0,090
	Srednje jako	1,02 (0,55-1,10)		
/ Virus mešinastog legla	Jako	1,12 (0,94-2,48)	19,000	0,062
	Slabo	0,99 (0,74-1,28)		
	Srednje jako	1,02 (0,55-1,10)	16,000	1,000
	Slabo	0,99 (0,74-1,28)		

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Rezultati testiranja po rangovima primenom Mann-Whitney testa (Tabela 50), pokazuju odsustvo statistički značajne razlike u vrednosti medijane za količnik Ct vrednosti DWV/SBV između uzoraka iz jakih i srednje jakih, jakih i slabih, i srednje jakih i slabih društava.

5.3. PRISUSTVO I ZASTUPLJENOST MEŠOVITIH (MIKROSPORIDIJALNO-VIRUSNIH) INFEKCIJA U UZORCIMA PČELA

Najčešće identifikovani pojedinačni virus u mešovitim (mikrosporidijalno-virusnim) infekcijama na teritoriji Srbije (Grafikon 9, Tabela 51) je DWV sa učešćem od 77,14 %. Za njim slede SBV sa 11,13 %, ABPV sa 8,57 %, dok najmanju frekvencu pojavljivanja u mešovitim infekcijama beleži CBPV sa 2,86 %.

Grafikon 9 - Najčešće identifikovani pojedinačni virusi u mešovitim (mikrosporidijalno-virusnim) infekcijama na teritoriji Srbije

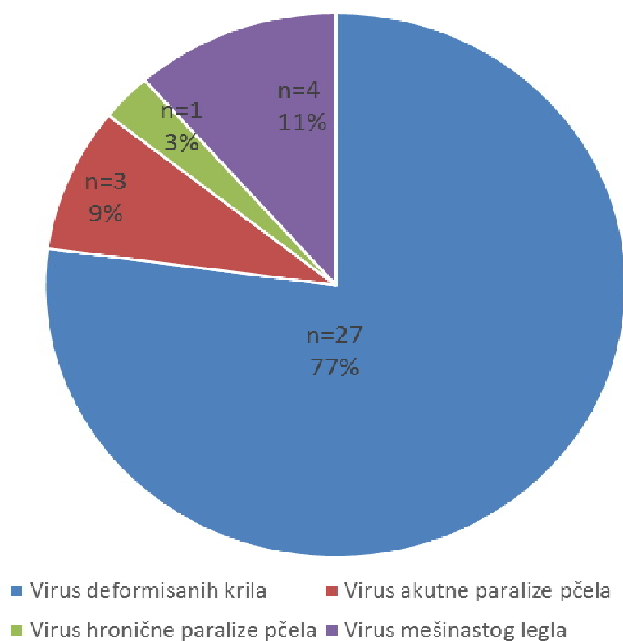


Tabela 51 - Najčešće identifikovani pojedinačni virusi u mešovitim (mikrosporidijalno-virusnim) infekcijama na teritoriji Srbije

Tip virusa	n	%
Virus deformisanih krila	27	77,14
Virus mešinastog legla	4	11,43
Virus akutne paralize pčela	3	8,57
Virus hronične paralize pčela	1	2,86

Najčešće identifikovana kombinacija virusa u mešovitim (mikrosporidijalno-virusnim) infekcijama na teritoriji Srbije (Tabela 52) je DWV + ABPV sa učešćem

od 48,33 %. Zatim slede kombinacije: ABPV + SBV sa 15 %, DWV + ABPV + CBPV i DWV + ABPV + SBV sa po 10 %, DWV + SBV sa 8,33 %, DWV + CBPV sa 6,67 %, dok najmanju frekvencu pojavljivanja u mešovitim infekcijama beleži kombinacija sva četiri ispitivana virusa sa 1,67 %.

Tabela 52 - Najčešće identifikovane kombinacije virusa u mešovitim (mikrosporidijalno-virusnim) infekcijama na teritoriji Srbije

Kombinacija virusa	n	%
Virus deformisanih krila + Virus akutne paralize pčela	29	48,33
Virus akutne paralize pčela + Virus mešinastog legla	9	15,0
Virus deformisanih krila + Virus akutne paralize pčela + Virus hronične paralize pčela	6	10,0
Virus deformisanih krila + Virus akutne paralize pčela + Virus mešinastog legla	6	10,0
Virus deformisanih krila + Virus mešinastog legla	5	8,33
Virus deformisanih krila + Virus hronične paralize pčela	4	6,67
Sva 4 ispitivana virusa	1	1,67

5.3.1. Prisustvo i zastupljenost mešovityh (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Distribucija uzoraka poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije u kojima je utvrđeno prisustvo mešovite (mikrosporidijalno-virusne), samo virusne i samo mikrosporidijalne infekcije, kao i odsustvo infekcije, prikazana je u Tabeli 53.

Tabela 53 - Zastupljenost mešovityh (mikrosporidijalno-virusnih), samo virusnih i samo mikrosporidijalnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Region	Tip infekcije, n (%)										p*
	Bez infekcije		1 vrsta virusa + <i>N. ceranae</i>		Više vrsta virusa + <i>N. ceranae</i>		Samo <i>N. ceranae</i>		1 vrsta virusa bez <i>N. ceranae</i>		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Severna Srbija n=44	0	0	9	20.5	33	75	1	2.3	1	2.3	<0,001 ^a
Južna Srbija n=21	2	9.5	2	9.5	14	66.7	3	14.3	0	0	
Istočna Srbija n=25	1	4	5	20	15	60	1	4	3	12	
Zapadna Srbija n=30	2	6.7	4	13.3	17	56.7	6	20	1	3.3	
Centralna Srbija n=30	0	0	15	50	5	16.7	3	10	7	23.3	
Ukupno n=150	5	3.3	35	23.3	84	56	14	9.3	12	8	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test; ^aMonte Carlo simulacija

Uzorci u kojima nije zabeleženo prisustvo nukleinskih kiselina ispitivanih uzročnika bolesti bili su najzastupljeniji u južnoj Srbiji sa 9,5 %. Nasuprot tome,

u severnoj i zapadnoj Srbiji nije zabeležen ni jedan uzorak slobodan od ispitivanih mikrosporidija i virusa. Mešovita infekcija sa jednom vrstom virusa i *N. ceranae* je najfrekventnija u uzorcima iz centralne Srbije (50 %), a najmanje prisutna u uzorcima iz zapadne Srbije (13,3 %). Uzorci u kojima je utvrđeno istovremeno prisustvo više vrsta virusa i *N. ceranae* su najčešće poticali iz društava severne Srbije (75 %), a najmanje iz centralne Srbije (16,7 %). Prisustvo samo *N. ceranae* je najčešće detektovano u zapadnoj Srbiji (20 %), a najmanje u severnoj Srbiji (2,3 %). Infekcija izazvana samo jednom vrstom virusa je najčešće beležena u centralnoj Srbiji (23,3 %), a najređe u severnoj Srbiji (2,3 %). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija, utvrđeno je prisustvo statističke značajnosti ($p < 0,001$) u regionalnoj distribuciji mešovityh infekcija.

Uporedni prikaz zastupljenosti mešovityh (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija sa jednom i više vrsta virusa prikazana je u Tabeli 54. Uzorci u kojima je zabeleženo istovremeno prisustvo jedne vrste virusa i *N. ceranae* su najčešće poticali iz društava centralne Srbije (75 %), dok je prisustvo više od jedne vrste virusa zajedno sa *N. ceranae* najčešće detektovano u uzorcima južne Srbije (87,5 %). Posmatrajući ukupan broj uzoraka sa pojedinačnom i složenom virusnom infekcijom u okviru mešovite infekcije, u znatno više uzoraka je zabeleženo prisustvo više vrsta virusa (70,6 %), nego jedne vrste virusa (29,4 %). Primenom χ^2 testa, utvrđeno je prisustvo statistički značajne razlike ($p < 0,001$) u regionalnoj distribuciji mešovityh infekcija sa jednom i više vrsta virusa.

Tabela 54 – Zastupljenost mešovitih infekcija u kojima je identifikovana jedna ili više vrsta virusa u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije

Region	Tip infekcije, n (%)				p*
	1 vrsta virusa + <i>N. ceranae</i>		Više vrsta virusa + <i>N. ceranae</i>		
	n	%	n	%	
Severna Srbija n=42	9	21,4	33	78,6	<0,001†
Južna Srbija n=16	2	12,5	14	87,5	
Istočna Srbija n=20	5	25	15	75	
Zapadna Srbija n=21	4	19	17	81	
Centralna Srbija n=20	15	75	5	25	
Ukupno n=119	35	29,4	84	70,6	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; † χ^2 test

5.3.2. Prisustvo i zastupljenost mešovitih (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava

Distribucija uzoraka poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava u kojima je utvrđeno prisustvo mešovite (mikrosporidijalno-virusne), samo virusne i samo mikrosporidijalne infekcije, kao i odsustvo infekcije, prikazana je u Tabeli 55.

Tabela 55 - Zastupljenost mešovitih (mikrosporidijalno-virusnih), samo virusnih i samo mikrosporidijalnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih društava

Jačina pčelinjeg društva	Tip infekcije, n (%)										p*
	Bez infekcije		1 vrsta virusa + <i>N. ceranae</i>		Više vrsta virusa + <i>N. ceranae</i>		Samo <i>N. ceranae</i>		1 vrsta virusa + odsustvo <i>N. ceranae</i>		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Jako n=59	2	3.4	14	23.7	34	57.7	5	8.5	4	6.8	0,902 ^a
Srednje jako n=32	1	3.1	4	12.5	21	65.6	3	9.4	3	9.4	
Slabo n=59	2	3.4	17	28.8	29	49.1	6	10.2	5	8.5	
Ukupno n=150	5	3.3	35	23.3	104	56	14	9.3	12	8	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$; ^aMonte Carlo simulacija

Uzorci u kojima nije zabeleženo prisustvo nukleinskih kiselina ispitivanih uzročnika bolesti imali su istu učestalost pojavljivanja u jakim i slabim društvima (3,4 %), dok je u srednje jakim društvima ona iznosila 3,1 %. Mešovita infekcija sa jednom vrstom virusa i *N. ceranae* je najfrekventnija u uzorcima iz slabih društava (28,8 %), a najmanje prisutna u srednje jakim uzorcima (12,5 %). Uzorci u kojima je utvrđeno istovremeno prisustvo više vrsta i virusa i *N. ceranae* su najčešće poticali iz srednje jakih (65,6 %), a najmanje iz slabih društava (49,1 %). Prisustvo samo *N. ceranae* je najčešće detektovano u slabim (10,2 %), a najmanje u jakim društvima (8,5 %). Infekcija izazvana samo jednom vrstom virusa je najčešće beležena u srednje jakim (9,4 %), a najređe u jakim društvima (6,8 %). Primenom χ^2 testa, uz upotrebu Monte Carlo simulacije zbog malih učestalosti i nemogućnosti sažimanja susednih kategorija,

nije utvrđeno prisustvo statistički značajnog uticaja jačine pčelinjeg društva na pojavu i karakter mešovutih infekcija.

Uporedni prikaz zastupljenosti mešovutih (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija sa jednom i više vrsta virusa prikazana je u Tabeli 56.

Tabela 56 – Zastupljenost mešovutih infekcija u kojima je identifikovana jedna ili više vrsta virusa kod jakih, srednje jakih i slabih društava

Jačina pčelinjeg društva	Tip infekcije, n (%)				p*
	1 vrsta virusa + <i>N. ceranae</i>		Više vrsta virusa + <i>N. ceranae</i>		
	n	%	n	%	
Jako društvo n=46	14	29,2	34	70,8	0,180
Srednje jako n=25	4	16	21	84	
Slabo n=48	17	37	29	63,3	
Ukupno n=119	35	29,4	84	70,6	

*za nivo značajnosti $\alpha \leq 0,05$

Uzorci u kojima je zabeleženo istovremeno prisustvo jedne vrste virusa i *N. ceranae* su najčešće poticali iz jakih društava (29,2 %), dok je prisustvo više od jedne vrste virusa zajedno sa *N. ceranae* najčešće detektovano u uzorcima poreklom iz srednje jakih društava (84 %). Posmatrajući ukupan broj uzoraka sa pojedinačnom i složenom virusnom infekcijom u okviru mešovite infekcije, u znatno više uzoraka je zabeleženo prisustvo više vrsta virusa (70,6 %), nego jedne vrste virusa (29,4 %). Primenom χ^2 testa, nije utvrđeno prisustvo statistički značajnog uticaja jačine pčelinjeg društva na pojavu mešovutih infekcija sa jednom i više vrsta virusa.

5.4. GENETSKA IDENTIFIKACIJA I FILOGENETSKA ANALIZA VIRUSA PČELA IZ SRBIJE

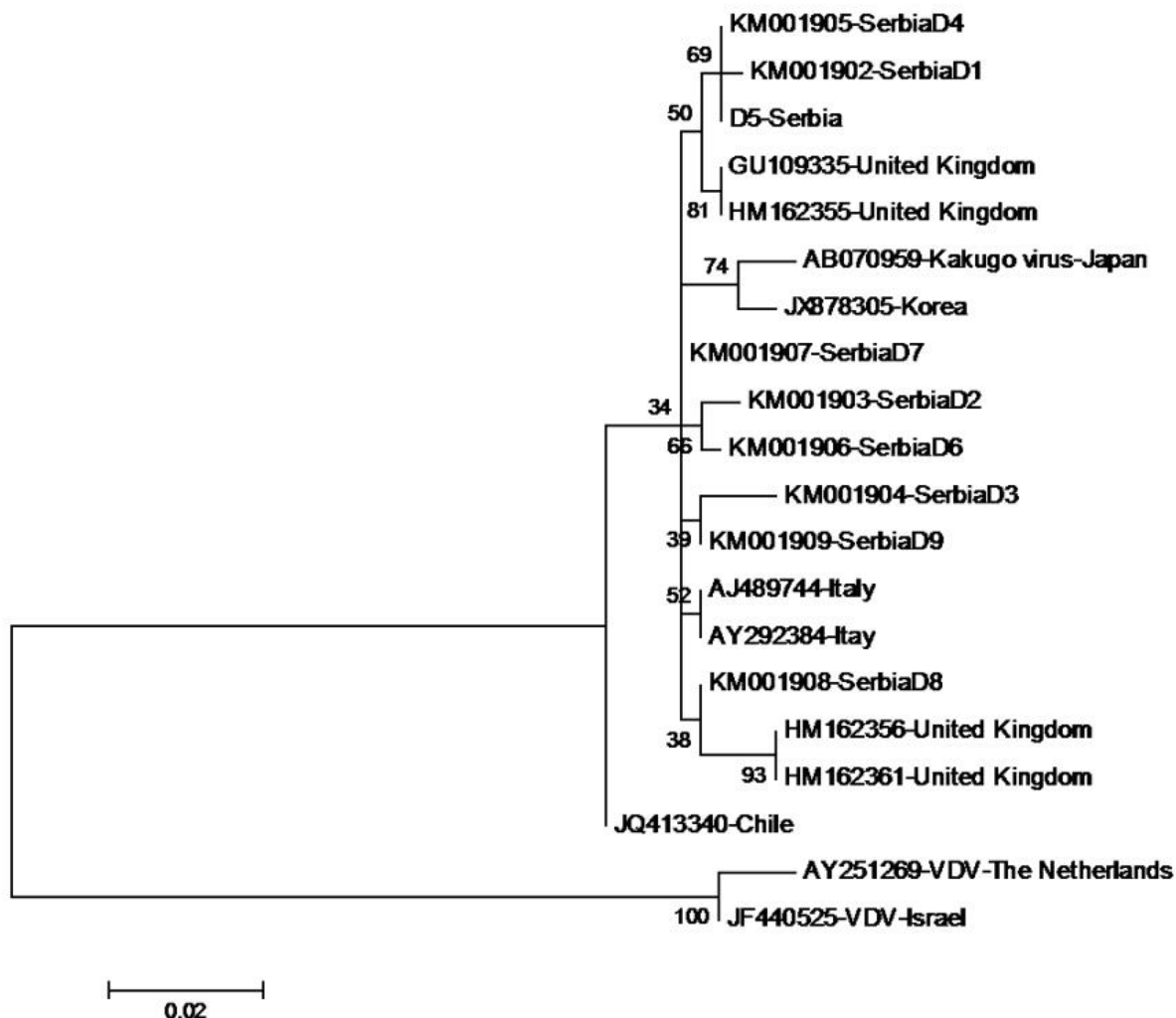
Nakon potvrde prisustva RNK virusa deformisanih krila, virusa akutne paralize pčela, virusa mešinastog legla i virusa hronične paralize pčela u uzorcima pčela poreklom iz Srbije primenom real-time RT-PCR analiza, izvršeno je umnožavanje parcijalnih nukleotidnih sekvenci odabranih izolata. Za sekvenciranje je odabrano 9 RNK izolata pozitivnih na prisustvo RNK DWV, 2 RNK izolata pozitivna na prisustvo RNK ABPV, 2 RNK izolata pozitivna na prisustvo RNK CBPV i 3 RNK izolata pozitivna na prisustvo RNK SBV.

Filogenetska analiza 9 RNK izolata DWV iz Srbije se zasnivala na poređenju parcijalne nukleotidne sekvence poliprotein gena dugačke 420 baznih parova sa sekvencama deponovanim u genskoj bazi. „BLAST“ pretragom je potvrđena sličnost od 98 - 99 % sa sekvencama ovog virusa iz genske baze. Nakon molekularne identifikacije, prijavljene su sekvence 8 RNK izolata i nakon provere deponovane u gensku bazi podataka pod sledećim oznakama:

- Serbia D1 - KM001902
- Serbia D2 - KM001903
- Serbia D3 - KM001904
- Serbia D4 - KM001905
- Serbia D6 - KM001906
- Serbia D7 - KM001907
- Serbia D8 - KM001908
- Serbia D9 - KM001909

Primenom kompjuterskog programa MEGA 6 i Maximum Likelihood analize sekvenci, utvrđena je genetska sličnost sekvenci iz Srbije sa sekvencama DWV iz Evrope i Azije (Grafikon 9). Kao spoljašnja grupa za upoređivanje uzete su sekvence Varroa-destroyer virusa (VDV) deponovane u genskoj bazi pod oznakama AY251269 i JF440525.

Grafikon 9 – Filogenetska analiza parcijalne nukleotidne sekvence poliprotein gena virusa deformisanih krila iz Srbije*.



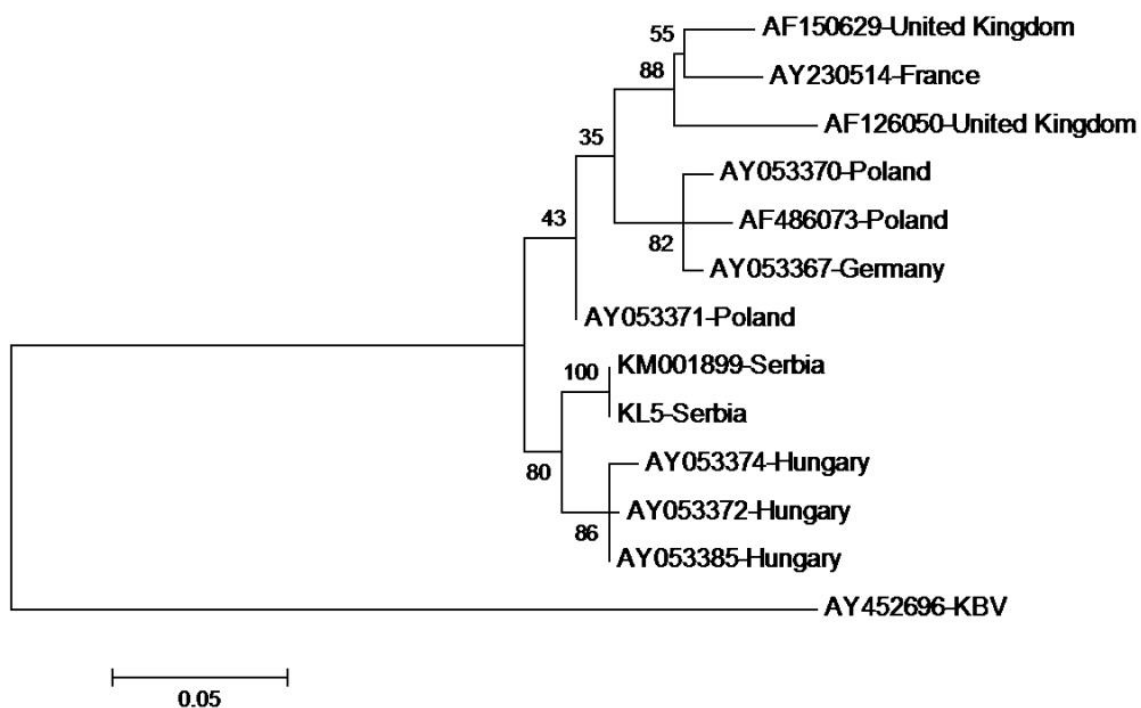
* Brojevi na čvorovima filogenetskog stabla predstavljaju procentualne vrednosti dobijene nakon analize samoučitavanjem (eng. *bootstrap*) nakon 1000 ponavljanja.

Na filogenetskom stablu se može primetiti evolutivna udaljenost sekvenci DWV poreklom iz Čilea (JQ413340), dok su ostale analizirane sekvence u okviru iste filogenetske grupe. Sekvence iz Srbije su grupisane u četiri grupe: Serbia D1, Serbia D4 i D5 su jednoj grupi, Serbia D2 i Serbia D6 u drugoj, Serbia D3 i Serbia

D9 formiraju treću, Serbia D8 je grupisan sa sekvencama iz Velike Britanije (HM162356 i HM162361), dok se Serbia D7 nalazi u ancestralnoj poziciji.

Nakon molekularne identifikacije dva RNK izolata ABPV iz Srbije, zbog njihovog apsolutnog poklapanja u nukleotidnom redosledu, u gensku bazu podataka deponovana je jedna sekvenca pod oznakom Serbia A1, KM001899. „BLAST“ pretraga je pokazala podudarnost od 93 - 97% nakon poređenja sekvence ABPV iz Srbije dužine 398 baznih parova sa sekvencama deponovanim u genskoj bazi. Nakon filogenetske analize nukleotidne sekvence Serbia A1 i 9 evropskih sekvenci ABPV (Grafikon 10), primećeno je da sekvence iz Srbije formiraju monofiletičku filogenetsku grupu koja je najbliža mađarskim sekvencama, pri čemu sekvence iz zapadne i severne Evrope formiraju zasebnu grupu. Kao spoljašnja grupa za upoređivanje korišćena je sekvenca KBV deponovana u genskoj bazi pod oznakom AY452696.

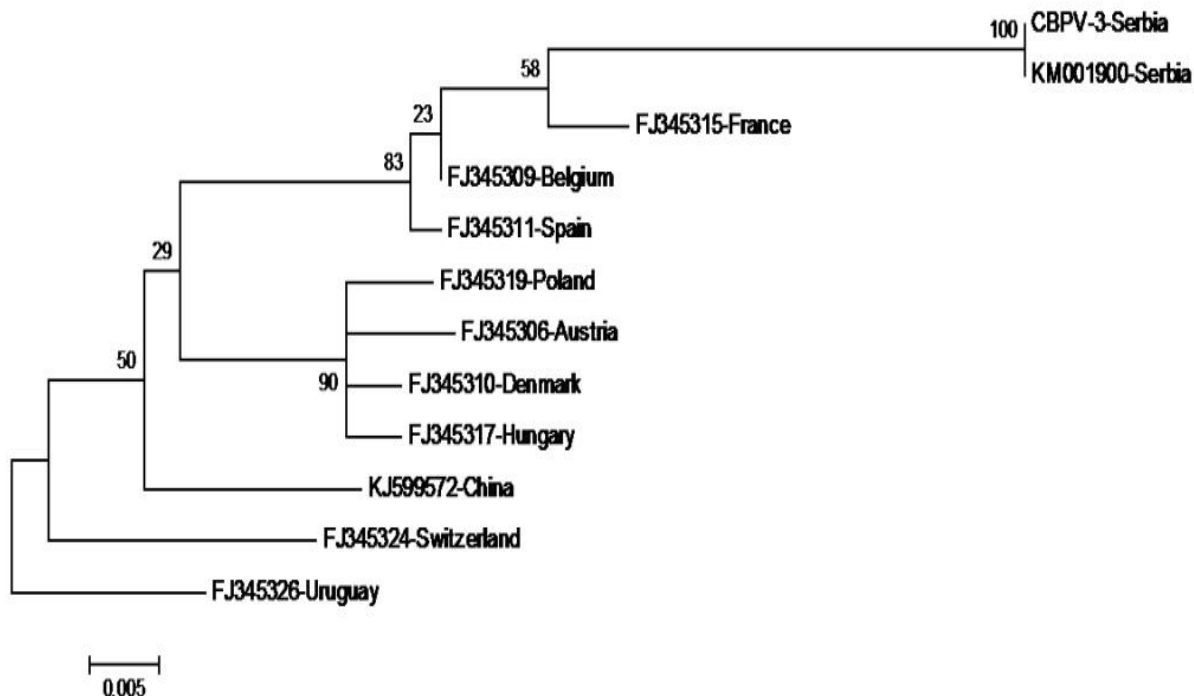
Grafikon 10 - Filogenetska analiza parcijalne nukleotidne sekvence kapsid protein gena virusa akutne paralize pčela iz Srbije*



* Brojevi na čvorovima filogenetskog stabla predstavljaju procentualne vrednosti dobijene nakon analize samoučitavanjem (eng. *bootstrap*) nakon 1000 ponavljanja.

Nakon molekularne identifikacije dve sekvence CBPV iz Srbije, zbog njihovog apsolutnog poklapanja u nukleotidnom redosledu, u gensku bazu podataka deponovana je jedna sekvenca pod oznakom Serbia C1, KM001900. Nakon „BLAST“ pretrage i upoređivanja parcijalne sekvence početnog RNK segmenta virusa hronične paralize pčela dužine 570 baznih parova utvrđena je identičnost u rasponu od 93 - 96 % sa sekvencama iz genske baze. Rezultati filogenetske analize Serbia C1 i 10 izolata CBPV iz Evrope, Kine i Urugvaja (Grafikon 11) pokazuju da sekvence iz Srbije čine zasebnu filogenetsku grupu i relativno su udaljeni od ostalih analiziranih sekvenci. Uprkos tome, srpske i francuske sekvence formiraju monofiletičku grupu sa sekvencama iz Španije i Belgije, pri čemu je slična genetska udaljenost u odnosu na druge primećena kod sekvence iz Švajcarske. Sekvenca CBPV iz Urugvaja pod oznakom FJ345326 je iskorišćena kao spoljašnja grupa za upoređivanje.

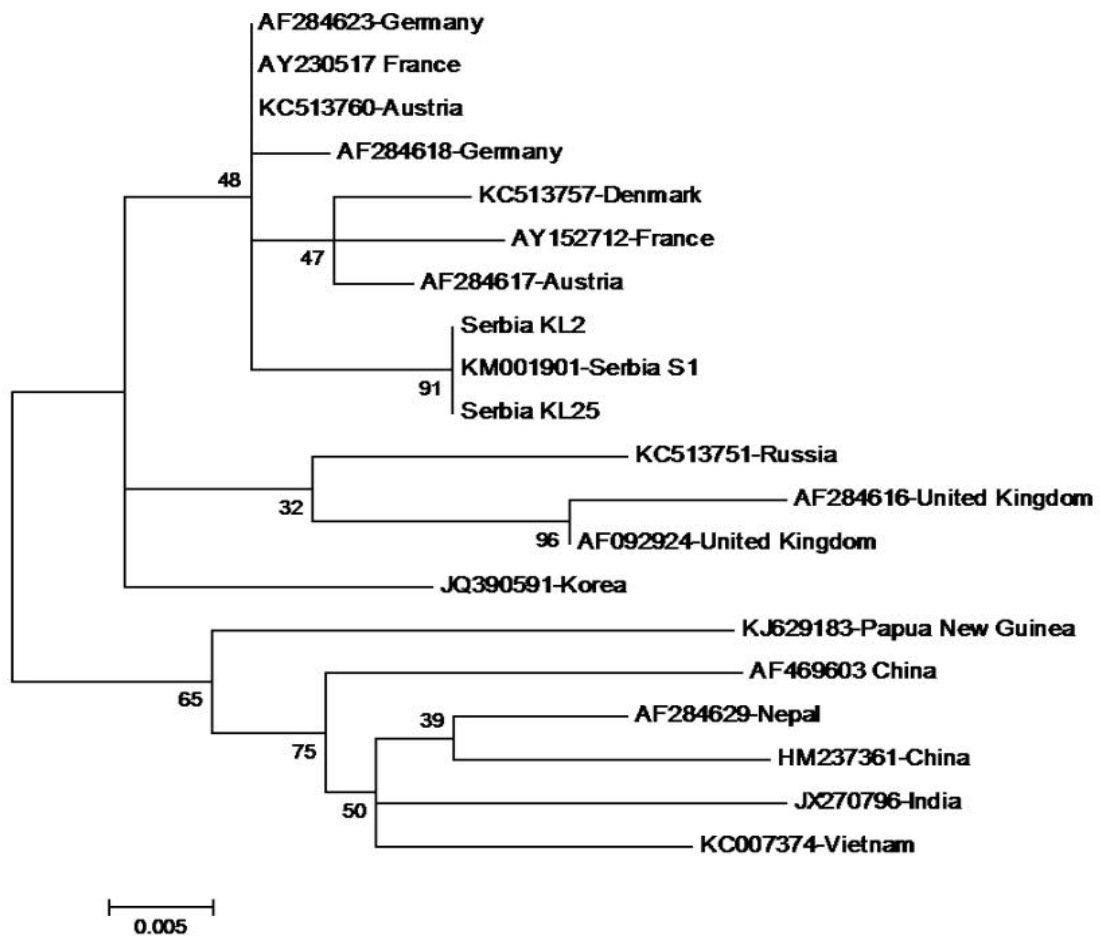
Grafikon 11 - Filogenetska analiza parcijalne nukleotidne sekvence kapsid protein gena virusa hronične paralize pčela iz Srbije*



* Brojevi na čvorovima filogenetskog stabla predstavljaju procentualne vrednosti dobijene nakon analize samoučitavanjem (eng. *bootstrap*) nakon 1000 ponavljanja.

Nakon molekularne identifikacije 3 sekvence SBV iz Srbije, u gensku bazu podataka deponovana je jedna sekvenca pod oznakom Serbia S1, KM001901 (Grafikon 12). „BLAST“ pretraga je pokazala podudarnost od 94 – 99% nakon poređenja sekvenci iz Srbije dužine 467 baznih parova sa sekvencama deponovanim u genskoj bazi. Sekvence iz Srbije formiraju filogenetsku grupu sa sekvencama iz kontinentalne Evrope. Ipak, srpske sekvence pokazuju relativnu genetsku udaljenost od drugih iz iste grupe. Dve sekvence iz Velike Britanije i jedna iz Rusije čine zasebnu grupu u poređenju sa drugim evropskim sekvencama. Treću granu na filogramu čini sekvenca iz Južne Koreje. Drugu veliku filogenetsku grupu čine sekvence iz Papua Nove Gvineje, Kine, Nepala, Indije i Vijetnama.

Grafikon 12 - Filogenetska analiza parcijalne nukleotidne sekvence poliprotein gena virusa mešinastog legla iz Srbije*



* Brojevi na čvorovima filogenetskog stabla predstavljaju procentualne vrednosti dobijene nakon analize samoučitavanjem (eng. *bootstrap*) nakon 1000 ponavljanja.

6. DISKUSIJA

Pčelarstvo u poslednjih nekoliko godina, kako kao dodatni, tako i kao osnovni izvor prihoda, poprima sve veću popularnost u Srbiji. Tome doprinosi činjenica da se izvoz meda, kao jednog od najznačajnijeg poljoprivredno-prehrambenog izvoznog artikla Srbije, u proteklom periodu višestruko povećao. Kako rastu potrebe stranog i domaćeg tržišta u medu, raste i broj novih pčelara, odnosno povećava se broj pčelinjih društava na teritoriji Srbije. Pčelarstvo Srbije se kao i pčelarska industrija u svetu, suočava sa fenomenom rastućih gubitaka pčelinjih društava („CCD“ – eng. Colony Collapse Disorder - kolaps pčelinjih društava). Ovaj multifaktorijalni fenomen predmet je brojnih istraživanja postavljenih sa ciljem otkrivanja glavnog ili glavnih uzročnika protiv kojih se treba boriti, odnosno čiju pojavu treba prevenirati, kako bi se gubitak pčelinjih zajednica sveo na najmanju moguću meru. Rezultati jednog od pomenutih istraživanja (Dainat i sar., 2012) kao markere CCD-a navode tri najznačajnije grupe patogena pčelinjih zajednica: mikrosporidije roda *Nosema*, viruse i pčelinjeg krpelja *V. destructor*. Ukoliko se se njihova pojava ne spreči, odnosno ne drži pod kontrolom, štete koje posledično nastaju ogledaju se u smanjenoj produkciji, slabljenju i posledičnom uginuću zajednica. Egzistiranje virusa u pčelinjim društvima u formi latentnih infekcija (Gauthier i sar., 2007; Tentcheva i sar., 2004; Simeunović i sar., 2014), kao i visoka opšta prevalencija *N. ceranae* tokom čitave sezone (Botías i sar., 2012a; Dainat i sar., 2012; Stevanovic i sar., 2013), nameću potrebu za pravovremenom upotrebom osetljivih dijagnostičkih postupaka u svrhu efikasne zdravstvene zaštite pčelinjih društava.

6.1. Prisustvo i zastupljenost uzročnika mikrosporidijalnih infekcija u uzorcima pčela. Dosadašnja ispitivanja prisustva i raširenosti mikrosporidija roda *Nosema* u pčelinjim zajednicama u Srbiji (Stevanovic i sar., 2011,2013)

ukazuju na dominantnost *N.ceranae* tokom čitave godine. Istraživanje Stevanovic i sar. (2013) takođe, pokazuje opravdanost upotrebe PCR tehnike u utvrđivanju prisustva DNK *N. ceranae* u pčelinjim društvima. Naime, u pomenutom istraživanju, prisustvo mikrosporidijalne DNK je utvrđeno i u uzorcima u kojima mikroskopskim pregledom nije zabeleženo prisustvo spora. Ograničenje mikroskopske detekcije spora se ogleda u činjenici da 1 detektovana spora u ispitujućem maceratu odgovara nivou infekcije od 50000 spora po pčeli (OIE, 2013), tako da infekcije manjeg stepena ostaju nepotvrđene. PCR metoda pokazuje tako veću osetljivost u utvrđivanju infekcija manjih od 50000 spora po pčeli. Preliminarna ispitivanja prisustva virusa deformisanih krila i virusa akutne paralize pčela u Srbiji (Simeunović i sar., 2014) ukazuju na visoku zastupljenost ovih virusa (76,4 % i 61,8 %) u asimptomatskim pčelinjim zajednicama. Promena nekog od nespecifičnih faktora sredine (temperatura, vlažnost, padavine i sl.), nedostatak kvalitetne hrane i pojava pčelinjih patogena (*V. destructor*, *N. ceranae*) mogu dovesti vrlo brzo do povećanog umnožavanja virusa u pčelama i pojavu vidljivih kliničkih simptoma virusnih infekcija na nivou društva. Stoga, pravovremena detekcija vrste virusa u pčelinjim zajednicama može olakšati izbor i vremenski period primene preventivnih mera i postupaka u zdravstvenoj zaštiti pčela.

Rezultati mikroskopskog pregleda 150 analiziranih uzoraka ukazuju na visoku zastupljenost od 72 % *Nosema* pozitivnih pčelinjih društava iz Srbije. Ovakav rezultat nije iznenađenje, već je u saglasnosti sa višegodišnjim ispitivanjima Stevanovic i sar. koji su od 2006-2009. godine zabeležili 82,8 % *Nosema* pozitivnih uzoraka (Stevanovic i sar., 2011), dok se učestalost *Nosema* pozitivnih uzoraka od 2008-2012. godine kretala od 73-98 % (Stevanovic i sar., 2013). Visoka prevalencija mikrosporidijalnih infekcija, pre svega infekcija izazvanih sa *N. ceranae*, kod pčela je zabeležena u zemljama umerene i tople klime (Martín-Hernández i sar., 2007; 2012; Higes i sar., 2008; Hedtke i sar., 2011; Runckel i sar., 2011; Stevanovic i sar., 2011, 2013; Traver i Fell, 2011; Medici i sar., 2012; Smart i Sheppard, 2012; Botías i sar., 2012a; Dainat i sar.,

2012). Takođe, visoka zastupljenost *Nosema* infekcije zabeležena je i u balkanskim zemljama i zemljama okruženja, kao što su Bosna i Hercegovina, Hrvatska, Crna Gora, Mađarska, Makedonija i Grčka (Santrac i sar., 2009; Tapaszi i sar. 2009; Tlak Gajger i sar. 2010; Bacandritsos i sar. 2010; Stevanovic i sar. 2011, 2013; Simeunovic i sar., 2014b). Ovo istraživanje je obuhvatilo i ispitivanje povezanosti regiona uzorkovanja i pojave *Nosema* infekcije. Rezultati statističke obrade primenom χ^2 testa nisu pokazali prisustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji pozitivnih uzoraka, što implicira da pojava mikrosporidijalnih infekcija pčela u Srbiji ne zavisi od regiona. Ovakav rezultat se može objasniti uticajem umereno kontinentalne klime sa neznatnim odstupanjima u klimatskim karakteristikama različitih regiona Srbije zbog relativno male površine teritorije Srbije. Još jedan razlog koji doprinosi odsustvu regionalnog uticaja na pojavu infekcije je intenzivna razmena pčelinjih društava, rojeva i matica među pčelarima koji pripadaju različitim regionima. Pored regionalnog, u ovom radu je ispitivan i uticaj jačine pčelinjih društava na pojavu *Nosema* infekcije. Primenom χ^2 testa nije utvrđena statistička značajnost u ispitivanju uticaja jačine pčelinjeg društva na pojavu infekcije. Odsustvo veze u pojavi infekcije kod jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava su potvrdili i Traver i Fell (2011) u ispitivanju koje je obuhvatilo više od 300 košnica. Rezultati ispitivanja negativnih uticaja *N. ceranae* na pčelinje društvo od strane Botías i sar. (2013), takođe pokazuju odsustvo značajnosti u pojavi infekcije u odnosu na jačinu društva.

Nakon mikroskopskog pregleda, svi ispitivani uzorci pčela su, bez obzira na utvrđeno prisustvo spora mikrosporidija, analizirani primenom molekularnih metoda. Rezultati PCR analiza pokazuju da je DNK mikrosporidija roda *Nosema* bio prisutan u 132 uzorka (88%), odnosno u 24 uzorka (18 %) u kojima mikroskopskim pregledom nije utvrđeno prisustvo spora. Ovakvu pojavu su zabeležili Stevanovic i sar. (2013) kada su, prilikom poređenja rezultata prisustva mikrosporidija u uzorcima pčela primenom mikroskopskog pregleda i PCR tehnike, dobili podudarnost u 95 % slučajeva.

Drugim rečima, 5 % uzoraka u kojima nisu pronađene spore, bilo je pozitivno nakon PCR analize. Razlika u rezultatima predstavlja posledicu manje osetljivosti mikroskopskog pregleda macerata u poređenju sa molekularnim tehnikama. Naime, mikroskopskim pregledom macerata (OIE, 2008, 2013) se može utvrditi nivo infekcije veći od 50000 spora po pčeli, što znači da spore kod infekcije ispod ovog nivoa neće biti detektovane. Činjenica da se mikroskopskim pregledom može utvrditi samo prisustvo spora, a ne vegetativnih oblika, dok se putem PCR tehnike detektuje DNK iz oba izvora, takođe doprinosi većoj osetljivosti i specifičnosti molekularne tehnike u otkrivanju *Nosema* mikrosporidija u uzorcima pčela (Martín-Hernández i sar., 2007; Stevanovic i sar., 2011). U ovom radu je korišćena duplex PCR tehnika koja je namenjena za istovremeno utvrđivanje prisustva DNK *N. ceranae* i *N. apis* u ispitujućem materijalu. Ova metoda je preuzeta od Martín-Hernández i sar. (2007), a činjenica da je korišćena i da se još uvek koristi u radovima velikog broja istraživača (Martín-Hernández i sar., 2007; 2012; Higes i sar., 2008; Invernizzi i sar., 2009; Gisder i sar., 2010; Hedtke i sar., 2011; Stevanovic i sar., 2011; Medici i sar., 2012; Botías i sar., 2012a; Dainat i sar., 2012; OIE, 2013), predstavlja dokaz kompetentnosti ove metode u detekciji DNK *Nosema* vrsta. Kao pozitivne kontrole u PCR reakciji za *N. ceranae* i *N. apis*, uzete su sekvenciranjem potvrđeni pozitivni uzorci. Od ukupno 132 uzorka koji su primenom duplex-PCR tehnike označeni kao *Nosema* pozitivni, u svih 132 (100 %) je zabeleženo prisustvo DNK *N.ceranae*, pri čemu ni jedan uzorak (0 %) nije bio pozitivan na *N. apis*. Pošto su uzorci uzimani u proleće, leto i jesen, može se isključiti uticaj temperature, odnosno sezonalnosti, na pojavu *N. ceranae*, odnosno *N. apis* u pčelinjim društvima. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Stevanovic i sar. (2011, 2013) u kojima se u Srbiji u periodu od 2006-2012. godine navodi samo 1, a u zemljama bivše Jugoslavije, nijedan uzorak pozitivan na *N. apis*. Slični rezultati su zabeleženi u Španiji (Higes i sar., 2010, 2013), Grčkoj (Bacandritsos i sar., 2010), Hrvatskoj (Tlak-Gajger i sar., 2010) i drugim zemljama Evrope (Klee i sar., 2007) i sveta (Chen i sar., 2008b).

Rezultati ispitivanja uticaja *N. ceranae* infekcije na produktivne i reproduktivne karakteristike pčelinjih zajednica u Srbiji (Simeunovic i sar., 2014b), takođe pokazuju prisustvo isključivo ove mikrosporidijalne vrste u pčelinjim društvima. Međutim, istraživanja sprovedena u severnijim delovima Evrope kao rezultat imaju nalaz koinfekcije *N. apis* – *N. ceranae*, odnosno veću zastupljenost vrste *N. apis* u odnosu na *N. ceranae* (Fries i Forsgren, 2008; Gisder i sar., 2010). To je u saglasnosti sa tvrdnjama Fries-a (2010) da hladnija klima više pogoduje razvoju *N. apis* u odnosu na *N. ceranae*. Posmatrajući rezultate ispitivanja regionalnog i uticaja jačine društva na broj *N. ceranae* pozitivnih uzoraka primenom PCR tehnike, takođe nije primećena statistička značajnost u pojavi infekcije.

Utvrđivanje regionalnog uticaja i uticaja jačine pčelinjeg društva na intenzitet mikrosporidijalne infekcije izvršeno je poređenjem vrednosti za prosečan broj spora po pčeli za svaki uzorak. Kada se uporede medijane za prosečan broj spora pčelinjih društava iz severne, južne, istočne, zapadne i centralne Srbije, primenom Kurskal-Wallis testa beleži se statistički značajan ($p < 0,001$) uticaj regionalnog porekla pozitivnih uzoraka na intenzitet infekcije. Testiranjem sume rangova primenom Mann-Whitney testa ispitivano je poreklo statističke značajnosti između regiona. Statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj spora po pčeli je primećen kod uzoraka iz severne Srbije u odnosu na uzorke iz istočne i zapadne Srbije. Značajnost razlike u broju spora u ovim slučajevima potiče od relativno male vrednosti prosečnog broja spora po pčeli kod uzoraka iz istočne i zapadne Srbije (50000 spora) i visoke vrednosti za uzorke iz severne Srbije. Ovako nizak prosečan broj spora u istočnoj i zapadnoj Srbiji može biti posledica pretežno stacionarnog tipa pčelarenja. Kod ovakvog tipa pčelarenja, boravkom na stacionarnom pčelinjaku tokom čitave godine, smanjuje se rizik od pojave i širenja mikrosporidijalnih infekcija. Takođe, prisustvo kvalitetne paše pozitivno utiče na imunitet pojedinačnih pčela i socijalni imunitet društva, dok negativan uticaj biljnih kultura tretiranih neonikotinoidima (Alaux i sar., 2010), na prvom mestu suncokreta, ovde nije primećen zbog odsustva ili male

količine pomenute kulture. To omogućava pčelama da se uspešno bore sa *N. ceranae*, energetskim parazitom koji patogene efekte na zdravlje pčela ispoljava i kroz imunosupresiju domaćina (Chaimanee i sar., 2012). Nasuprot istočnom i zapadnom regionu Srbije, pčelari iz severne Srbije su pretežno seleći pčelari, što umnogome povećava rizik od pojave i širenja, ne samo *N. ceranae*, već i drugih patogena koji slabe pčelinja društva. Dodatni štetni uticaj po jačinu i zdravstveni status selećih pčelinjih društava predstavljaju pripremni postupci za seljenje kao i samo seljenje. U severnoj Srbiji se nalaze najveće monokulturne površine pod neonikotinoidima zaštićenim suncokretom i kukuruzom. Uzimanje polena od ovih biljaka i skladištenje u košnice, dovodi do hroničnog trovanja pčelinjih društava (Bernal i sar., 2011), što stvara povoljne uslove za pojavu i intenzivno umnožavanje *N. ceranae* (Alaux i sar., 2010). Statistički značajno manji ($p < 0,05$) prosečan broj spora po pčeli je primećen kod društava iz zapadne Srbije u poređenju sa društvima iz južne i centralne Srbije. Mogući razlog niskog broja spora za uzorke iz zapadne Srbije je prethodno objašnjen. Relativno visoke vrednosti za prosečan broj spora po pčeli kod društava iz južne i istočne Srbije moguće je objasniti neposrednom blizinom većeg broja pčelinjaka kapaciteta do 50 košnica. Naime, prema podacima Saveza pčelarskih organizacija Srbije (SPOS), u pomenutim regionima, na relativno ograničenim područjima na kojima postoje uslovi za stacionarno pčelarenje tokom čitave godine (prisustvo pčelinje paše), registrovan je veći broj pčelinjaka kapaciteta do 50 košnica. Neposredna blizina većeg broja pčelinjaka, naročito prisustvo pčelara hobista koji poseduju do 10 košnica i gde sanitarno-higijenske mere na pčelinjacima najčešće nisu ispoštovane, značajno doprinose pojavi i širenju infekcije izazvane *N. ceranae* vrstom. Takođe, osnov pčelinje paše na ovim lokalitetima čini bagrem, dok su ostale paše relativno skromne i često nedovoljne za ostvarivanje prinosa, često i za preživljavanje zajednica, te pčelari pribegavaju dodatnoj prihrani društava šećernim sirupom, već od druge polovine jula. Velike količine šećernog sirupa dovode do pojave energetskog stresa kod kod društava inficiranih sa *N. ceranae* (Mayack i Naug, 2008;

Simeunović i sar., 2013a, 2013b), što za rezultat ima slabljenje društava i pojavu kliničkih manifestacija bolesti. Uticaj jačine društva na intenzitet infekcije u ovom radu nije pokazao statistički značajan rezultat, što je u saglasnosti sa istraživanjima Traver i sar. (2011).

6.2. Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela. Prisustvo i zastupljenost virusa deformisanih krila, virusa akutne paralize pčela, virusa mešinastog legla i virusa hronične paralize pčela u uzorkovanom materijalu poreklom iz pčelinjih društava u kojima kliničkim pregledom nisu zabeleženi simptomi virusnih infekcija, ispitivano je upotrebom real-time RT-PCR metode bazirane na „TaqMan“ probama. Rezultati prisustva virusa pčela na teritoriji Srbije pokazuju da je prisustvo RNK sva četiri pomenuta virusa utvrđeno u ispitujućim uzorcima pčela. Prisustvo virusnih infekcija pčela je zabeleženo u mnogim zemljama (Bailey i sar., 1981; Chen i sar., 2004; Tentcheva i sar., 2004; Antúnez i sar., 2006, 2012; Berenyi i sar., 2006; Nielsen i sar., 2008; Choe i sar., 2012; Forgách i sar., 2008; Toplak i sar., 2012; Ai i sar., 2012). Što se tiče zemalja u okruženju, prisustvo virusa u pčelinjim zajednicama je registrovano u Hrvatskoj (Tlak-Gajger i sar., 2014), Bosni i Hercegovini (Santrač, 2013), Sloveniji (Toplak i sar., 2012; Jamnikar Ciglenečki i sar., 2012), Mađarskoj (Bakonyi i sar., 2002; Forgach i sar., 2008) i Grčkoj (Bacandritsos i sar. 2010). Prisustvo pčelinjih virusa u Srbiji je dokazano u istraživanjima Kulinčević i sar. (1990). U tom istraživanju, upotrebom elektronskog mikroskopa analizirani su uzorci pčela iz svega 2 pčelinjaka. Utvrđeno je prisustvo ABPV, virusa oblačastih krila i egipatskog pčelinjeg virusa. Prisustvo 5 virusa u pčelinjim društvima iz okoline Novog Sada utvrdili su Petrovic i sar. (2013) primenom RT-PCR tehnike. Simeunović i sar. (2014) su primenom real-time RT-PCR tehnike detektovali prisustvo RNK virusa deformisanih krila i virusa akutne paralize pčela.

U ovim ispitivanjima, prisustvo RNK pčelinjih virusa na teritoriji Srbije je utvrđeno u 131 uzorku, što čini 87,33 % svih obrađenih uzoraka. Odsustvo

nukleinskih kiselina ispitivanih virusa pčela je zabeleženo u svega 19 uzoraka, što predstavlja 12,67 % obrađenih uzoraka. Zastupljenost RNK DWV je utvrđena u 74 % uzoraka. Prisustvo ovog virusa u visokom procentu je utvrđeno i u Hrvatskoj (Tlak-Gajger i sar., 2014), Sloveniji (Toplak i sar., 2012), Francuskoj (Tentcheva i sar., 2004; Gauthier i sar., 2007), Engleskoj (Baker i Schroeder, 2008), Španiji (Antúnez i sar., 2012), Austriji (Berenyi i sar., 2006), Mađarskoj (Forgách i sar., 2008), Kini (Ai i sar., 2012) i Urugvaju (Antúnez i sar., 2006). U Srbiji, analiziranjem uzoraka iz 50 pčelinjih društava zastupljenost ovog virusa je iznosila 76,4 % (Simeunović i sar., 2014). Visoka zastupljenost DWV posledica je povezanosti pojave ovog virusa sa pojavom *V. destructor*. Naime, pčelinji krpelj ima ulogu i mehaničkog i biološkog vektora ovog virusa (Genersh i Aubert, 2010), te širenjem *V. destructor* parazita među pčelinjim društvima širi se i virusna infekcija. Još jedan razlog koji ide u prilog visokoj prevalenciji virusa je i činjenica da se akaricidni tretman pčelinjih društava primenjuje samo na početku i na kraju paše, zbog opasnosti od pojave rezidua aktivnih supstanci u pčelinjim proizvodima. To znači da tokom čitavog trajanja pašne sezone društva ostaju nezaštićena, tako da je umnožavanje ovog parazita, kao i virusa koji nosi, nesmetano. Posledice infekcije pčela sa DWV u mnogome zavise od prisustva *V. destructor* kao bitnog činioca u ispoljavanju simptoma. Pri niskoj infestaciji društava pčelinjim krpeljom, DWV provocira asimptomatske infekcije, odnosno, inficirane pčele ne pokazuju nikakve vidljive simptome (Yue i sar., 2007; deMiranda i Genersch, 2010; Möckel i sar., 2011; Martin i sar., 2013). Nukleinska kiselina ABPV je detektovana u 49,3 % uzoraka, što je saglasno sa rezultatima procentalne zastupljenosti ovog virusa u Francuskoj - 58 % (Tentcheva i sar., 2004; Gauthier i sar., 2007), Austriji - 68 % (Berenyi i sar., 2006), Mađarskoj - 37 % (Forgách i sar., 2008), Nemačkoj - 73% (Siede i sar., 2008) i Sloveniji - 40 % (Toplak i sar., 2012). Međutim, ispitivanja sprovedena u Hrvatskoj - 10,97 % (Tlak-Gajger i sar., 2014), Danskoj - 10,56 % (Nielsen i sar., 2008), Kini - 6 % (Ai i sar., 2012), Južnoj Koreji - 0 % (Choe i sar., 2012) i Urugvaju - 9 % (Antúnez i sar., 2006) pokazuju nisku zastupljenost ovog virusa

u pčelinjim društvima. Relativno visoka zastupljenost ABVP u klinički zdravim društvima (Bailey i sar., 1981; Tentcheva i sar., 2004; Gauthier i sar., 2007; Runckel i sar., 2011) je takođe, dokazana i u Srbiji od strane Simeunovic i sar. (2014) gde je RNK ovog virusa nađena u 61,8 % uzoraka. Ispitivanja različitih autora pokazuju široku rasprostranjenost ovog virusa, mahom u formi latentnih i inaparentnih infekcija (Allen i Ball, 1996; Hung i sar., 1996; Ellis i Munn, 2005). Širenje i perzistiranje pčelinjeg krpelja u pčelinjim društvima tokom čitave pašne sezone utiče i na širenje i zastupljenost ABPV, budući da je *V. destructor* mehanički vektor ovog virusa (Genersch, 2010). Visoka prevalencija pomenutog virusa u Srbiji se može objasniti dugim toplim periodima u toku kojih pčele unose polen i nektar, odnosno pašni period se produžava sve do kasne jeseni onemogućavajući pčelarima da primene akaricidni tretman (zbog opasnosti od rezidua u medu). Procentalna zastupljenost SBV od 24 % zabeležena u ovim ispitivanjima je značajno niža od vrednosti zabeleženih u Francuskoj - 86 % (Tentcheva i sar., 2004), Urugvaju - 100 % (Antúnez i sar., 2006) i Grčkoj - 90 % (Bacandritsos i sar. 2010), ali nekoliko puta viša nego u Španiji - 1,1 % (Antúnez i sar., 2012), Mađarskoj - 2 % (Forgách i sar., 2008), Engleskoj - 1,4 % (Baker i Schroeder, 2008) i Sloveniji - 8,3 % (Toplak i sar., 2012). Zastupljenost ovog virusa u pčelinjim društvima iz Srbije je najpribližnija rezultatima iz Hrvatske - 40,24 % (Tlak-Gajger i sar., 2014), Austrije - 49 % (Berenyi i sar., 2006), Kine (Ai i sar., 2012) i Južne Koreje - 30,71 % (Choe i sar., 2012). Uprkos zastupljenosti od 24 %, klinički simptomi infekcije koji se ogledaju u promenama na larvicama, kod ispitivanih društava nisu primećeni. Razlog ovome je kvalitetna pašna sezona, kako u pogledu povoljnih vremenskih uslova, tako i u pogledu kvalitetne prolećne paše. Dostupnost kvalitetne hrane u proleće omogućava intenzivan razvoj pčelinjeg društva, ujedno i mladih pčela koje, ispoljavajući higijensko ponašanje u košnici, uspevaju da eliminišu svaku bolesnu ili sumnjivu larvu i na taj način spreče širenje bolesti i pojavu kliničkih simptoma (Shimanuki, 1980). Nukleinske kiseline virusa hronične paralize su detektovane u svega 6,7 % ukupno analiziranih uzoraka. Niska stopa zastupljenosti ovog

virusa u asimptomatskim društvima se smatra uobičajenom (Gauthier i sar., 2007), tako da su i dobijeni rezultati u saglasnosti sa procentualnom zastupljenosti od 0 - 20 % koliko je zabeleženo u Sloveniji (Toplak i sar., 2012), Hrvatskoj (Tlak-Gajger i sar., 2014), Austriji (Berenyi i sar., 2006), Danskoj (Nielsen i sar., 2008), Kini (Ai i sar., 2012) i Južnoj Koreji (Choe i sar., 2012). Kao i u slučaju SBV, ni jedno od društava u kojima je utvrđeno prisustvo CBPV nije pokazivalo simptome infekcije.

6.2.1. Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije. Analizirajući uticaj regiona uzorkovanja na zastupljenost pojedinačnih virusa u pčelinjim društvima u Srbiji, utvrđeno je postojanje statističke značajnosti ($p < 0,05$) u regionalnoj distribuciji pčelinjih virusa. Zastupljenost virusa deformisanih krila u severnoj, istočnoj, južnoj, zapadnoj i centralnoj Srbiji je bila približno ujednačena, odnosno, kretala se od 66,7 - 83,3 %. Statistička analiza pokazuje odsustvo značajnosti. Ovakav rezultat se mogao očekivati jer je DWV jedan od najzastupljenijih, ako ne i najzastupljeniji virus u pčelinjim zajednicama (Baker i Schroeder, 2008; Forgách i sar., 2008; Genersch, 2010; Toplak i sar., 2012; Ai i sar., 2012; Tlak-Gajger i sar., 2014). Rezultati ispitivanja prisustva DWV i ABPV u pčelinjim društvima u Srbiji pokazuju da i pored visoke zastupljenosti DWV (76,4 %), ova infekcija nije pokazivala regionalni karakter (Simeunović i sar., 2014). Razlog globalne raširenosti i visoke prevalencije ovog virusa je biološka i mehanička vektorska uloga pčelinjeg krpelja *V. destructor* (Genersch i Aubert, 2010; Dainat i sar., 2012; Martin i sar., 2013), tako da se zastupljenost ovog virusa u pčelinjim društvima može smatrati uobičajenom pojavom, jer u najvećem broju slučajeva, prisutan u niskim koncentracijama, izaziva latentne infekcije (Yue i sar., 2007; de Miranda i Fries, 2008). Istraživanja sprovedena u Francuskoj, Austriji i Urugvaju, takođe pokazuju odsustvo regionalnog uticaja na zastupljenost DWV (Tentcheva i sar., 2004; Berenyi i sar., 2006; Antúnez i sar., 2006; Gauthier i sar., 2007).

Za razliku od DWV, zastupljenost virusa akutne paralize pčela značajno zavisi ($p < 0,001$) od regiona u kojem se nalaze ispitivana društva. Pčelinji krpelj *V. destructor* igra značajnu ulogu u prenošenju ovog virusa, kao i u ispoljavanju kliničkih simptoma infekcije (Genersch, 2010). Međutim, literaturni podaci o replikaciji ovog virusa u *V. destructor* do sada nisu poznati, samim tim se može govoriti samo mehaničkoj vektorskoj ulozi krpelja u prenošenju virusa (Genersch, 2010). Iz navedenih razloga sledi da zastupljenost ABPV u pčelinjim društvima zavisi od intenziteta infestiranosti društava pčelinjim krpeljom. Pomenuta hipoteza je upotrebljena kao objašnjenje razlike u zastupljenosti ovog virusa u pčelinjim društvima smeštenih u različitim oblastima Francuske (Tentcheva i sar., 2004), Austrije (Berenyi i sar., 2006) i Nemačke (Siede i sar., 2008b). Takođe, na sličan način je objašnjen uzrok visoke zastupljenosti ovog virusa u pčelinjim društvima iz pomenutih zemalja (preko 50 %) i niske zastupljenosti u društvima iz Danske (14 %) (Nielsen i sar., 2008). Naime, uticaj regiona u kojem su smeštena ispitivana društva na zastupljenost ABPV, kao i veliki raspon u zastupljenosti virusa između država, objašnjava se različitim apitenhničkim postupcima vezanim za izbor i vreme upotrebe određenih akaricida (Nielsen i sar. 2008; Genersch, 2010). Upotreba organskih, „mekih“, akaricida za rezultat ima manju kontaminaciju pčelinjih proizvoda, međutim značajno manju efikasnost u borbi protiv pčelinjeg krpelja nego što je to slučaj sa sintetičkim, „teškim“, akaricidima. To znači da određeni regioni, odnosno čitave države, upotrebom organskih akaricida eliminišu manji procenat pčelinjih krpelja iz društava, ostavljajući prostor za širenje ABPV. Ova hipoteza je najverovatnije objašnjenje značajnosti razlike u zastupljenosti ovog virusa u društvima koja potiču iz različitih regiona Srbije. Najmanja zastupljenost ABPV je zabeležena u centralnoj Srbiji (16,7 %). Pčelari ovog regiona su pretežno stacionarni pčelari, pri čemu se u nedostatku kasne paše, sezona završava već u drugoj polovini jula, kada se primenjuje akaricidni tretman. Tradicionalno, izbor akaricida u ovom regionu se mahom svodi na upotrebu sintetskih akaricida u formi traka natopljenih aktivnom supstancom koje pružaju zaštitu

društava u trajanju od najmanje 28 dana. Drugi sistem kontrole *V. destructor* je primena timola (organski akaricid) po skidanju medišnih nastavaka i ceđenju meda, a potom primena amitraza (sintetski akaricid) u drugoj polovini septembra. Rezultat oba sistema kontrole je značajno smanjivanje broja krpelja u društvu i održavanje niske infestiranosti tokom većeg dela pašne sezone. Nasuprot tome, pčelari severne Srbije gde je zabeležena najveća zastupljenost pomenutog virusa (68,2 %), zbog obilne rane prolećne paše i trajanje kasne jesenje paše (nekada i do početka oktobra), prinuđeni su da akaricidne tretmane obavljaju u rano proleće i kasnu jesen, ostavljajući tom prilikom dug interval pašnog perioda u kojem nema zaštite od krpelja. Drugo, zbog pretežno selidbenog načina pčelarenja i prisustva velikog broja pčelinjih društava na relativno maloj površini (lipova i suncokretova paša), širenje i umnožavanje pčelinjeg krpelja u društvima je olakšano. Izbor akaricida nije uniforman za pomenuti region. Zbog sve veće popularnosti organskog načina pčelarenja, kao i mogućnosti plasmana pčelinjih proizvoda u susedne zemlje, sve više pčelara se odlučuje za organske supstance u izboru akaricida.

Zastupljenost virusa mešinastog legla se značajno razlikovala ($p < 0,001$) u odnosu na region uzorkovanja. U severnoj Srbiji 54,5 % društava je bilo pozitivno na prisustvo RNK ovog virusa. Mogući razlog za tako visoku zastupljenost je sezonski karakter pojave ovog virusa u pčelinjim društvima. Najprijemčivije za infekciju sa SBV jesu mlade pčele radilice, čiji je posao da čiste prazne ćelije i uklanjaju larve koje su, između ostalog, uginule od posledica infekcije ovim virusom. Sve dok postoji dovoljno mladih pčela radilica u košnici da uklone sve uginule i bolesne larve, simptomi infekcije ostaju neprimećeni (Shimanuki, 1980). Međutim, krajem proleća i početkom leta, završava se faza intenzivnog razvoja pčelinjeg društva, i ono se sprema za pašnu sezonu. Pripreme podrazumevaju angažovanje većeg broja izletnica, matica smanjuje intenzitet polaganja jaja, što dovodi do disproporcije broja kućnih pčela i izletnica. Ovo dovodi do nemogućnosti mladih radilica da uklone sve bolesne i uginule larve, te je širenje infekcije ubrzano, a sve veći broj

pčela biva inficiran (Aubert i sar., 2008). Iz navedenih razloga pčelinja društva u severnoj Srbiji su zbog obilne rane prolećne paše i ranijeg početka pašne sezone u odnosu na druge regione, podložnija pojavi i širenju ovog virusa. Dodatni razlog je premeštanje ramova sa leglom iz jedne košnice u drugu radi ujednačavanja društava za početak pašne sezone. Na ovaj način se mogućnost ubacivanja ramova sa inficiranim larvama u neinficirana društva povećava.

Rezultati statističke analize pokazuju značajan uticaj regionalnog porekla uzorka na prisustvo virusa hronične paralize pčela u pčelinjim društvima u Srbiji. Najveća zastupljenost je zabeležena u južnoj Srbiji, gde je u 19 % uzoraka pčela utvrđeno prisustvo RNK ovog virusa. Virus može postojati u pčelinjim društvima, izazivajući inaparentne infekcije (Ribière i sar., 2002; Tentcheva i sar., 2004; Gauthier i sar., 2007), a jedan od najefikasnijih načina prenošenja CBPV je intenzivan, učestali, neposredni međusobni kontakt zaraženih i nezaraženih pčela do koga najčešće dolazi usled nepovoljnih vremenskih prilika, nedostatka hrane i sl. (Ball i Bailey, 1997). U prilog tome govore i rezultati ogleda veštačke infekcije izvedene aplikovanjem infektivnog sadržaja na površinu kutikule pčela kojima su uklonjene dlačice, odnosno ogledi u kojima su zdrave i inficirane pčele držane u kavezima provocirajući česte kontakte (Bailey, 1983). U društvima koja ne pokazuju nikakve kliničke simptome oboljenja, CBPV se najčešće nalazi u niskom infektivnom titru, odnosno prisutan je u malom broju pčela jednog društva (Aubert i sar., 2008). Za razliku od ostalih ispitivanih virusa, širenje ovog virusa u jednom društvu, odnosno među društvima jednog pčelinjaka, najviše zavisi od promene nespecifičnih faktora unutar košnice (temperatura, vlažnost, kvantitet i kvalitet hrane, greške pčelara prilikom pregleda i sl.). Navedeni razlozi ukazuju da statistička značajnost u pojavi CBPV u društvima koja pripadaju različitim regionima Srbije ne zavisi od regionalnog porekla *per se*, već da su vremenske prilike u južnoj Srbiji u godini uzorkovanja (dosta kišnih dana, visoka vlažnost) uslovile nemogućnost izlaska pčela na pašu, odnosno doprinele povećanju broja inficiranih pčela u društvu. Pčelinja paša u ovom regionu se primarno

oslanja na nektarenje bagrema, međutim u tom periodu je zabeležen značajan broj kišnih dana tokom kojih pčele nisu mogle unositi nektar. Na bagremovu pašu se nadovezuje oskudna livadska paša, koja je prevashodno namenjena formiranju rezerve hrane za zimski period. Frekventni kontakti pčela unutar košnica usled nemogućnosti izlaska na pašu, oskudni prinosi bagremove i livadske paše i nastojanje pčelara da oduzmu veće količine meda društvima u zamenu za vodeno-šećernu prihranu uslovalo je porast stresogenih faktora u košnicama i intenziviranje širenja ovog virusa među pčelama (Simeunović i sar., 2013a,c).

6.2.2. Prisustvo i zastupljenost mešoviti virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz severne, istočne, južne, zapadne i centralne Srbije. Mešovite virusne infekcije su čest nalaz prilikom ispitivanja prisustva i zastupljenosti virusa u pčelinjim društvima (Chen i sar., 2004; Tentcheva i sar., 2004; Antúnez i sar., 2006, 2012; Berenyi i sar., 2006; Nielsen i sar., 2008; Choe i sar., 2012; Forgách i sar., 2008; Toplak i sar., 2012; Ai i sar., 2012). Prisustvo RNK više od jednog virusa je zabeleženo u 56,67 % uzoraka iz Srbije. Visoka procentualna zastupljenost mešoviti virusnih infekcijama je zabeležena u Francuskoj, Austriji, Hrvatskoj i drugim zemljama. U Francuskoj je u 32 od 35 ispitivanih društava (91,4 %) detektovano prisustvo mešoviti infekcija (Tentcheva i sar., 2004). U Austriji je u 84 % društava zabeležena mešovita virusna infekcija (Berenyi i sar., 2006), dok je u Hrvatskoj (Tlak-Gajger i sar., 2014) taj procenat iznosio 63,1. U ovim istraživanjima je izvršeno ispitivanje zastupljenosti mešoviti infekcija, kao i vrste i broja virusa u mešovitoj infekciji, u odnosu na regionalno poreklo uzorka i jačinu pčelinjeg društva. Analizirano je prisustvo i distribucija mešoviti infekcija u kojima učestvuje dva, tri i sva četiri ispitivana virusa. Prisustvo mešoviti infekcija u kojima pored DWV učestvuje još jedan ispitivani virus nije zavisilo od regionalnog porekla uzorka ($p > 0,05$). Ovaj rezultat nije iznenađenje uzimajući u obzir pomenuto odsustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji DWV. Odsustvo značajnosti u regionalnoj distribuciji je zabeleženo u svim mešoviti infekcijama sa

kombinacijom dva virusa, sem u slučaju kombinacije ABPV - SBV. Poreklo statističke značajnosti treba tražiti u visokoj zastupljenosti SBV u severnoj Srbiji. Mogući uzrok visoke zastupljenosti ovog virusa u severnoj Srbiji je prethodno objašnjen. Kod mešovitih infekcija sa tri virusa u kojima učestvuje DWV, statistička značajnost u regionalnoj distribuciji je utvrđena samo u ispoljavanju kombinacije DWV - ABPV - SBV. Uzimajući u obzir odsustvo povezanosti regiona uzorkovanja i pojave kombinacije virus DWV - ABPV, mogući uzrok statističke značajnosti ponovo ukazuje na zastupljenost SBV. U samo jednom ispitivanom uzorku (južna Srbija) je utvrđeno prisustvo sva četiri ispitivana virusa, tako da je razumljivo i odsustvo značajnosti u pojavi ove kombinacije.

6.2.3. Prisustvo i zastupljenost uzročnika virusnih infekcija u uzorcima pčela poreklom iz jakih, srednje jakih i slabih pčelinjih društava. Pored ispitivanja prisustva i distribucije virusa u odnosu na region uzorkovanja, u ovom radu je ispitan i mogući uticaj jačine društva na zastupljenost pojedinačnih virusa i kombinacija virusa u asimptomatskim pčelinjim društvima u Srbiji. DWV je bio najzastupljeniji u jakim društvima, gde je 78 % uzoraka sadržalo RNK ovog virusa. ABPV i CBPV su najčešće detektovani u srednje jakim društvima (62,5 % i 9,4 %). SBV je bio najzastupljeniji u slabim društvima. Statistička analiza pokazuje odsustvo značajnosti pri ispitivanju uticaja jačine društva na prisustvo bilo kog od ispitivanih virusa. Ispitivanje uticaja jačine pčelinjeg društva na pojavu različitih kombinacija virusa u mešovitim infekcijama za rezultat ima odsustvo značajnosti u pojavi, odnosno, jačina pčelinjeg društva ne favorizuje pojavu određene kombinacije virusa u pčelinjim društvima u Srbiji. Ovaj rezultat, naizgled u suprotnosti sa percepcijom prijemčivosti slabih organizama, pa i pčelinjeg društva kao makroorganizma ka infekciji, nije iznenađenje. Tačno je da slabija društva imaju ograničen kapacitet kompenzovanja patoloških promena kao posledica virusne infekcije, međutim, sve dok se ne pojave klinički simptomi infekcije, takva društva u prisustvu kvalitetne hrane i povoljnih vremenskih uslova, brzo mogu napredovati i podići svoj imuni status (Aubert i sar., 2008).

6.2.4. Uticaj jačine pčelinjeg društva na intenzitet virusne infekcije.

Upotreba real-time RT-PCR tehnike u poređenju sa „end point“ PCR tehnikom pruža mogućnost utvrđivanja intenziteta virusne infekcije u pčelinjim društvima. Intenzitet infekcije izazvane sa DWV, ABPV, SBV i CBPV je iskazan kroz visinu Ct (*eng.* cycle treshold) vrednosti, odnosno broj ciklusa u kojem signal fluorescencije, tokom real-time RT-PCR-a, prelazi liniju praga detekcije. Visina Ct vrednosti je pokazatelj koji je obrnuto proporcionalan količini detektovane virusne RNK u svakom ispitujućem uzorku. Drugim rečima, što je Ct vrednost niža, odnosno, što je broj ciklusa u kojem fluorescencija prelazi prag detekcije niži, to je količina detektovane virusne RNK u uzorku veća. Veća količina virusne RNK ukazuje na veću opterećenost čitavog društva detektovanim virusom/virusima u ispitujućem uzorku. Zabeležene Ct vrednosti svih ispitivanih virusa za svaki uzorak iskorišćene su u svrhu ispitivanja uticaja jačine pčelinjeg društva na intenzitet virusne infekcije (iskazan kroz prosečnu Ct vrednost za svaku grupu). Primenom ANOVA testa, utvrđeno je da između uzoraka koji pripadaju jakim, srednje jakim i slabim društvima, a u kojima je utvrđeno prisustvo RNK svakog od ispitivanih virusa, ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u visini Ct vrednosti. Rezultati testiranja po rangovima primenom Post Hoc Tukey HSD testa, pokazuju odsustvo statistički značajne razlike u visini prosečne Ct vrednosti za sve ispitujuće viruse prilikom poređenja pozitivnih uzoraka iz jakih i srednje jakih, jakih i slabih, i srednje jakih i slabih društava. Iz navedenih rezultata se može izvući zaključak da jačina pčelinjeg društva značajno ne utiče na intenzitet virusne infekcije kod društava koje ne pokazuju vidljive simptome virusne infekcije. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa istraživanjem Shutler i sar. (2014) u kojem nije zabeležen statistički značajan uticaj jačine pčelinjeg društva na intenzitet virusne infekcije (iskazan kroz Ct vrednost) u pčelinjim društvima u oblasti Njufaulndlend, Kanada. Intenzitet virusne infekcije (iskazan kroz Ct vrednost) između preživelih i uginulih društava se u istraživanju Bacandritsos i sar. (2010) razlikovao samo kod infekcije virusom hronične paralize pčela, dok

kod ostalih virusa značajnost nije primećena. Virusi u pčelinjim društvima koja ne pokazuju vidljive simptome virusne infekcije se nalaze u niskom titru (Gauthier i sar., 2007), stoga ne iznenađuju relativno visoke zabeležene prosečne Ct vrednosti (28,16-33,97) i odsustvo značajnosti u intenzitetu infekcije za sve ispitivane viruse.

Kompeticija virusa koji su prisustni u istom pčelinjem društvu može biti jedan od razloga njihove promenljive sezonalne prevalencije (Aubert i sar., 2008). Bailey i sar. (1981) su dokazali da se SBV ne umnožava u prisustvu ABPV prilikom eksperimentalne infekcije pčelinjih lutki. DWV svojom sposobnošću da se intenzivno umnožava u pčelama, inhibira umnožavanje drugih virusa, što su na primeru koinfekcije sa KBV dokazali Shen i sar. (2005). Na osnovu iznetih podataka, u ovom radu su ispitane promene u odnosu DWV/ABPV i DWV/SBV između jakih, srednje jakih i slabih društava u kojima su zabeležene pomenute kombinacije. Međusobni uticaj virusa je testiran kroz promene količnika prosečnih Ct vrednosti za ispitivane viruse. Poređenje količnika Ct vrednosti za pomenute viruse pokazuje uticaj jačine pčelinjeg društva na promenu odnosa virusa u pomenutim kombinacijama, odnosno, da li jačina društva favorizuje umnožavanje jednog na račun drugog virusa. Primenom ANOVA testiranja, nije utvrđeno postojanje statističke značajnosti u prosečnoj vrednosti za količnik Ct vrednosti kako za kombinaciju DWV - ABPV, tako i za kombinaciju DWV - SBV, između jakih, srednje jakih i slabih društava. Ovi rezultati pokazuju da u asimptomatskim pčelinjim društvima, pri virusnim infekcijama slabog intenziteta (relativno visoke Ct vrednosti), nije izražen inhibitorni efekat DWV na ABPV i SBV, i obrnuto. Značajnost ovih rezultata se sastoji u činjenici da pčelinja društva koja ne pokazuju kliničke simptome, bez obzira na jačinu, imaju kapacitet da se izbore sa pomenutim virusima što se vidi kroz nizak intenzitet infekcije. To dalje implicira da je ispoljavanje manifestnih virusnih infekcija i posledično stradanje društava zavisi više od faktora sredine, prisustva kvalitetne hrane i pojave drugih patogena (*V. destructor*, *N. ceranae*) nego od jačine pčelinjeg društva.

6.2.5. Prisustvo i zastupljenost mešovityh (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija u uzorcima pčela. Tokom prethodnih 10 godina veliki broj zemalja beleži značajne gubitke pčelinjih društava koji se ne mogu pripisati isključivo patogenom delovanju *V. destructor*. Dakle, slabljenje i gubici društava izazvani kombinacijom različitih stresora, među kojima se ističe dejstvo i sadejstvo različitih virusa i mikrosporidija u pčelinjim društvima, navela je naučnike da istraže mehanizme sinergističkog delovanja patogena (Neumann i Carreck, 2010; Martin i sar., 2013). U ovom radu ispitan je uticaj regionalne distribucije i jačine pčelinjih društava na prisustvo i zastupljenost mešovityh (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija. Pored prisustva i zastupljenosti, ispitan je i povezanost regiona i jačine pčelinjeg društva sa karakterom mešovite infekcije. Najčešće identifikovani pojedinačni virus u mešovitim infekcijama na teritoriji Srbije je DWV, što se i moglo očekivati budući da je ovaj virus najzastupljeniji u pčelinjim društvima (Simeunović i sar., 2014). Međutim, za razliku od prethodno iznetih rezultata, drugi najzastupljeniji pojedinačni virus u mešovitim infekcijama je SBV, što se može dovesti u vezu sa visokom zastupljenosti ovog virusa na severu Srbije, odakle i potiče najveći broj uzoraka u kojima je utvrđena mešovita *N. ceranae* – SBV infekcija. Rezultati ispitivanja zastupljenosti kombinacije virusa u mešovitim infekcijama pokazuju dominantnost kombinacije DWV - ABPV. Razlog relativno visoke zastupljenosti ove kombinacije treba tražiti u činjenici da su pomenuti virusi zabeleženi kao najzastupljeniji u pčelinjim društvima Srbije, ali i u istraživanjima koja pokazuju da su to virusi koji najviše zavise od prisustva i zastupljenosti *V. destructor* kao vektora (Genersch, 2010; McMenemy i Genersch, 2015). Zbog relativno dugog perioda medobranja u pojedinim regionima Srbije, društva manjkaju u adekvatnoj zaštiti protiv pčelinjeg krpelja, te se posledično i u asimptomatskim društvima očekuje umnožavanje virusa koji su u tesnoj vezi za ovim parazitom. Sledeća najprisutnija kombinacija virusa u mešovitim infekcijama je kombinacija ABPV - SBV, što je u saglasnosti sa rezultatima zastupljenosti virusa budući da ova dva virusa zauzimaju drugo i treće mesto u pčelinjim

društvima u Srbiji. Mešovite infekcije u kojima je utvrđeno prisustvo RNK tri virusa podjednako su zastupljene, svaka kombinacija u 10 % uzoraka. To su infekcije u kojima dominiraju dva najzastupljenija virusa uz dodatno prisustvo SBV i CBPV. Zastupljenost kombinacije tri virusa od 10 % je relativno niska, što je očekivano budući da se radi o asimptomatskim društvima. Zastupljenosti ispitivanih virusa u mešovitim infekcijama u asimptomatskim društvima u Srbiji je dosta niža u poređenju sa rezultatima iz Francuske (Tentcheva i sar., 2004; Gauthier i sar., 2007) gde je u preko 80 % društava koja su naizgled zdrava utvrđeno prisustvo RNK tri virusa. Višestruko manja zastupljenost je najverovatnije posledica razlike u broju ispitivanih virusa u Francuskoj i Srbiji (u Francuskoj 7 ispitivanih virusa).

Za sada nisu dostupni literaturni podaci o međusobnim interakcijama virusa u mešovitim, kao ni u mikrosporidijalno-virusnim infekcijama u asimptomatskim pčelinjim društvima. Malobrojna istraživanja za temu imaju usko polje međusobnih interakcija pojedinih virusa, odnosno interakcija pojedinačnih virusa i *N. ceranae*. Tako Bromenshenk i sar. (2010) u ispitivanju povezanosti iridovirusa i mikrosporidija u izazivanju kolapsa društava, navode da ova mešovita infekcija može značajno da utiče na pojavu gubitka društava. Costa i sar. (2011) u svojim istraživanjima navode da primećena negativna korelacija između *N. ceranae* i virusa deformisanih krila, može da bude posledica kompetitivnog odnosa ova dva patogena za ćelije domaćina. Doublet i sar. (2015) su ispitujući kompeticiju unutar domaćina (*A. mellifera*) između DWV i *N. ceranae* u laboratorijskim uslovima utvrdili asimetriju u inhibitornom delovanju jednog patogena na drugog, odnosno pojava *N. ceranae* pre virusa je inhibirala umnožavanje virusa, dok obrnuta situacija nije zabeležena. Martin i sar. (2013) su ispitivali hipotezu o sinergističkom delovanju DWV i mikrosporidija pčela u pčelinjim društvima na Havajima, međutim hipoteza nije potvrđena. Toplak i sar. (2013) su u laboratorijskim uslovima ispitivali sinergistički efekat CBPV i *N. ceranae* u zimskim pčelama u cilju utvrđivanja uloge ova dva patogena u zimskim gubicima pčelinjih društava. Utvrđen je

sinergistički efekat mikrosporidije na umnožavanje CBPV u pčelama. Pomenuta istraživanja se tiču efekata pojedinačnih virusa, pri tom zanemarujući postojanje i uticaj drugih eventualno prisutnih virusa na ispitivane subjekte. Takođe, nedostupne su informacije o međusobnim interakcijama više virusa i *N. ceranae* u asimptomatskim društvima i posledičnom nastanku kliničke infekcije. Ispitivanja zastupljenosti i karaktera mešovutih infekcija imalo je za cilj utvrđivanje pravilnosti u pojavi regionalnog i uticaja jačine pčelinjeg društva na zastupljenost mešovutih infekcija; prisustvo jednog ili više virusa u mešovitim infekcijama; ali i poređenje mešovutih sa samo virusnim i samo mikrosporidijalnim infekcijama kod asimptomatskih društava u Srbiji. Rezultati ispitivanja regionalnog uticaja na pomenuta svojstva pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0,001$) u ispoljavanju mešovutih, samo virusnih i samo mikrosporidijalnih infekcija u pčelinjim društvima Srbije. Istovremeno prisustvo više vrsta virusa i *N. ceranae* su dominantan nalaz u svim regionima osim u centralnoj Srbiji. U severnoj Srbiji je zabeležen najviši procenat pomenute vrste mešovutih infekcija. Ovaj nalaz je posledica utvrđene najviše prevalencije virusa mešinastog legla, virusa akutne paralize pčela i *N. ceranae* u ovom regionu u odnosu na druge. Razlozi visoke zastupljenosti pomenutih patogena u ovom regionu su prethodno objašnjeni. Samo u centralnoj Srbiji dominira nalaz mešovite infekcije u kojoj je utvrđena RNK samo jednog virusa. Razlog ovog odstupanja od ostalih regiona treba tražiti u rezultatima zastupljenosti ispitivanih virusa u centralnoj Srbiji. Naime, osim DWV koji je bio najprisutniji baš u ovom regionu, ostali virusi su relativno slabo zastupljeni ili odsutni. Mešovite virusne infekcije takođe, pokazuju slabu zastupljenost u ovom regionu. Uprkos postojanju značajne razlike, na osnovu analize distribucije različitih oblika mešovutih infekcija i njihovog poređenja sa samo virusnim i samo mikrosporidijalnim infekcijama, ne može se utvrditi pravilnost u pojavi mešovutih infekcija u odnosu na region uzorkovanja.

Nakon ispitivanja uticaja jačine pčelinjeg društva na pojavu, distribuciju i intenzitet mikrosporidijalnih i virusnih infekcija, ispitan je uticaj jačine društva

na pojavu i karakter mešovitih infekcija. Rezultati pokazuju odsustvo statistički značajnog uticaja jačine pčelinjeg društva na pojavu i karakter mešovitih infekcija. Dobijeni rezultat, kao i odsustvo značajnog uticaja jačine društva na distribuciju mikrosporidijalnih i virusnih infekcija, može se dovesti u vezu sa činjenicom da ispitivana društva nisu pokazivala kliničke simptome pomenutih infekcija. Naime, istraživanja su pokazala da u povoljnim klimatskim uslovima i u prisustvu kvalitetne hrane, imuni status zajednice kao makroorganizma drži infekciju pod kontrolom, odnosno smanjuje se intenzitet širenja pomenutih infekcija među negovateljicama (Aubert i sar., 2008). Dodatno, odsustvo značajnog uticaja jačine društva na intenzitet mikrosporidijalne infekcije u ovom radu u saglasnosti je sa istraživanjima Traver i sar. (2011). Nesumnjivo je da jačina pčelinjeg društva u određenoj meri utiče na pojavu mikrosporidijalnih, virusnih i mešovitih infekcija, što se iz rezultata ovog ispitivanja može videti, međutim, kao posledica prethodno iznetih tvrdnji, pomenuti uticaj nije statistički značajan.

6.2.6. Genetska identifikacija i filogenetska analiza virusa pčela iz Srbije. U cilju potvrde identifikacije virusne RNK pronađene u ispitivanim uzorcima, kao i analize stepena sličnosti sa sekvencama virusa uskladištenih u „GenBank“ - genskoj bazi podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>), izvršeno je sekvenciranje delova virusnih genoma. Sekvenciranje i filogenetska analiza ispitivanih virusa izvršena je u cilju utvrđivanja stepena sličnosti u nukleotidnom sastavu RNK izolata iz Srbije sa sekvencama iz Evrope i drugih delova sveta. Odabir uzoraka u kojima je utvrđeno prisustvo RNK nekog od ispitivanih virusa izvršeno je na osnovu izgleda amplifikacione krive nakon real-time RT-PCR analize. Izabrani su oni uzorci u kojima je kriva amplifikacije u određenom stepenu odstupala od izgleda idealne sigmoidne krive. Naime, amplifikacija ciljne nukleotidne sekvence tokom real-time PCR prolazi kroz tri faze koje reprezentuje amplifikaciona kriva: eksponencijalna, linearna i plato faza. Odstupanje u izgledu sigmoidne krive u toku linearne faze podrazumeva narušenu idealnu 2^n

stopu amplifikacije u svakom sledećem ciklusu. Strma amplifikaciona kriva u linearnoj fazi može biti posledica nepotpune podudarnosti prajmera i/ili proba sa ciljnim sekvencama. U slučaju detekcije RNK virusa to može značiti moguću pojavu mutacija u ciljnoj sekvenci (Mackay i sar., 2002), odnosno razlikovanje u nukleotidnom sastavu dobijene sekvence sa sekvencama deponovanim u genskoj bazi podataka. Za sekvenciranje je odabrano 9 RNK izolata pozitivnih na prisustvo RNK DWV, 2 RNK izolata pozitivna na prisustvo RNK ABPV, 2 RNK izolata pozitivna na prisustvo RNK CBPV i 3 RNK izolata pozitivna na prisustvo RNK SBV. Sekvenciranje delova genoma odabranih uzoraka izvršeno je po Sanger metodi uz izvođenje kapilarne elektroforeze u automatskom genetskom analizatoru 3130 (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD). Odabir prajmera za delove genoma detektovanih virusa koji su bili podvrgnuti sekvenciranju u skladu je sa preporukama laboratorije „Francuske agencije za bezbednost hrane, zaštitu životne sredine i bezbednost na radu“ (ANSES, 2011). Pravilan izgled pikova na elektroferogramu koji reprezentuju pojedinačne nukleotide analiziranih sekvenci, potvrdio je efikasnost primenjenog postupka sekvenciranja. Nakon upoređivanja sa drugim sekvencama koje se nalaze u genskoj bazi podataka, dobijene sekvence delova genoma ispitivanih virusa iz Srbije su prijavljene i nakon provera od strane genske baze, registrovane kao autentične. Sledeći korak u utvrđivanju genetske sličnosti sa sekvencama virusa koje su registrovane od strane drugih istraživača je filogenetska analiza dobijenih sekvenci iz Srbije. Filogenetska analiza je izvršena primenom kompjuterskog programa MEGA 6 (Tamura i sar., 2013). Poređenje sekvenci delova genoma pčelinjih virusa iz Srbije dobijenih nakon sekvenciranja sa sekvencama virusa deponovanim, od strane autora širom sveta, u gensku bazu podataka izvršeno je primenom „BLAST“ pretrage, jednog od najčešće primenjivanih alata u ove svrhe (Reddy i sar., 2013; Wang i sar., 2013; Tamura i sar., 2013). Srađivanje nukleotidnih sekvenci je vršeno primenom ClustalW algoritma (Thompson i sar., 1994) koji vrši višestruka poravnanja sekvenci. Budući da je svrha filogenetske analize uvid u stepen sličnosti sekvenci iz Srbije

sa drugim, izrada filogenetskog stabla i procena stepena sličnosti poređenih sekvenci je izvršena upotrebom „Neighbor Joining“ metode, koja se bazira na utvrđivanju udaljenosti poređenih sekvenci i „Maximum Parsimony“ metode, koja pri analizi koristi znakove (Mount, 2004). U proceni pouzdanosti filogenetskog stabla su iskorišćene statističke metode koje se baziraju na ponovnom slučajnom uzorkovanju podataka i testiranju konzistentnosti grupisanja (Mount, 2004). Izabran je „Bootstrap“ metod koji konstruiše novo slučajno višestruko poravnanje jednake dužine iz originalnog višestrukog poravnanja, pri čemu hiljadu ovakvih ponavljanja daje pouzdane rezultate.

Nakon „BLAST“ pretrage i upoređivanja parcijalne nukleotidne sekvence poliprotein gena (420 baznih parova) 8 prijavljenih sekvenci DWV iz Srbije sa drugim sekvencama, potvrđena je sličnost od 98 – 99 % sa sekvencama ovog virusa iz genske baze. Primenom „Maximum Parsimony“ analize sekvenci, utvrđena je genetska sličnost sekvenci iz Srbije sa sekvencama DWV iz Evrope i Azije, dok je jedna sekvenca iz Južne Amerike (JQ413340 poreklom iz Čilea), kao posebna grana filogenetskog stabla, odvaja od drugih sekvenci. Od 9 sekvenciranih DWV iz Srbije, dva imaju identičnu sekvencu (D4 i D5), stoga je u gensku bazu podataka prijavljena samo jedna od njih (D4 KM001905). Rezultati pokazuju da su sekvence iz Srbije grupisane u četiri filogenetske grupe (I – D1, D4 i D5; II – D2 i D6; III – D3 i D9; IV – D8), međutim na filogenetskom stablu se primećuje visok stepen sličnosti. Visok stepen podudarnosti sekvenci ovog virusa iz Srbije sa drugim sekvencama potvrđuje pretpostavku da zabeležena mala genetska udaljenost potiče od evolutivno skorašnje brze distribucije ovog virusa i *V. destructor* kao vektora širom sveta. Naime, DWV je prvi put identifikovan u izorku pčela poreklom iz Japana 80-tih godina prošlog veka (Bailey i Ball, 1991; Lanzi i sar., 2006). Zahvaljujući internacionalnoj i transkontinentalnoj trgovini infestiranim društvima, pčelinji krpelj se u poslednjih 50 godina brzo proširio infestirajući pčelinje zajednice širom sveta (Bailey i Ball, 1991). Već napomenuta uloga *V. destructor* kao efikasnog biološkog i mehaničkog vektora (Gisder i sar., 2009; Genersch i Aubert, 2010;

deMiranda i Genersch, 2010; Martin i sar., 2013) omogućila je da DWV za kratko vreme postane najčešće detektovan virus u pčelinjim društvima (Genersch i Aubert, 2010). Evolutivno gledano, ekspanzija ovog virusa za relativno kratko vreme dovela je do visoke stope genetske podudarnosti sekvenci DWV iz različitih krajeva sveta (Berényi i sar., 2007), stoga ne iznenađuje 98 - 99 % sličnosti sekvenci iz Srbije sa ostalim prijavljeni u genskoj bazi. Rezultati filogenetske analize pokazuju i odstupanja u podudarnosti virusa deformisanih krila i Varroa-destroyer virusa (VDV) koji je iskorišćen kao spoljašnja grupa za upoređivanje.

Nakon sekvenciranja delova genoma dva virusa akutne paralize pčela iz Srbije, zbog njihovog apsolutnog poklapanja u nukleotidnom redosledu, u gensku bazu podataka deponovana je jedna sekvenca pod oznakom Serbia A1, KM001899. Sekvence iz Srbije dužine 398 bp, nakon „BLAST“ pretrage imaju 93 - 97 % sličnosti sa sekvencama virusa deponovanih u genskoj bazi. Region genoma ABPV koji je sekvenciran odgovara nukleotidnoj sekvenci dela genoma koji kodira sintezu proteina kapsida virusa. Ovaj region je izabran jer je jedan od najčešće analiziranih. Bakonyi i sar. (2002) su upotrebili pomenutu sekvencu u izradi filogenetske analize svih do tada deponovanih sekvenci ovog virusa. Treba naglasiti rezultate filogenetske analize koji pokazuju da sekvence virusa akutne paralize iz Srbije formiraju monofiletičnu grupu. To praktično znači da su sekvence iz Srbije međusobno jako slične, međutim da se od drugih deponovanih sekvenci dovoljno razlikuju da formiraju zasebnu grupu. Nalaz gotovo identičnih sekvenci ABPV detektovanih u različitim pčelinjacima Srbije dokaz je intenzivnog prenošenja virusa među pčelama direktnim kontaktom, preko *V. destructor* i/ili aktivnostima pčelara (Jamnikar Ciglencečki i Tpolak, 2013). Veća genetska sličnost sekvenci ABPV iz Srbije sa sekvencama iz Mađarske se može objasniti geografskim položajem koji zauzimaju ove dve zemlje. Naime, oblasti koje čine granični pojas između Srbije i Mađarske su zbog bogatstva flore izuzetno atraktivne za pčelare, što zbog neposredne blizine većeg broja pčelinjih društava sa jedne i druge strane granice, olakšava širenje

virusnih infekcija između društava. Još jedan razlog koji govori u prilog ovoj tvrdnji je i česta trgovina maticama i rojevima između pčelara dve države, kako legalnim tako i ilegalnim putem. Sekvence virusa akutne paralize iz zapadne i istočne Evrope formiraju zasebnu filogenetsku grupu.

U cilju molekularne karakterizacije i filogenetske analize SBV, izabrana je parcijalna nukleotidna sekvenca poliprotein gena dužine 467 bp. Nakon molekularne identifikacije 3 RNK izolata SBV iz Srbije, u gensku bazu podataka deponovana je jedna sekvenca pod oznakom Serbia S1 (KM001901). „BLAST“ pretraga je pokazala podudarnost od 94 – 99% sekvenci iz Srbije sa sekvencama deponovanim u genskoj bazi. Sličnost sekvenci iz Srbije sa sekvencama iz kontinentalne Evrope, koje na filogenetskom stablu formiraju zasebnu grupu, posledica je umerenog širenja ovog virusa na evropskom kontinentu. Naime, u poređenju sa prethodna dva virusa, osnovni put širenja SBV jeste preko hrane, bolesnog i kanibalizovanog legla. Dokazano je prenošenje putem *V. destructor* (Shen i sar., 2005; Chen, 2005; Yue i sar., 2006), međutim ovakav vid transmisije ima sekundarni značaj. Ovo za posledicu ima sporije širenje virusa pa time i veći genetski diverzitet. To je i razlog sličnosti sekvenci iz Srbije sa austrijskim, francuskim i nemačkim sekvencama, a istovremeno i prilične udaljenosti od ruskih, britanskih i azijskih sekvenci. Opsežnije molekularne i filogenetske analize sekvenci ovog virusa iz zemalja u okruženju mogle bi utvrditi postojanje jedinstvene grupe sa sekvencama iz Srbije, kao što je to bio slučaj sa ABPV.

Nakon molekularne identifikacije dva RNK izolata CBPV iz Srbije, zbog njihovog apsolutnog poklapanja u nukleotidnom redosledu, u gensku bazu podataka deponovana je jedna sekvenca pod oznakom Serbia C1 (KM001900). Nakon „BLAST“ pretrage i upoređivanja parcijalne sekvence početnog RNK segmenta CBPV dužine 570 baznih parova utvrđena je identičnost u rasponu od 93 – 96 % sa sekvencama iz genske baze. Srpske i francuske sekvence formiraju monofiletičku grupu sa sekvencama iz Španije i Belgije, pri čemu je slična genetska udaljenost u odnosu na druge primećena kod sekvence iz Švajcarske.

Ovi rezultati govore u prilog razlika koje CBPV ispoljava, u taksonomskom i genetičkom smislu, u poređenju sa prethodna tri analizirana virusa. Rezultati filogenetske analize impliciraju drugačiji epizootološki karakter i posledično slabiji intenzitet geografske distribucije ovog virusa. Prikazana genetska udaljenost sekvenci iz Srbije u odnosu na druge, može se objasniti većom stopom mutacija, odnosno rearanžmana nukleotida (Grabensteiner i sar., 2001; Yang i sar., 2013).

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz aktuelne literature, može se zaključiti sledeće:

1. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali veću osetljivost metode PCR u odnosu na mikroskopski pregled u otkrivanju mikrosporidijalnih infekcija pčelinjih društava.
2. Prisustvo mikrosporidija iz roda *Nosema* je mikroskopskim pregledom ustanovljeno kod 72% od ukupno 150 ispitanih uzoraka poreklom od pčelinjih društava sa teritorije Republike Srbije.
3. Prisustvo DNK mikrosporidija iz roda *Nosema* utvrđeno je kod 88% ispitanih uzoraka, odnosno kod 18% uzoraka u kojima mikroskopskim pregledom nije utvrđeno prisustvo spora.
4. U svim ispitivanim uzorcima u kojima je potvrđena mikrosporidijalna infekcija primenom PCR tehnike je utvrđeno prisustvo DNK mikrosporidije *Nosema ceranae*. Ni u jednom ispitivanom uzorku nije utvrđeno prisustvo DNK mikrosporidije *Nosema apis*.
5. Jačina pčelinjeg društva ne utiče na pojavu mikrosporidijalnih infekcija u Srbiji. Nije utvrđeno prisustvo statističke značajnosti u regionalnoj distribuciji uzoraka pozitivnih na prisustvo mikrosporidija *Nosema* vrste, što implicira da pojava mikrosporidijalnih infekcija pčela u Srbiji ne zavisi od regiona uzorkovanja.
6. Primenom real-time RT-PCR tehnike bazirane na Taqman probama u 87,33 % uzoraka na teritoriji Srbije je utvrđeno prisustvo nukleinskih kiselina ispitivanih pčelinjih virusa. Zastupljenost RNK virusa deformisanih krila je utvrđena u 74 %, virusa akutne paralize pčela u

49,3 %, virusa mešinastog legla u 24 % i virusa hronične paralize u 6,7 % ispitivanih uzoraka. Odsustvo nukleinskih kiselina ispitivanih virusa pčela je zabeleženo u 12,67 % obrađenih uzoraka.

7. Zastupljenost virusa akutne paralize, virusa mešinastog legla i virusa hronične paralize značajno zavisi od regiona, dok u slučaju virusa deformisanih krila nije zabeležena značajnost u regionalnoj distribuciji. Jačina pčelinjeg društva ne utiče na distribuciju ispitivanih virusa, kao ni na intenzitet virusnih infekcija iskazan kroz Ct vrednost.
8. Prisustvo RNK više od jednog virusa je zabeleženo u 56,67 % uzoraka iz Srbije.
9. Zastupljenost mešovutih (mikrosporidijalno-virusnih) infekcija značajno zavisi od regiona uzorkovanja. Nije utvrđen statistički značajan uticaj jačine pčelinjeg društva na zastupljenost i karakter mešovutih infekcija.
10. Rezultati filogenetske analize pokazuju odgovarajući stepen genetske sličnosti 8 različitih sekvenci virusa deformisanih krila, 1 sekvence virusa akutne paralize pčela, 1 sekvence virusa hronične paralize pčela i 1 sekvence virusa mešinastog legla iz Srbije sa virusima utvrđenim u pčelinjim društvima širom sveta.
11. Informacije o nukleotidnom sastavu sekvenci pčelinjih virusa iz Srbije pružaju uvid u promene na posmatranim delovima genoma i upotpunjuju filogenetske analize evropskih sojeva ispitivanih virusa. Informacije su značajne i u pogledu istraživanja promena u genetskom sastavu koje bi mogle da dovedu do nastajanja novih i/ili virulentnijih sojeva.

8. ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je deo projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, ev. br. III46002 pod nazivom „Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane”, pod rukovodstvom prof. dr Zorana Stanimirovića.

9. SPISAK LITERATURE

1. Adams MJ, Carstens EB, 2012, Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 1-12.
2. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Carstens EB, 2013, Recently-agreed changes to the International Code of Virus Classification and Nomenclature. *Archive of Virology*, 158, 2633-2639.
3. Ai H, Yan X, Han R, 2012, Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109:160-164.
4. Aizen MA, Harder LD, 2009, The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, 19(11), 915-918.
5. Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Le Conte Y, 2010, Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 12(3), 774-782.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2002, Manipulating Proteins, DNA, and RNA, In: *Molecular Biology of the Cell*; Garland Science, New York, 4th Edition, 508-509.
7. Allen M, Ball BV, White RF, Antoniw JF, 1986, The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *Journal of Apicultural Research*, 25:100-105.
8. Allen MF, Ball BV, 1995, Characterisation and serological relationships of strains of Kashmir bee virus. *Annals of Applied Biology*, 126, 471-484.
9. Allen MF, Ball BV, 1996, The incidence and world distribution of honey bee viruses, *Bee World* 77, 141-162.
10. Anderson DL, 1984, Comparison of serological techniques for detecting and identifying honeybee viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44, 233-243.
11. Anderson DL, 1991, Kashmir bee virus - a relatively harmless virus of honey bee colonies. *American Bee Journal*, 131, 767-770.
12. Anderson DL, East IJ, 2008, The latest buzz about colony collapse disorder. *Science* 319, 724.
13. Anderson DL, Gibbs AJ, 1988, Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. *Journal of General Virology*, 69, 1617-1625.

14. Antúnez K, Anido M, Garrido-Bailon E, Botias C, Zunino P, Martínez-Salvador A, Higes M, 2012, Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Research in Veterinary Science*, 93 (3), 1441-1445.
15. Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P, 2006, Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 67-70.
16. 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, 2284-2290.
17. Ares AM, Nozal MJ, Bernal JL, Martín-Hernández R, Higes M, Bernal J, 2012 Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 899, 146-153.
18. Aubert M, Ball BV, Fries I, Moritz R, Milani N, Bernardinelli I, 2008, *Virology and the honey bee*. Brussels: European Commission, Directorate-General for Research.
19. Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcaro C, Gallina A, Mutinelli F, 2010, Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2), 164-170.
20. Bailey L, 1965, The occurrence of chronic and acute bee paralysis viruses in bees outside Britain. *Journal of Invertebrate Pathology*, 7, 167-169.
21. Bailey L, 1967, The incidence of virus diseases in the honey bee. *Annals of Applied Biology*, 60, 43-48.
22. Bailey L, 1969, The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Annals of Applied Biology*, 63, 483-491.
23. Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD, 1963, Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 21, 390-395.
24. Bailey L, Gibbs J, 1964, Acute infection of bees with paralysis virus. *Journal of Insect Pathology*, 6(4), 395-407.
25. Bailey L, Milne RG, 1969, The multiplication regions and interaction of acute and chronic bee-paralysis viruses in adult honey bees. *Journal of General Virology*, 4(1), 9-14.
26. Bailey L, Fernando EFW, 1972, Effects of sacbrood virus on adult honeybees. *Annals of Applied Biology*, 72:27-35.

27. Bailey L, Woods RD, 1977, Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *Journal of General Virology*, 37, 175-182.
28. Bailey L, Ball BV, 1991, *Honey Bee Pathology*, 2nd ed. Academic Press, London.
29. Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD, 1964, Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 23(3), 425-429.
30. Bailey L, Ball BV, Perry JN, 1983, Honeybee paralysis: its natural spread and its diminished incidence in England and Wales. *Journal of Apicultural Research*, 22, 191-195.
31. Baker AC, Schroeder DC, 2008, Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 239-242.
32. Bakonyi T, Grabensteiner E, Kolodziejek J, Rusvai M, Topolska G, Ritter W, Nowotny N, 2002, Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6446-6450.
33. Bakonyi, T, Farkas R, Szendroi A, Dobos-Kovacs M, Rusvai M, 2002, Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie* 33, 63-74.
34. Balbiani G, 1882, Sur les microsporidies ou psorospermies des articules. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 95, 1168-1171.
35. Ball BV, 1985, Acute paralysis virus isolates from honeybee, *Apis mellifera*, colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 24:115-119.
36. Ball BV, 1989, *Varroa jacobsoni* as a virus vector, in: Cavalloro R, (Ed.), Present status of varroatosis in Europe and progress in the varroa mite control. Udine, Italy, pp. 241-244.
37. Ball BV, 1993, The damaging effects of *Varroa jacobsoni*, in: Matheson A, (Ed.), Living with Varroa. International Bee Research Association, Cardiff, pp. 9-16.
38. Ball BV, Allen ME, 1988, The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*, *Annals of Applied Biology*, 113, 237-244.
39. Ball BV, Bailey L, 1997, Viruses. In: Morse RA, Flottum K, (Eds.), *Honey Bee Pests*.
40. Becnel JJ, Andreadis TG, 1999, Microsporidia in insects, in: Wittner M, Weiss LM, *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society for Microbiology, Press Washington, pp 447-501.

41. Bekesi L, Ball BV, Dobos-Kovacs M, Bakonyi T, Rusvai M, 1999, Occurrence of acute paralysis virus of the honey bee (*Apis mellifera*) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Acta Veterinaria Hungarica*, 47, 319–324.
42. Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S, 2001, Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2384–2387.
43. Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N, 2006, Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2414–2420.
44. Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Topolska G, Ritter W, Nowotny N, 2007, Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3605–3611.
45. Bernal J, Martín-Hernández R, Diego JC, Nozal MJ, González-Porto AV, Bernal JL, Higes M, 2011, An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. *Pest Management Science*, 67, 1320–1331.
46. Bigliardi E, Sacchi L, 2001, Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection*, 3(5), 373–379.
47. Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thiery R, 2008, First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 99, 348–350.
48. Blanchard P, Regnault J, Schurr F, Dubois E, Ribière M, 2012, Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. *Journal of Virological Methods*, 180(1), 26–31.
49. Boncristiani HF, Di Prisco G, Pettis JS, Hamilton M, Chen YP, 2009, Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in the honey bee, *Apis mellifera*. *Virology Journal*, 6(1), 221.
50. Borneck R, Viry A, Martín-Hernández R, Higes M, 2010, Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *Journal of Apicultural Research*, 49: 334–336.
51. Botías C, Anderson DL, Meana A, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Higes M, 2012, Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae*

- (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(1), 108-113.
52. Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Garrido-Bailón E, Nanetti A, Meana A, Higes M, 2011, *Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology Reports*, 4, 57-65.
 53. Bourgeois AL, Rinderer TE, Beaman LD, Danka RG, 2010, Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), 53-58.
 54. Bradbear N, 2009, *Bees and Their Role in Forest Livelihoods. A Guide to the Services Provided by Bees and the Sustainable Harvesting, Processing and Marketing of Their Products. Non-Wood Forest Products 19.* Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
 55. Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, Deshpande SV, McCubbin PE, Seccomb RA, Welch PM, Williams T, Firth DR, Skowronski E, Cramer RA, 2010, Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE* 5, e13181.
 56. Burnside CE, 1945, The cause of paralysis of honey bees. *American Bee Journal*, 85, 354-363.
 57. Calderon R, Van Veen J, Arce HG, Esquivel ME, 2003, Presence of deformed wing virus and Kashmir bee virus in Africanized honey bee colonies in Costa Rica infested with *Varroa destructor*. *Bee World*, 84(3), 112-116.
 58. Celle O, Blanchard P, Olivier V, Schurr F, Cougoule N, Faucon JP, Ribière M, 2008, Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Research*, 133(2), 280-284.
 59. Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M, 2006, A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Tai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91, 69-73.
 60. Chauzat MP, Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, Cougoule N, Faucon JP, 2007, Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research*, 46, 127-128.
 61. Chejanovsky N, Ophir R, Schwager MS, Slabezki Y, Grossman S, Cox-Foster D, 2014, Characterization of viral siRNA populations in honey bee colony collapse disorder. *Virology*, 454, 176-183.
 62. Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS, 2008, *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidean infection of the European honey

- bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 186-188.
63. Chen YP, Evans J, Feldlaufer MF, 2006, Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 152-159.
 64. Chen YP, Evans JD, 2007, Historical presence of Israeli Acute Paralysis Virus in honey bees from the United States. *American Bee Journal*, 147, 1027-1028.
 65. Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gundensen-Rindal DAWN, Pettis JS, 2009, Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera* L. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2), 142-147.
 66. Chen YP, Pettis JS, Feldlaufer MF, 2005, Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L., *Journal of Invertebrate Pathology*, 90, 118-121.
 67. Chen YP, Siede R, 2007, Honey bee viruses. *Advances in virus research*, 70, 33-80.
 68. Chen YP, Zhao Y, Hammond J, Hsu HT, Evans JD, Feldlaufer MF, 2004, Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87, 84-93.
 69. Choe SE, Nguyen LTK, Noh JH, Koh HB, Jean YH, Kweon CH, Kang SW, 2012, Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean *Apis cerana* populations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109:330-333.
 70. Choi Y, Lee Y, Cho KS, Lee S, Russell J, Choi J, Jeong G, 2011, Chimerical nature of the ribosomal RNA gene of a *Nosema* species. *Journal of invertebrate pathology*, 107(1), 86-89.
 71. Christian P, Fauquet C, Gorbalenya A, King A, Knowles N, Le Gall O, Stanway G, 2005, Picornavirales: A proposed order of positive sense RNA viruses. ICTV Poster Session.
 72. Copley TR, Jabaji SH, 2012, Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 15-24.
 73. Cornman RS, Boncristiani H, Dainat B, Chen Y, Weaver D, Evans JD, 2013, Population-genomic variation within RNA viruses of the Western honey bee, *Apis mellifera*, inferred from deep sequencing. *BMC genomics*, 14(1), 154.
 74. Corradi N, Keeling PJ, 2009, Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews*, 23(1), 1-8.

75. Costa C, Tanner G, Lodesani M, Maistrello L, Neumann P, 2011, Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108(3), 224-225.
76. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI, 2007, A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287.
77. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P, 2012, Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS one*, 7(2), e32151.
78. Dall DJ, 1985, Inapparent infection of honey bee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia. *Annals of Applied Biology*, 106(3), 461-468.
79. Davison S, Leat N, Benjeddou M, 2003, Development of molecular tools for honeybee virus research: the South African contribution. *African Journal of Biotechnology*, 2, 867-878.
80. De Graaf DC, Raes H, Sabbe G, De Rycke PH, Jacobs FJ, 1994, Early Development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the Midgut Epithelium of the Honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 63(1), 74-81.
81. De la Rúa P, Jaffe R, Dall 'Olio R, Muñoz I, Serrano J, 2009, Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie* 40:263-284.
82. de Miranda J, Genersch E, 2010, Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103:48-61.
83. de Miranda JR, 2008, Diagnostic techniques for virus detection in honey bees. In: Aubert MFA, Ball BV, Fries I, Milani N, Morritz RFA, (Eds.), *Virology and the Honey Bee. VIth Framework*. EC Publications, Brussels, pp. 121-232.
84. de Miranda JR, Cordoni G, Budge G, 2010, The acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 10, 30-47.
85. de Miranda JR, Drebot M, Tyler S, Shen M, Cameron CE, Stoltz DB, Camazine SM, 2004, Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *Journal of General Virology*, 85, 2263-2270.

86. de Miranda JR, Fries I, 2008, Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 184-189.
87. Delaplane KS, van der Steen J, Guzman-Novoa E, 2013, Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1.
88. Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani HF, Evans JD, Chen Y, 2011, *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*, 92(1), 151-155.
89. Dönhoff, Leuckart R, 1857, Ueber Fadenpilze im Darm der Biene. *Bien Zeit*, 13: 66-7.
90. Dussaubat C, Maisonnasse A, Alaux C, Tchamitchan S, Brunet JL, Plettner E, Le Conte Y, 2010, *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*, 36(5), 522-525.
91. Ellis JD, Munn PA, 2005, The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86, 88-101.
92. European Parliament, 2010, Resolution of 25 November 2010 on the situation in the beekeeping sector [WWW document]. URL <http://www.europarl.europa.eu/sides/>.
93. Evans JD, Schwarz RS, 2011, Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, 19(12), 614-620.
94. Faucon JP, 2005, La Nosérose, *La Santé de l'Abeille* 209, 344-368.
95. Faucon JP, Vitu C, Russo P, Vignoni M, 1992, Diagnosis of acute paralysis – application to epidemic honey bee diseases in France during 1990. *Apidologie*, 23, 139-146.
96. Fievet J, Tentcheva D, Gauthier L, De Miranda J, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2006, Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virology Journal*, 3(1), 16.
97. Flegel TW, Pasharawipas T, 1995, A proposal for typical eukaryotic meiosis in microsporidians. *Canadian journal of microbiology*, 41(1), 1-11.
98. Forgách P, Bakonyi T, Tapasztó Z, Nowotny N, Rusvai M, 2008, Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: situation before joining the European Union. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(2), 235-238.
99. Forsgren E, Fries I, 2010, Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, 170(3), 212-217.
100. Forsgren E, Fries I, 2013, Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 78-82.

101. Frank SA, 1996, Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology* 71, 37-78.
102. Frank SA, Schmid-Hempel P, 2008, Mechanisms of pathogenesis and the evolution of parasite virulence. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 396-404.
103. Franzen C, 2005, How do microsporidia invade cells?. *Folia parasitologica*, 52(1-2), 36-40.
104. Freiberg M, De Jong D, Message D, Cox-Foster D, 2012, First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 11(3), 3310-3314.
105. Fries I, 1988, Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie* 19, 319-328.
106. Fries I, 1993, *Nosema apis*, a parasite in the honey bee colony. *Bee World*.
107. Fries I, 1997, Protozoa. In: Morse RA, Flottum K, (Eds.), *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, third ed. A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA, pp. 59-76.
108. Fries I, 2010, *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 73-79.
109. Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ, 1996, *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32, 356-365.
110. Fries I, Forsgren E, 2008, Undersökning av spridningen av *Nosema ceranae* i Sverige. Investigation of the distribution of *Nosema ceranae* in Sweden *Bitidningen* 107, januari/februari, pp. 26-27.
111. Fries I, Martín R, Meana A, García-Palencia P, Higes M, 2006, Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45, 230- 233.
112. Fujiyuki T, Takeuchi H, Ono M, Ohka S, Sasaki T, Nomoto A, Kubo T, 2004, Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honeybees. *Journal of virology*, 78(3), 1093-1100.
113. Fyfe W, 1945, *Schweiz. Bienenztg.*, 2, 1-8.
114. García-Palencia P, Martín-Hernández R, González-Porto AV, Marín P, Meana A, Higes M, 2010, Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-workers honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 49, 278-283.

115. Gauthier L, Tentcheva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2007, Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie*, 38, 426-435.
116. Genersch E, Aubert M, 2010, Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41, 54.
117. Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, Berg S, Ritter W, Mühlen W, Gisder S, Meixner M, Liebig G, Rosenkranz P (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41, 332-352.
118. Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM, Carter MJ, 1999, The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *Journal of General Virology*, 80(6), 1541-1549.
119. Giersch T, Berg T, Galea F, Hornitzky M, 2009, *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* 40, 117-123.
120. Gisder S, Aumeier P, Genersch E, 2009, Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 90(2), 463-467.
121. Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz MC, Linde A, Genersch E, 2010, Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*?. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3032-3038.
122. Govan VA, Leat N, Allsopp M, Davison S, 2000, Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology*, 277(2), 457-463.
123. Grabensteiner E, Ritter W, Carter MJ, Davison S, Pechhacker H, Kolodziejek J, Boecking O, Derakhshifar I, Moosbeckhofer R, Licek E, Nowotny N, 2001, Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 93-104.
124. Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Correa-Benítez A, Espinosa-Montaña LG, Uribe-Rubio JL, 2013, A scientific note on the first detection of black queen cell virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Mexico. *Apidologie*, 44(4), 382-384.
125. Hassanein MH, 1953, The influence of infection with *Nosema apis* on the activities and longevity of worker honey bee. *Annals of Applied Biology*, 40, 418-423.

126. Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E, 2011, Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108, 167-173.
127. Higes M, Martín R, Meana A, 2006, *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 93-95.
128. Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Barrios L, 2008, How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659-2669.
129. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, 2010, *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375-392.
130. Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R, 2013, *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 17-29.
131. Highfield AC, El Nagar A, Mackinder LC, Laure MLN, Hall MJ, Martin SJ, Schroeder DC, 2009, Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7212-7220.
132. Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RFA, 2012, Survival and immune response of drones of a nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109, 297-302.
133. Huang WF, Bocquet M, Lee KC, Sung IH, Jiang JH, Chen YW, Wang CH, 2008, The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97: 9-13.
134. Huang WF, Jiang JH, Chen YW, Wang CH, 2007, A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 38, 30-37.
135. Hung AC, Peng CYS, Shimanuki H, 2000, Nucleotide sequence variation in Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* L. and *Varroa jacobsoni* Oud.. *Apidologie*, 31,17-23.
136. Hung AC, Shimanuki H, Knox DA, 1996, Inapparent infection of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in the U.S. honey bees. *American Bee Journal*, 136:874-876.
137. Invernizzi C, Abuda C, Tomascoa I, Harriet J, Ramallob G, Campáb J, Katzb H, Gardiolb G, Mendozac Y, 2009, Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101, 150-153.
138. Ironside JE, 2007, Multiple losses of sex within a single genus of microsporidia. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 48.

139. Jamnikar Ciglencečki U, Toplak I, 2012, Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus. *Journal of Virological Methods*, 184(1), 63-68.
140. Jamnikar Ciglencečki U, Toplak I, 2013, Genetic diversity of acute bee paralysis virus in Slovenian honeybee samples. *Acta Veterinaria Hungarica*, 61(2), 244-256.
141. Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J and Vivares CP, 2001, Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414:450-453.
142. Keeling P, 2009, Five questions about microsporidia. *PLoS pathogens*, 5(9), e1000489.
143. King AM, Adams MJ, Lefkowitz EJ, Carstens EB, (Eds.). 2012, *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
144. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton R, 2007, Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 1-10.
145. Kralj J, Fuchs S, 2010, *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*, 41(1), 21-28.
146. Kudo RR, 1947, *Pelomyxa carolinensis* Wilson. II. Nuclear division and plasmotomy. *Journal of morphology*, 80(1), 93-143.
147. Kukielka D, Esperón F, Higes M, Sánchez-Vizcaíno JM, 2008, A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Virological Methods*, 147(2), 275-281.
148. Kulinčević JM, Rothenbuhler WC, 1989, The effects of artificial infection with chronic bee paralysis virus on queens from strains of honeybees resistant or susceptible to hairless-black syndrome. *Journal of Apicultural Research*, 28, 79-80.
149. Kulinčević JM, Rothenbuhler WC, Stairs GD, 1973, The effect of presence of a queen upon outbreak of a hairless-black syndrome in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 21, 241-247.
150. Lanzi G, de Miranda JR, Boniotti MB, Cameron CE, Lavazza A, Capucci L, Rossi C, 2006, Molecular and biological characterization of deformed

- wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology*, 80(10), 4998-5009.
151. Larsson JIR, 1999, Identification of microsporidia. *Acta Protozoologica*, 38, 161-197.
 152. Le Gall O, Christian P, Fauquet CM, King AM, Knowles NJ, Nakashima N, Gorbalenya AE, 2008, Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T= 3 virion architecture. *Archives of virology*, 153(4), 715-727.
 153. Leat N, Ball B, Govan V, Davison S, 2000, Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *Journal of General Virology*, 81(8), 2111-2119.
 154. Liu TP, 1992, Oöcytes degeneration in the queen honey bee after infection by *Nosema apis*. *Tissue and Cell*, 24(1), 131-138.
 155. Locke B, Forsgren E, de Miranda JR, 2014, Increased Tolerance and Resistance to Virus Infections: A Possible Factor in the Survival of *Varroa destructor*-Resistant Honey Bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 9(6), e99998.
 156. Lotmar R, 1936, *Nosema*-Infektion und ihr Einfluss auf die Entwicklung der Futtersaftdrüse. *Schweiz. Bienenztg*. 59 (33-36), 100-104.
 157. Lotmar R, 1939, Der Eiweiss-Stoffwechsel im Bienenvolk (*Apis mellifica*) während der Überwinterung. *Landwirtschaft. Jahrb. Schweiz* 54, 34-69.
 158. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A, 2002, Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292-1305.
 159. Malone LA, Gatehouse HS, Tregidga EL, 2001, Effects of Time, Temperature, and Honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a Parasite of the Honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 77, 258-268.
 160. Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Edelbaum O, Tanne E, Sela I, 2007, Isolation and characterization of IAPV, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for intra- and inter-species recombination. *Journal of General Virology*, 88, 3428-3438.
 161. Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, Sela I, 2009, IAPV, a bee affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Molecular Biology*, 18, 55-60.
 162. Martin SJ, Ball BV, Carreck NL, 2013, The role of deformed wing virus in the initial collapse of varroa infested honey bee colonies in the UK. *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 251-258.
 163. Martin SJ, Hardy J, Villalobos E, Martin-Hernández R, Nikaido S, Higes M, 2013, Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically. *Environmental Microbiology Reports*, 1-4.

164. Martínez J, Leal G, Conget P, 2012, *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitology Research*, 111, 601-607.
165. Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, Higes M, 2012, Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?. *Environmental Microbiology*, 14(8), 2127-2138.
166. Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, Higes M, 2007, Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6331-6338.
167. Martín-Hernández R, Meana A, García-Palencia P, Marín P, Botías C, Garrido-Bailón E, Barrios L, Higes M, 2009, Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2554-2557.
168. Mayack C, Naug D, 2009, Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 185-188.
169. McMenamin AJ, Genersch E, 2015, Honey bee colony losses and associated viruses. *Current Opinion in Insect Science*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.015>.
170. Medici SK, Sarlo EG, Porrini MP, Braunstein M, Eguaras MJ, 2012, Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitology Research*, 110, 859-864.
171. Mehlhorn H, 2008, *Encyclopedia of Parasitology: AM (Ed.) (Vol. 1)*. Springer.
172. Mingxiao M, Yanna Y, Xiaoli X, Lin Z, Yongfei L, Zhidong L, 2013, Genetic characterization of VP1 gene of seven Sacbrood virus isolated from three provinces in northern China during the years 2008-2012. *Virus Research*, 176(1), 78-82.
173. Möckel N, Gisder S, Genersch E, 2011, Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *Journal of General Virology*, 92(2), 370-377.
174. Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Kadowaki T, 2012, Molecular identification of Chronic bee paralysis virus infection in *Apis mellifera* colonies in Japanese. *Viruses*, 4(7), 1093-1103.
175. Moritz RF, de Miranda J, Fries I, Le Conte Y, Neumann P, Paxton RJ, 2010, Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, 41(3), 227-242.

176. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT, 1998, Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24(6), 954-8.
177. Morse RA, Calderone NW, 2000, The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee Culture*, 128(3), 1-15.
178. Mount DW, 2004, *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
179. Muli E, Patch H, Frazier M, Frazier J, Torto B, Baumgarten T, Grozinger C, 2014, Evaluation of the Distribution and Impacts of Parasites, Pathogens, and Pesticides on Honey Bee (*Apis mellifera*) Populations in East Africa. *PloS one*, 9(4), e94459.
180. Nageli KW, 1857, Uber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot Z*, 15, 760-761.
181. Nageli KW, 1857, Uber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot Z*, 15, 760-761.
182. Nakjang S, Williams TA, Heinz E, Watson AK, Foster PG, Sendra KM, Embley TM, 2013, Reduction and expansion in microsporidian genome evolution: new insights from comparative genomics. *Genome biology and evolution*, 5(12), 2285-2303.
183. Naug D, Gibbs A, 2009, Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*, 40(6), 595-599.
184. Neumann P, Carreck N, 2010, Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49, 1-6.
185. Nielsen SL, Nicolaisen M, Kryger P, 2008, Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie*, 39, 310-314.
186. Nordström S, 2003, Distribution of deformed wing virus within honey bee (*Apis mellifera*) brood cells infested with the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Experimental & Applied Acarology*, 29(3-4), 293-302.
187. Nordström S, 2003, Distribution of deformed wing virus within honey bee (*Apis mellifera*) brood cells infested with the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Experimental & Applied Acarology*, 29(3-4), 293-302.
188. Office International des Epizooties (OIE), 2008, *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*, <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008>.
189. Office International des Epizooties (OIE), 2013, *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*, <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2013>.

190. Olivier V, Blanchard P, Chaouch S, Lallemand P, Schurr F, Celle O, Ribière M, 2008, Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus research*, 132(1), 59-68.
191. Ongus JR, Peters D, Bonmatin JM, Bengsch E, Vlak JM, van Oers MM, 2004, Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, 85(12), 3747-3755.
192. Palacios G, Hui J, Quan PL, Kalkstein A, Honkavuori KS, Bussetti AV, Conlan S, Evans J, Chen YP, vanEngelsdorp D, Efrat H, Pettis J, Cox-Foster D, Holmes EC, Briese T, Lipkin WI, 2008a, Genetic analysis of Israel Acute Paralysis Virus: distinct clusters are circulating in the United States. *Journal of Virology*, 82, 6209-6217.
193. Paxton R, 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, 558-565.
194. Pettis J, Delaplane KS, 2010, Coordinated responses to honey bee decline in the USA. *Apidologie* 41, 256-263.
195. Petrovic T, Vidanovic D, Stojanov I, Lupulovic D, Lazic G, 2013, First molecular detection of six honeybee viruses in Serbian apiaries. *Proceedings, 10th International Symposium Modern Trends in Livestock Production, Belgrade, 2 - 4 October, Institute for Animal Husbandry, Belgrade 2013*, 627:639.
196. Ptaszyńska AA, Borsuk G, Woźniakowski G, Gnat S, Małek W, 2014, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybees. *FEMS microbiology letters*, 357(1), 40-48.
197. Rana R, Rana BS, Kaushal N, Kumar D, Kaundal P, Rana K, Sharma HK, 2011, Identification of sacbrood virus disease in honeybee, *Apis mellifera* L. by using ELISA and RT-PCR techniques. *Indian Journal of Biotechnology*, 10(3), 274-284.
198. Reddy KE, Noh JH, Yoo MS, Kim YH, Kim NH, Doan HTT, Kang SW, 2013, Molecular characterization and phylogenetic analysis of deformed wing viruses isolated from South Korea. *Veterinary Microbiology*, 167(3), 272-279.
199. Ribière M, Triboulot C, Mathieu L, Aurieres C, Faucon JP, Pepin M, 2002, Molecular diagnostic of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 33, 339-351.
200. Ribiere M, Lallemand P, Iscache AL, Schurr F, Celle O, Blanchard P, Faucon JP, 2007, Spread of infectious chronic bee paralysis virus by

- honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7711-7716.
201. Ribière M, Ball BV, Aubert M, 2008, Natural history and geographic distribution of honey bee viruses, in: Aubert M, Ball BV, Fries I, Moritz RFA, Milani N, Bernardinelli I, (Eds.), *Virology and the honey bee*, European Communities, Luxembourg, 15-84.
 202. Ribière M, Olivier V, Blanchard P, 2010, Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other?. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 120-131.
 203. Rinderer TE, Rothenbuhler WC, 1976, Characteristic field symptoms comprising honeybee hairless-black syndrome induced in the laboratory by a virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27, 215-219.
 204. Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL, 2011, Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PloS one*, 6(6), e20656.
 205. Sagastume S, del Águila C, Martín-Hernández R, Higes M, Henriques-Gil N, 2011, Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environmental microbiology*, 13(1), 84-95.
 206. Santrac V, Granato A, Mutinelli F, 2009, First detection of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* from Bosnia and Herzegovina, *Proc. Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization"* (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).
 207. Santrač (2013) Dokazivanje prisustva virusnih infekcija u zajednicama *Apis mellifera* primeno molekularno bioloških metoda. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet Univerzitet u Novom Sadu.
 208. Shafer AB, Williams GR, Shutler D, Rogers RE, Stewart DT, 2009, Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) and bees (Hymenoptera: Apidae) suggests both cospeciation and a host-switch. *The Journal of Parasitology* 95, 198-203.
 209. Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D, 2005, Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *Journal of General Virology*, 86(8), 2281-2289.
 210. Shimanuki H, 1980, Beekeeping in the United States. *Agriculture Handbook*, 335, 118-128.
 211. Shutler D, Head K, Burgher-MacLellan KL, Colwell MJ, Levitt AL, Ostiguy N, Williams GR, 2014, Honey Bee *Apis mellifera* Parasites in the

- Absence of *Nosema ceranae* Fungi and *Varroa destructor* Mites. *PloS one*, 9(6), e98599.
212. Siede R, Buchler R, 2003, Symptomatic black queen cell virus infection of drone brood in Hessian apiaries. *Berlin Munch Tierarztl Wochenschr*, 116, 130-133.
 213. Siede R, Derakhshifar I, Otten C, Berenyi O, Bakonyi T, Koglbberger H, Buchler R, 2005, Prevalence of Kashmir bee virus in central Europe. *Journal of Apicultural Research*, 44, 131-132.
 214. Siede R, König M, Büchler R, Failing K, Thiel HJ, 2008a, A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies, *Apidologie*, 39:650-661.
 215. Siede R, Berg S, Meixner M, 2008b, Effects of symptomless infections with *Nosema* sp. on honey bee colonies. In: *OIE-Symposium Diagnosis and Control of Bee Diseases*, August 26-28, 2008. Freiburg, Germany.
 216. Simeunović P, Stevanović J, Vidanović D, Nišavić J, Radović D, Stanišić L, Stanimirović Z, 2014a, A survey of deformed wing virus and acute bee paralysis virus in honey bee colonies from Serbia using real-time RT-PCR. *Acta Veterinaria*, 64(1), 81-92.
 217. Simeunović P, Stevanović J, Ćirković D, Stanišić Lj, Stanimirović Z, 2013a, Klinički pregled i zazimljavanje pčela. *Zbornik radova i kratkih sadržaja*, 24. Savetovanje veterinara Srbije, 12-15. septembar 2013. pp. 77-84. Zlatibor, Srbija.
 218. Simeunović P, Stevanović J, Glavinić U, Stanimirović Z, 2013b, Nozemoza i askosferoza - klinička slika, dijagnostika i terapija. *Zbornik radova i kratkih sadržaja*, 24. Savetovanje veterinara Srbije, 12-15. septembar 2013. pp. 85-89. Zlatibor, Srbija.
 219. Simeunović P, Trošelj V, Stevanović J, Ćirković D, Stanimirović Z, 2013c, Virusne infekcije pčela. *Zbornik radova i kratkih sadržaja*, 24. Savetovanje veterinara Srbije, 12-15. septembar 2013. pp. 97-102. Zlatibor, Srbija.
 220. Simeunovic P, Stevanovic J, Cirkovic D, Radojicic S, Lakic N, Stanisic Lj, Stanimirovic Z, 2014b, *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *Journal of Apicultural Research*, 53(5), 545-554.
 221. Slamovits CH, Fast NM, Law JS, Keeling PJ, 2004, Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites. *Current Biology*, 14(10), 891-896.
 222. Smart MD, Sheppard WS, 2012, *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1), 148-151.

223. Soroker V, Hertzroni A, Yakobson B, David D, David A, Voet H, 2011, Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie*, 42: 192-199.
224. Stanimirovic, Z, Stevanovic, J, Andjelkovic, M, 2005, Chromosomal diversity in *Apis mellifera carnica* from Serbia. *Apidologie* 36, 31-42.
225. Stanimirovic Z, Stevanovic J, Bajic V, Radovic I, 2007, Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests in vivo. *Mutation Research*, 628(1): 1-10.
226. Stevanovic J, Simeunovic P, Gajic B, Lakic N, Radovic D, Fries I, Stanimirovic Z, 2013, Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie*, 44: 522-536.
227. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic RS, 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* 41: 49-58.
228. Stoltz D, Shen XR, Boggis C, Sisson G, 1995, Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *Journal of Apicultural Research*, 34, 153-160.
229. Sumner DA, Boriss H, 2006, Bee-economics and the leap in pollination fees. *Agricultural and Resource Economics Update*, 9(3), 9-11.
230. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007, MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1596-1599.
231. Tapasztó Z, Forgách P, Kövágó C, Békési L, Bakonyi T, Rusvai M, 2009, First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Veterinaria Hungarica*, 57, 383-388.
232. Tay WT, O'Mahony EM, Paxton RJ, 2005, Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(6), 505-513.
233. Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2004, Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7185-7191.
234. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994, CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

235. Tlak Gajger I, Vugrek O, Grilec D, Petrinc Z, 2010, Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. *Veterinarni Medicina*, 55(9), 457-462.
236. Tlak Gajger I, Kolodziejek J, Bakonyi T, Nowotny N, 2014, Prevalence and distribution patterns of seven different honeybee viruses in diseased colonies: a case study from Croatia. *Apidologie*, 1-6.
237. Todd JH, De Miranda JR, Ball BV, 2007, Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie*, 38(4), 354-367.
238. Toplak I, Rihtarič D, Ciglencečki UJ, Hostnik P, Jenčič V, Barlič-Maganja D, 2012, Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies of Carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slovenian Veterinary Research*, 49, 89-96.
239. Traver BE, Fell RD, 2011, Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of invertebrate pathology*, 107(1), 43-49.
240. Underwood RM, vanEngelsdorp D, 2007, Colony collapse disorder: have we seen this before? *Bee Culture*, 35, 13-18.
241. van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, 2000, *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press.
242. vanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Pettis J, 2008, A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring. *PLoS One* 3, e4071.
243. vanEngelsdorp D, Evans JD, Donovall L, Mullin C, Frazier M, Frazier J, Tarpy D, Hayes J, Pettis JS, 2009, "Entombed Pollen": A new condition in honey bee colonies associated with increased risk of colony mortality. *Journal of invertebrate pathology*, 101(2), 147-149.
244. vanEngelsdorp D, Meixner MD, 2010, A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 80-95.
245. Vecchi MA, Lavazza A, Carpana E, Bassi S, Dottori M, 1990, Viral infections of honey bees. Current problems and electron microscope findings, *Selezione Vet.* 31, 859-871.
246. Vossbrinck CR, Debrunner-Vossbrinck BA, 2005, Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia parasitologica*, 52(1-2), 131-142.

247. Vossbrink CR, Debrunner-Vossbrink BA, 2005, Molecular Phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitologica* 52, 131-142.
248. Wang DI, Moeller FE, 1970, The division of labor and queen attendance behaviour of nosema-infected worker honey bees. *Journal of Economic Entomology*, 63, 1539-1541.
249. Wang H, Xie J, Shreeve TG, Ma J, Pallett DW, King LA, Possee RD, 2013, Sequence recombination and conservation of *Varroa destructor* virus-1 and deformed wing virus in field collected honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 8(9), e74508.
250. Ward L, Waite R, Boonham N, Fisher T, Pescod K, Thompson H, Chantawannakul P, Brown M, 2007, First detection of Kashmir bee virus in the UK using real-time PCR. *Apidologie*, 38, 181-190.
251. Weidner E, Byrd W, Scarborough A, Pleshinger J, Sibley D, 1984, Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle membrane into plasma membrane. *Journal of Protozoology*, 31, 195-198.
252. Weiss LM, 2001, Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta tropica*, 78(2), 89-102.
253. Williams IH, 1994, The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agricultural Zoology Reviews*, 6, 229-257.
254. Williams GR, Shafer AB, Rogers RE, Shutler D, Stewart DT, 2008, First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 189-192.
255. Yang B, Peng G, Li T, Kadowaki T, 2013, Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecology and Evolution*, 3(2), 298-311.
256. Yang X, Cox-Foster DL, 2005, Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 7470-7475.
257. Yue C, Genersch E, 2005, RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*), *Journal of General Virology*, 86, 3419-3424.
258. Yue C, Schroder M, Gisder S, Genersch E, 2007, Vertical transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of General Virology*, 88, 2329-2336.

259. Zander E, 1909, Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene.
Münchener Bienenzeitung, 31, 196-204.

BIOGRAFIJA

Predrag Simeunović je rođen 17.04.1984. godine u Šapcu. Osnovnu školu i gimnaziju je završio u Šapcu. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2003/2004 godine, a diplomirao 2009. godine, sa prosečnom ocenom 8.84. Tokom osnovnih studija, bio je korisnik stipendije Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije.

Po završetku osnovnih studija stupa na radno mesto veterinara u „Veterinarskoj stanici Šabac A.D.“ u kojoj je radio od 2010-2012. godine. Tokom rada u „Veterinarskoj stanici Šabac A.D.“ bio je zadužen za brigu o zdravstvenom statusu goveda na komercijalnim farmama krava Mačvanskog okruga. Položio je državni stručni ispit i stekao licencu za obavljanje veterinarske delatnosti.

Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2010/2011. godine. Položio je sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,33 (devet i 33/100). Kao doktorant je, u prvom semestru osnovnih studija školske 2011/2012 godine, aktivno učestvovao u izvođenju praktične nastave na predmetu Zoologija. U aprilu 2012. godine biva izabran na mesto asistenta za užu naučnu oblast Biologija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Tada biva uključen kao istraživač u okviru projekta Ministarstva prosvete i nauke Republike i Srbije “Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane” (rukovodilac prof. dr Zoran Stanimirović; ev. br. 46002). Prilikom angažovanja u Laboratoriji za genetiku životinja Katedre za biologiju, ovladao je molekularnim tehnikama koje se primenjuju u dijagnostici prisustva patogena životinja i ispitivanju nasledne osnove papkara u svrhu selekcije. Od 2014. godine radi kao asistent na Katedri za bolesti papkara Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Kao autor ili koautor objavio je 10 radova u međunarodnim časopisima, kao i 17 radova na skupovima od međunarodnog i nacionalnog značaja. Kao autor i koautor, prijavio je 22 sekvence novih haplotipova u genskoj bazi podataka (NCBI).

IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani: Predrag Simeunović

Broj upisa:

Izjavljujem

Da je doktorska disertacije pod naslovom „Molekularno-genetička detekcija i identifikacija uzročnika mikrosporidijalnih i virusnih infekcija zastupljenih kod pčelinjih društava na teritoriji Srbije“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati konkretno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

2015. godine

Potpis doktoranda:



**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE
DOKTORSKOG RADA**

Ime i prezime autora: Predrag Simeunović

Broj upisa:

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: „Molekularno-genetička detekcija i identifikacija uzročnika mikrosporidijalnih i virusnih infekcija zastupljenih kod pčelinjih društava na teritoriji Srbije“

Mentor 1: Prof. dr Zoran Stanimirović

Mentor 2: Dr Dejan Vidanović

Potpisani Predrag Simeunović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

2015. godine

Potpis doktoranda:



IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom „Molekularno-genetička detekcija i identifikacija uzročnika mikrosporidijalnih i virusnih infekcija zastupljenih kod pčelinjih društava na teritoriji Srbije“ koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo - bez prerade

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

U Beogradu,

2015. godine

Potpis doktoranda:

