DOI: 10.22092/VJ.2026.371703.2276 No:152 autumn 1405 *Veterinary Research & Biological Products*

Original Article

Identification of pathogenic Nosema species in apiaries of Markazi province

Seyed Davood Hosseini[1*], Esmaeil Asli[2], Nafisehsadat Mirjamali Mehrabadi[1]

1. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Biotecnology Department, Arak, Iran.

2. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Brucellosis Department, Karaj, Iran.

Submited: 2025.12.20 Accepted: 2026.05.29

Revised: 2026.05.26 Published: 2026.10.01

* Corresponding author: sd.hosseini@rvsri.ac.ir

Abstract

Introduction: Nosema spp. is a genus of microsporidia in honeybees that reduces colony performance and honey production. These unicellular intracellular parasites specifically target the epithelial tissue of the honeybee midgut, causing disruptions in digestion and nutrient absorption, which leads to immune system weakening, reduced lifespan of worker bees, and, in severe cases, complete colony collapse. Accurate identification of *Nosema apis* (*N. apis*) or *Nosema ceranae* (*N. ceranae*) is a fundamental step in controlling or treating the infection in honeybee colonies. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the epidemiology and identify Nosema species using molecular methods in Markazi province, Iran, between 2014 and 2024. **Methods:** A total of 59 samples were randomly collected from different hives across 11 counties of Markazi province. Sampling was conducted from active apiaries during different seasons. A multiplex PCR method was employed to facilitate the simultaneous differentiation of *N. apis* and using specific primers targeting the ribosomal DNA region. The PCR results were compared with direct microscopic examination of homogenized abdominal suspensions of honeybees. **Results:** The overall infection rate in samples referred to the Razi Vaccine and Serum Research Institute was 28.8% by microscopic examination and 61% by molecular methods. The ratio of PCR positivity to microscopic positivity was calculated to be 2.12. **Conclusion:** In this study, the only Nosema species identified in infected honeybees was *N. ceranae*. Despite the collection and analysis of diverse samples from apiaries across the province, no other known Nosema species were reported. Future research should involve increasing the sample size to better cover spatiotemporal biodiversity and employing broader-range molecular diagnostic panels to more confidently determine the presence or absence of other species.

Keywords: Nosema, Identification, Molecular diagnostic, Markazi province

Authors retain the copyright and full publishing rights.
Published by Razi Vaccine & Serum Research Institute This article is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک شماره ۱۵۲، پاییز ۱۴۰۵ DOI: 10.22092/VJ.2026.371703.2276

مقاله کامل

شناسایی گونه‌های بیماری‌زا نوزما در زنبورستان‌های استان مرکزی

سیدداود حسینی[1*]، اسماعیل اصلی[2]، نفیسه سادات میرجمالی مهرآبادی[1]

۱. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بخش بیوتکنولوژی، اراک، ایران.

۲. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بخش بروسلوز، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۱۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۰۸ تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۷/۰۱

* نویسنده مسئول: sd.hosseini@rvsri.ac.ir

چکیده

مقدمه: نوزما (*Nosema spp*) یک جنس از میکروسپوریدیا در زنبور عسل است که عملکرد کلنی و تولید عسل را کاهش می‌دهد. این انگل‌های تک‌یاخته درون‌سلولی، به ویژه بافت اپیتلیال معده زنبور عسل را هدف قرار داده و با ایجاد اختلال در هضم و جذب مواد مغذی، موجب تضعیف سیستم ایمنی، کاهش طول عمر زنبورهای کارگر، و در موارد شدید، فروپاشی کامل کلنی می‌شوند. تشخیص دقیق (*N. apis*) *Nosma apis* یا (*N. ceranea*) *Nosema ceranea*، گام اصلی در کنترل و یا درمان این بیماری در زنبورعسل است. **هدف:** هدف از این مطالعه، ارزیابی اپیدمیولوژی و شناسایی گونه‌های نوزما با استفاده از روش‌های مولکولی در استان مرکزی در بازه زمانی سال‌های ۱۳۹۳-۱۴۰۳ است. **روش کار:** تعداد ۵۹ نمونه به طور تصادفی از کندوهای مختلف در ۱۱ شهرستان استان مرکزی جمع‌آوری گردید. نمونه‌برداری از زنبورستان‌های فعال در فصول مختلف سال انجام شد. از روش مولکولی multiplex PCR برای تسهیل در تشخیص همزمان دو گونه *N. apis* و *N. ceranae* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه DNA ریبوزومی استفاده شد. نتایج حاصل از PCR با بررسی میکروسکوپی مستقیم از سوسپانسیون همگن‌شده شکم زنبورها مقایسه گردید. **یافته‌ها:** میزان کلی آلودگی از نمونه‌های ارجاعی به موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی با بررسی میکروسکوپی ۲۸/۸ درصد و به روش مولکولی ۶۱ درصد بود و نسبت موارد مثبت در تست PCR به تست میکروسکوپی، ۲/۱۲ برابر محاسبه شد. **نتیجه‌گیری:** در این مطالعه، تنها گونه نوزمای شناسایی‌شده در زنبورهای آلوده، *N. ceranae* بود. به‌رغم جمع‌آوری و تحلیل نمونه‌های متنوع از زنبورستان‌های استان، هیچ نمونه‌ای از سایر گونه‌های شناخته‌شده نوزما گزارش نشد. گام‌های آینده باید با افزایش تعداد نمونه‌ها، تنوع زیستی مکانی-زمانی را بیشتر پوشش دهد و از پنل‌های تشخیصی مولکولی با دامنه گسترده‌تر استفاده کند تا بتوان از وجود یا عدم وجود گونه‌های دیگر با اطمینان بیشتری قضاوت کرد.

واژه‌های کلیدی: نوزما، شناسایی؛ تشخیص مولکولی؛ استان مرکزی

مقدمه

میکروسپوریدیاها تک‌یاخته‌های انگلی حشرات، به‌ویژه زنبور عسل، هستند. آلودگی به *Nosema* یکی از دلایل اصلی کاهش جمعیت کلونی‌های زنبور عسل در سطح جهان شناخته می‌شود (۲،۱).

برای دهه‌ها، *Nosema apis* تنها گونه شناخته‌شده در زنبور عسل اروپایی بود؛ اما در سال ۱۹۹۶، *Nosema ceranae* برای نخستین‌بار در زنبورعسل آسیایی شناسایی و توصیف شد (۳). این گونه به سرعت در مناطق مختلف جهان گسترش یافت و در بسیاری از مناطق، جایگزین *N. apis* به‌عنوان گونه غالب گردید (۴، ۵ ، ۶). آلودگی با *N. ceranae* می‌تواند باعث آسیب شدید بافتی، اختلال در رفتار زنبورها و در نهایت کاهش محصولات کلونی شود. تظاهرات بالینی این دو گونه متفاوت است؛ به‌طوری‌که *N. apis* معمولاً با اسهال آبکی و تجمع زنبوران مرده در اطراف کندو (به‌ویژه در فصول سرد) همراه است، در حالی که *N. ceranae* اغلب موجب مرگ ناگهانی و کاهش جمعیت کندو بدون علائم اسهال آشکار در تمامی فصول سال می‌گردد. همچنین، *N. apis* با کاهش توانایی پرواز و علائم بالینی کلاسیک شناخته می‌شود، اما *N. ceranae* با کاهش طول عمر کارگر، افت جمعیت و کاهش عملکرد کندو، اغلب بدون علائم کلاسیک ظاهر می‌شود (۸،۷). مطالعات نشان می‌دهند که گونه‌ی *N. ceranae* در سال‌های اخیر از ایران نیز گزارش شده است (۹).

تشخیص سریع و کم‌هزینه آلودگی به نوزما بر اساس یافتن اسپورهای انگل به روش میکروسکوپی انجام می‌شود (۱۰). این روش دارای محدودیت‌هایی از جمله حساسیت پایین در مراحل اولیه آلودگی و ناتوانی در تفکیک *N. apis* و *N. ceranae* است (۱۱). روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، با حساسیت و ویژگی بالا، امکان تشخیص دقیق و تفکیک گونه‌ای را فراهم می‌کنند (۱۳). با توجه به شیوع بالای *N. ceranae* در سطح جهان (۱) و ضرورت تشخیص صحیح برای مدیریت بیماری، در این مطالعه جهت بررسی وضعیت آلودگی و تعیین گونه غالب *Nosema* در زنبورستان‌های استان مرکزی، از روش مولکولی Multiplex PCR استفاده شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مطالعه

استان مرکزی در مرکز ایران، بین عرض‌های جغرافیایی ‹۳۰ ۳۳° و ‹۳۵ ۳۰° شمالی و طول‌های جغرافیایی ‹۵۷ ۴۸° و ‹۵۱ شرقی واقع شده است. این استان شامل ۱۱ شهرستان و ۱۸ ناحیه است و مساحتی معادل ۲۹/۱۵۲ کیلومتر مربع (۱/۸٪ کل مساحت ایران) دارد. آب و هوای استان متغیر است؛ در مناطق کوهستانی نزولات جوی بیشتر به صورت برف و در مناطق پست‌تر معمولا باران است. به طور کلی، اراک آب و هوایی نسبتاً سرد و خشک دارد؛ هوای آن در تابستان گرم و خشک، در پاییز خنک و همراه با باد، در زمستان سرد و برفی و در بهار معتدل است. حداکثر دما ممکن است در تابستان به بیش از ۳۵ درجه سانتی‌گراد برسد و در زمستان تا ۲۵ °C- درجه سانتی‌گراد در زمستان کاهش یابد. توزیع کندوها متکی بر وجود مراتع گل‌ده (گیاهان زراعی و مرتعی)، دسترسی به منابع آبی و مکان‌های زمستان‌گذرانی است. مناطق کوهپایه‌ای، مراتع و باغ‌های میوه‌خیز (به‌ویژه حوالی محلات، گلپایگان و خمین) بیشترین تراکم کندوداری را دارند؛ در دشت‌های خشک‌تر و پیرامون مناطق شهری، تراکم کمتر است. کنه‌ها و بیماری‌های قارچی/ویروسی از مشکلات مهم و بیماریهای شایع منطقه محسوب می‌شوند. میانگین مقدار تولید عسل متغیر است؛ کندوهای خوب مدیریت‌شده در فصل مناسب می‌توانند حدود ۲۰-۴۰ کیلوگرم و حتی بیش از ۶۰ کیلوگرم عسل در سال تولید کنند، اما میانگین عمومی در سطح استان معمولاً کمتر و وابسته به شرایط محلی است. در استان مرکزی تعداد ۱۲۳۶ زنبورستان و حدود ۱۲۵۳۵۷ کلنی وجود دارد.

جمع‌آوری نمونه‌ها

در بازه زمانی ۱۳۹۳ -۱۴۰۳، کلیه نمونه‌های ارجاعی به موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شعبه اراک، مورد آزمایش و بررسی قرار گرفتند. نمونه‌برداری از زنبورستان‌های استان مطابق جدول (۲) و از اطراف هر کندو، ۳۰ زنبور مرده انتخاب و به ظرف‌های دارای مشخصات نمونه منتقل شدند. نمونه‌ها برای آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰°C - نگهداری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

به ۱۰ زنبورعسل از هر تیوب، ۲۰ میلی‌لیتر آب استریل دوبار تقطیر اضافه شد و نمونه‌ها چندین بار با هاون به طور کامل له شدند. نمونه‌های آماده شده به یک تیوب جدید منتقل شدند و برای آزمایش‌های میکروسکوپی و مولکولی در °C ۲۰- ذخیره شدند.

شناسایی میکروسکوپی

یک قطره از این مخلوط روی لام قرار داده شد، سپس لامل گذاشته شد و نمونه با عدسی روغنی و بزرگ‌نمایی ۱۰۰X میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون میکروسکوپی، اسپورهای نوزما به صورت اجسام بیضی تا میله‌ای‌شکل، بیرنگ و با خاصیت انکسار نور، به طول ۳ تا ۵ میکرون و عرض ۲ تا ۳ میکرون مشاهده می‌شوند.

شناسایی مولکولی

توالی کامل کروموزوم‌های هر دوگونه *N. apis* و *N. ceranea* از Genebank دریافت شد. پرایمرهای اختصاصی هر گونه با استفاده از نرم افزار Primer ۳ انتخاب و توسط شرکت متابیون آلمان ساخته شدند. به طور خلاصه، نمونه‌ها با استفاده از روش salting out استخراج شدند. روش salting out یک روش شیمیایی است که بر اساس آن DNA در حضور نمک‌های اشباع، غیر قابل حل شده و به صورت رسوب جدا می‌شود. ژن هدف با استفاده از روش multiplex PCR تکثیر شد. در واکنش فوق از آنزیم Taq به عنوان DNA پلیمراز و یک جفت پرایمر APIS-F و APIS-R با محصول bp۳۲۱ برای *N. apis* و یک جفت پرایمر CERA-F و CERA-R با محصول bp۲۲۸ برای *N. ceranea* استفاده شد (جدول ۱).

دستورالعمل بهینه برای تکثیر به این صورت بود: واسرشت در دمای ۹۵°C برای ۳ دقیقه، سپس ۳۴ سیکل شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، مرحله annealing در دمای ۵۹°C برای هر دوگونه *N. apis* و *N. ceranea* به‌مدت ۴۰ ثانیه، و طویل‌سازی در دمای °C ۷۲ برای ۴۰ ثانیه. در پایان واکنش، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C نگه داشته شدند و سپس برای توقف واکنش تا ۴°C سرد شدند. برای شناسایی گونه های نوزما، وجود هر دو فرم اسپور و گونه رویشی در نمونه ضروری است. دمای annealing (TA) و شرایط PCR با نمونه‌های کنترل مثبت برای هر دو گونه *N. apis* و *N. ceranea* کنترل شدند. الکتروفورز محصولات واکنش PCR با ژل آگارز ۱/۵٪ انجام و باندهای DNA پس از افزودن GELRED به عنوان شناساگر، با نور ماوراءبنفش (UV) مشاهده گردید. از ۱۰۰bp ladder به عنوان مارکر استفاده شد.

نتایج

تمام نمونه ها به روش میکروسکوپی و مولکولی (PCR) برای یافتن *N. apis* و *N. ceranea* مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲ و شکل ۱). آزمون میکروسکوپی نشان داد که از ۵۹ نمونه مورد مطالعه، ۲۰ نمونه (معادل ۲۸/۸٪) حاوی اسپورهای نوزما بودند. بر اساس نتایج آزمون میکروسکوپی، بیشترین میزان آلودگی در زنبورهای عسل شهرستان کمیجان با ۸۰٪ آلودگی و سپس شهرستان شازند با ۷۵٪ مشاهده شد؛ کمترین میزان آلودگی نیز در زنبورهای عسل شهرستان‌های آشتیان، خنداب و تفرش با ۰٪ (صفر درصد) آلودگی گزارش شد.

میزان آلودگی کلی در این استان با بررسی‌های میکروسکوپی برابر ۲۸/۸٪ کل نمونه‌ها بود، درحالی که این میزان در تست

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمون RCP.

نام پرایمر	توالی نوکلوتیدی پریمرها('۵-'۳)	عامل هدف	اندازه محصول(bp)
APIS-F	GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA	*N. apis*	۳۲۱
APIS-R	GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACTATG	*N. apis*	
CERA-F	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA	*N. ceranea*	۲۲۸
CERA-R	CCCGTCATTCTCAAACAAAAAACCG	*N. ceranea*	

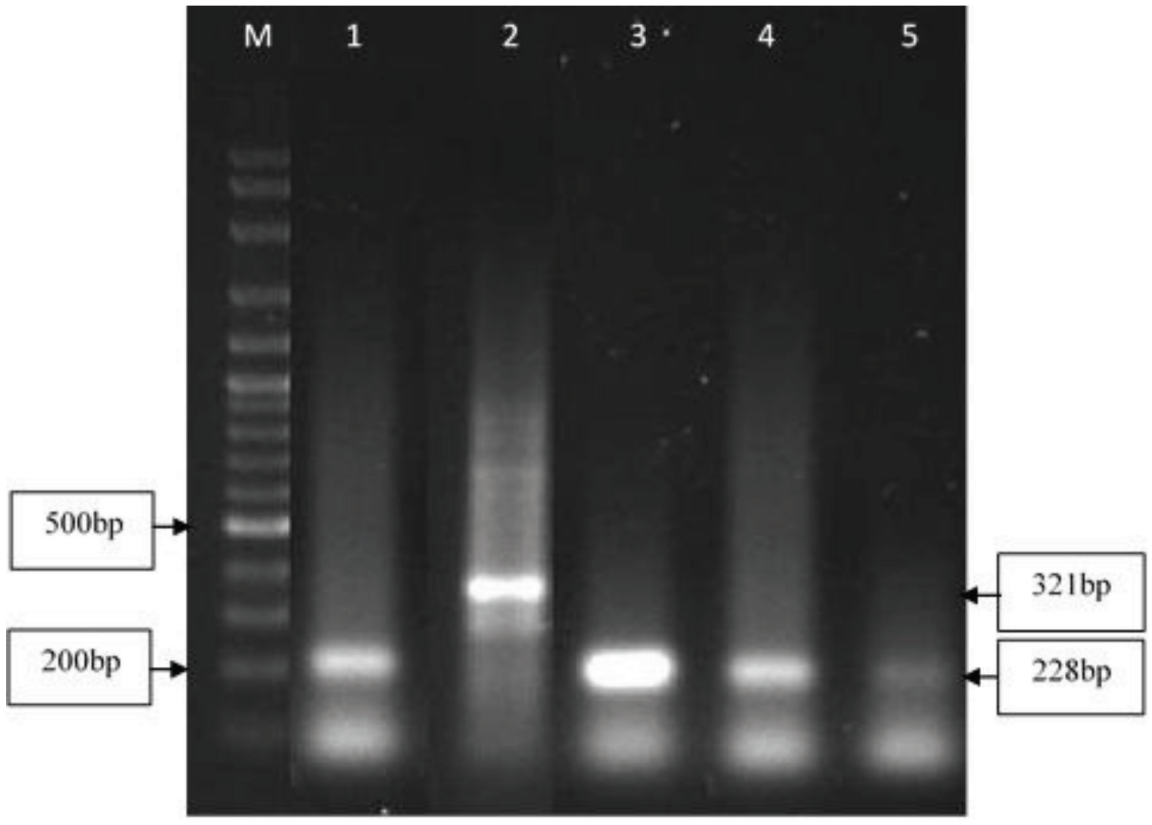
PCR برابر ۶۱٪ بود. صحت تست PCR در مقایسه با آزمون میکروسکوپی در این مطالعه معادل ۲/۱۲ محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد *N. ceranea* تنها گونه نوزما بود که زنبورهای عسل جمع‌آوری شده از این منطقه گسترده جغرافیایی در استان مرکزی را آلوده می‌کرد.

در واکنش PCR باندهای bp۳۲۱ برای *N. apis* و bp۲۲۸ برای *N. ceranea* به‌خوبی تکثیر و روی ژل آگارز نمایان شدند. باندهای مورد نظر نیز در نمونه ها روی ژل مشخص گردید (شکل ۱).

براساس یافته‌های تست PCR، شهرستان‌های خنداب و ساوه بیشترین میزان آلودگی زنبورهای عسل را با ۱۰۰٪ آلودگی در نمونه‌ها نشان دادند. سپس شهرستان‌های اراک، شازند، کمیجان و دلیجان به ترتیب دارای آلودگی‌های ۸۸/۹٪، ۸۳/۳٪، ۸۰٪ و ۷۱/۴٪ بودند. میزان آلودگی شهرستان‌های خمین و محلات با انگل نوزما برابر ۵۰٪ بود و در نهایت، شهرستان آشتیان با ۱۶/۷٪ کمترین میزان آلودگی در میان مناطق مورد مطالعه را داشت. در شهرستان‌های تفرش و زرندیه هیچ‌گونه نوزمایی شناسایی نشد.

بحث

میزان آلودگی کلی بر اساس روش مولکولی ۶۱ ٪ بود که نشان‌دهنده شیوع بالای آلودگی به انگل نوزما در زنبورستان‌های مورد بررسی است. این میزان با نتایج سایر مطالعات در مناطق مختلف ایران و جهان که شیوع *Nosema ceranae* را بالا گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد. مطالعات پیشین در ایران (۹) شیوع بالای نوزما را در زنبورستان‌های کشور تأیید کرده‌اند. در سطح جهانی، نرخ شیوع گزارش‌شده در اروپا (۱،۴)، اسپانیا (۵) و ایتالیا (۶) اغلب بین ۴۰ تا ۸۰٪ متغیر بوده است. با این حال، پراکندگی جغرافیایی ناهمسانی از آلودگی در استان مرکزی مشاهده شد؛ به طوری که میزان آلودگی از ۱۶/۷٪ در آشتیان تا ۱۰۰٪ در خنداب و ساوه متغیر بود. این تنوع را می‌توان به عوامل متعددی از جمله



شکل ۱- محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، M مارکر ۱۰۰bp؛ چاهک ۱ کنترل مثبت *N. ceranea*؛ چاهک ۲ کنترل مثبت *N. apis*؛ چاهک ۳-۵ نمونه‌های مثبت *N. ceranea*.

تفاوت در تراکم زنبورستان‌ها، شیوه‌های مدیریتی، شرایط اقلیمی، میزان تبادل زنبورداران و دسترسی به منابع غذایی نسبت داد. تأثیر عوامل مدیریتی مانند جابه‌جایی کندوها، تغذیه تکمیلی و ضدعفونی تجهیزات بر شدت آلودگی نوزما پیش‌تر توسط پژوهشگران دیگر نیز مورد تأکید قرار گرفته است (۷،۸).

یافته کلیدی این پژوهش از لحاظ روش‌شناختی، برتری قابل توجه Multiplex PCR در تشخیص عفونت نوزما است. روش میکروسکوپی، علی‌رغم سادگی و هزینه پایین، دو محدودیت اساسی دارد: نخست، عدم توانایی در شناسایی عفونت‌های با تراکم اسپور پایین (زیر آستانه تشخیص میکروسکوپی) و دوم، ناتوانی قطعی در تمایز مورفولوژیک بین *N. apis* و *N. ceranea* ؛ زیرا اندازه و شکل اسپورهای این دو گونه عملاً با میکروسکوپ نوری قابل تفکیک نیست (۱۰،۱۱). این یافته با گزارش‌های Martin-Hernández و همکاران (۲۰۰۷) که نشان دادند روش PCR تا ۱۰۰۰ برابر حساس‌تر از میکروسکوپی است، کاملاً همسو است (۱۱). روش PCR با پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق، به دلیل حساسیت و ویژگی بالا، قابلیت اطمینان بیشتری دارد. این روش نه تنها حضور مقادیر بسیار کم DNA پاتوژن را نیز تشخیص می‌دهد، بلکه با ایجاد باندهای اختصاصی (۲۲۸ جفت باز برای *N. ceranae*)، شناسایی دقیق گونه عامل را ممکن می‌سازد.

به طور مشابه، Hamiduzzaman و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که استفاده از Multiplex PCR نه تنها امکان تشخیص همزمان هر دو گونه را فراهم می‌کند، بلکه می‌تواند برای سنجش بار آلودگی (با اصلاح به qPCR) نیز به کار رود (۱۳). بنابراین، جایگزینی تدریجی روش میکروسکوپی با روش‌های مولکولی در برنامه‌های پایش ملی، یک ضرورت غیرقابل اجتناب به نظر می‌رسد. با این حال، نباید از ارزش روش میکروسکوپی به عنوان یک ابزار غربالگری سریع و کم‌هزینه در شرایط صحرایی غافل شد؛ بلکه رویکرد بهینه، استفاده مکمل از هر دو روش است: میکروسکوپی برای غربالگری مقدماتی و PCR برای تأیید نهایی و تمایز گونه‌ای.

مهم‌ترین یافته اپیدمیولوژیک این مطالعه، شناسایی انحصاری *N. ceranea* و عدم تشخیص حتی یک نمونه از *N. apis* در میان ۵۹ نمونه جمع‌آوری‌شده از ۱۱ شهرستان استان مرکزی است. این الگو به وضوح نشان‌دهنده جایگزینی کامل یا تقریباً کامل *N. ceranea* با *N. apis* در منطقه مورد مطالعه است. این پدیده تنها مختص ایران نیست؛ بلکه یک روند جهانی است که در دهه اخیر در بسیاری از کشورها مستند شده است.

Fries و همکاران (۱۹۹۶) در توصیف اولیه *N. ceranae* هشدار دادند که این گونه به دلیل بیماری‌زایی بالاتر و سازگاری بهتر با طیف وسیع‌تری از شرایط اقلیمی، پتانسیل جایگزینی با *N. apis* را دارد (۳). Higes و همکاران (۲۰۰۶) نخستین گزارش از ظهور *N. ceranea* در اروپا را ارائه دادند و نشان دادند که این گونه به سرعت در حال گسترش است (۴). Botías و همکاران (۲۰۱۲) در اسپانیا نشان دادند که طی یک دهه، *N. ceranae* به طور کامل جایگزین *N. apis* شده است (۵). مطالعه اخیر Sgroi و همکاران (۲۰۲۵) در ایتالیا نیز همین الگو را تأیید کرده و به نکته جالبی اشاره می‌کند: در مناطقی که *N. ceranea* غالب شده است، حتی در نمونه‌هایی که میکروسکوپی مثبت هستند، تفکیک گونه‌ای بدون روش مولکولی امکان‌پذیر نیست (۶).

دلایل متعددی برای برتری رقابتی *N. ceranae* پیشنهاد شده است: (الف) تولید اسپور پایدارتر در دماهای بالاتر، (ب) دوره نهفتگی کوتاه‌تر که منجر به تکثیر سریع‌تر درون میزبان می‌شود، (ج) توانایی آلوده‌سازی سلول‌های بافت‌های مختلف، از جمله غدد هیپوفارنژیال که بر تغذیه لاروها تأثیر می‌گذارد (۸)، و (د) احتمال انتقال عمودی مؤثرتر. هرچند مطالعه حاضر برای آزمون این فرضیه‌ها طراحی نشده است، اما الگوی مشاهده‌شده کاملاً با این مکانیسم‌ها سازگار است.

یک نکته مهم آن است که، با وجود عدم شناسایی *N. apis* در این مطالعه، نمی‌توان این نتیجه را به کل کشور تعمیم داد. احتمال دارد که در ارتفاعات بسیار بالا یا مناطق با اقلیم بسیار سرد (مثل برخی مناطق آذربایجان شرقی و غربی یا زاگرس مرکزی)، *N. apis* همچنان حضور داشته باشد؛ زیرا این گونه مقاومت بیشتری نسبت به سرما نشان می‌دهد. بنابراین، برای نتیجه‌گیری قطعی در سطح ملی، انجام مطالعات جامع‌تر با پوشش تمام پهنه‌های اقلیمی و فصول مختلف سال ضروری است.

اخیراً، مرزهای دانش در مورد پاتوژن‌های زنبور عسل فراتر از دو گونه کلاسیک نوزما رفته است. مطالعه بسیار جدید

Izquierdo و همکاران (۲۰۲۵) که در مجله International Journal for Parasitology منتشر شده، گزارشی از کشف یک گونه کاملاً جدید از جنس Vairimorpha (که قبلاً با نوزما هم خانواده تلقی می‌شد) در زنبورهای عسل اسپانیا ارائه می‌دهد. نکته قابل تأمل این است که این گونه جدید با روش میکروسکوپی قابل تشخیص نبود و تنها با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید (NGS) شناسایی شد (۱۲). همچنین در همان مطالعه، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی برای *N. apis* و *N. ceranea* تولید شده است که می‌تواند در آینده روش‌های تشخیصی سریع و دقیق ایمونولوژیک را ممکن سازد (۱۲).

این یافته‌ها دو درس مهم برای پژوهش‌های آینده در ایران دارد: نخست، تنها اتکا به روش میکروسکوپی یا حتی PCR معمولی با پرایمرهای اختصاصی دو گونه ممکن است گونه‌های نادر یا جدید را آشکار نکند. دوم، تنوع انگل‌های میکروسپوریدیایی زنبور عسل بسیار بیشتر از آن چیزی است که تا یک دهه پیش تصور می‌شد. بنابراین، به پژوهشگران ایرانی توصیه می‌شود که در گام‌های بعدی، از روش‌های NGS یا حداقل PCR با پرایمرهای عمومی (Universal primers) برای ردیابی طیف وسیع‌تری از پاتوژن‌های احتمالی استفاده کنند.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس این تحقیق، *Nosema ceranae* گونه غالب و تنها عامل نوزماتوز در زنبورهای عسل استان مرکزی است. توصیه‌ها بشرح ذیل ارایه می‌گردد:

۱. روش تشخیصی: با توجه به شیوع بالا و ضرورت مدیریت بهینه بیماری، توصیه می‌شود روش مولکولی (PCR) به عنوان روش استاندارد تشخیص و تفکیک گونه‌های Nosema در برنامه‌های نظارتی و تحقیقاتی کشور جایگزین یا مکمل روش میکروسکوپی شود.

۲. مدیریت و کنترل: برای کاهش تلفات و خسارات اقتصادی ناشی از نوزماتوز، رعایت اصول مدیریتی صحیح الزامی است. این اصول شامل تقویت کلونی‌ها با تغذیه مناسب، تعویض منظم ملکه‌های پیر، رعایت اصول بهداشتی و ضدعفونی کندوها و ادوات، جلوگیری از غارت و کاهش استرس کلونی می‌باشد.

۳. پایش مستمر: اجرای برنامه‌های پایش منظم برای ردیابی تغییرات در سطح آلودگی و شناسایی احتمالی گونه‌ها یا سویه‌های جدید پاتوژن در سایر مناطق ایران پیشنهاد می‌گردد.

۴. تحقیقات آینده: انجام مطالعات تکمیلی برای بررسی ارتباط بین بار آلودگی (با استفاده از qPCR) و شدت علائم بالینی، بررسی نقش هم‌عفونی با ویروس‌ها و دیگر پاتوژن‌ها، و نیز ارزیابی عوامل مدیریتی و محیطی مؤثر بر شدت بیماری در شرایط ایران ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی از اداره کل دامپزشکی استان مرکزی و موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اراک بابت همکاری در نمونه‌برداری و انجام آزمایشات اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در خصوص این مقاله هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Hges M, Martín-Hernández R, Meana A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie. 2010 May 1; 41(3):375-392. doi.org/10.1051/apido/2010019.

2. Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, et al. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. PloS one. 2010 Oct 6;5 (10):e13181. doi.org/10.1371/journal.pone.0013181.

3. Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ. *Nosema ceranae* n. sp.(Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis*

cerana (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 1996 Aug 30; 32 (3):356-365. doi. org/10.1016/S0932-4739 (96)80059-9.

4. Higes M, Martín R, Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J Invertebr Patho. 2006 Jun 1; 92(2): 93-95. doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005.

5. Botías C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto A, Martínez-Salvador A, De La Rúa P, et al. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. Res. Vet. Sci. 2012 Aug 1; 93(1):150-155. doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.08.002.

6. Sgroi G, D'Auria LJ, Lucibelli MG, Mancusi A, Proroga YT, Esposito M, et al. Bees on the run: Nosema spp.(Microsporidia) in *Apis mellifera* and related products, Italy. Front Vet Sci. 2025 Jan 6; 11:1530169. doi. org/10.3389/fvets.2024.1530169.

7. Kralj J, Fuchs S. Nosema sp. influences flight behavior of infected honey bee *(Apis mellifera*) foragers. Apidologie. 2010 Jan; 41(1):21-28. doi.org/10.1051/apido/2009046.

8. Higes M, García-Palencia P, Urbieta A, Nanetti A, Martín-Hernández R. *Nosema apis* and *Nosema ceranae* tissue tropism in worker honey bees (*Apis mellifera*). Vet. Pathol. 2020 Jan; 57 (1): 132-138. doi. org/10.1177/0300985819864302.

9. Modirrousta H, Moharrami M, Mansouri MA. Retrospective study of the *Nosema ceranae* infection of honey bee colonies in Iran (2004-2013). Arch. Razi Inst. 2014 Dec 1; 69(2):197-200. doi: 10.7508/ARI.2014.02.012.

10. Shimanuki H, Knox DA. Diagnosis of honey bee diseases. Agriculture Handbook, No. AH-690. 2000. US Department of Agriculture, Meryland. USA.

11. Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E, Higes M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl Environ Microbiol. 2007 Oct; 73(20):6331-6338. doi: 10.1128/AEM.00270-07.

12. Izquierdo F, Fernández Vadillo C, Fenoy S, Hurtado-Marcos C, Magnet A, Higes M, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies for specific detection of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in beehive samples. Int. J. Parasitol. 2025; 55(3-4):163-172. doi: 10.1016/j.ijpara.2024.11.008.

13. Hamiduzzaman MM, Guzman-Novoa E, Goodwin PH. A multiplex PCR assay to diagnose and quantify Nosema infections in honey bees (*Apis mellifera*). J Invertebr Pathol. 2010 Oct; 105 (2):151-155. doi: 10.1016/j.jip.2010.06.001.